

**Ariane Stéfani Pereira**

**ANÁLISES FUNCIONAIS DE VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONHECIDO NO GENE  
DE PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER DE MAMA *PALB2***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Edenir Inêz Palmero  
Co-orientador: Dr. Matias Eliseo Melendez

**Barretos, São Paulo  
2019**

**Ariane Stéfani Pereira**

**ANÁLISES FUNCIONAIS DE VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONHECIDO NO GENE  
DE PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER DE MAMA *PALB2***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Edenir Inêz Palmero  
Co-orientador: Dr. Matias Eliseo Melendez

**Barretos, São Paulo  
2019**

P436a Pereira, Ariane Stéfani.

Análises funcionais de variantes de significado clínico desconhecido no gene de predisposição hereditária ao câncer de mama PALB2. / Ariane Stéfani Pereira. - Barretos, SP 2019.

95 f. : il.

Orientadora: Dra. Edenir Inêz Palmero.

Coorientador: Dr. Matias Eliseo Melendez.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2019.

1. Câncer de mama hereditário. 2. PALB2. 3. Variante de significado clínico desconhecido. 4. Genes de predisposição ao câncer de mama. 5. Análises funcionais. 6. Edição gênica. I. Autor. II. Palmero, Edenir Inêz. III. Melendez, Matias Eliseo. IV. Título.

CDD 616.994 94

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB8/9570 Biblioteca da  
Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

## **SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO**

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Auxílio à Pesquisa – Bolsa de Mestrado Regular (processo número 2017/17451-6).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

“Esta dissertação (ou tese, se for o caso) 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”.

Dedico este trabalho aos meus pais e irmão, que sempre foram o motivo da minha  
inspiração e força, que entenderam cada momento de ausência e comemoraram cada  
conquista ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

Ao longo desses dois anos, muitas foram as pessoas que auxiliaram minha jornada e a tornaram mais leve, fazendo de cada obstáculo uma oportunidade de crescimento. A todos vocês minha eterna gratidão.

À Dra. Edenir, que se mostrou aberta a me receber desde o primeiro e-mail de contato após o Curso de Inverno do Hospital de Câncer de Barretos. Me acolheu em seu grupo de pesquisa com todo o carinho e receptividade que um orientador poderia ter. Seus ensinamentos foram essenciais para que eu me apaixonasse cada vez mais pelo câncer hereditário, o aconselhamento genético e toda a complexidade em torno desse tema. Sua compreensão em torno das questões pessoais me fizeram entender que, às vezes, é necessário enxergarmos além do profissional.

Ao Dr. Matias e todo seu grupo de pesquisa, que sempre me auxiliou na metodologia desenvolvida ao longo do trabalho desde o desenho experimental até a execução dos experimentos. Também me ensinou sobre como é importante, em alguns momentos, pararmos para resolver nossos conflitos internos, antes de resolvermos os problemas que surgem relacionados ao trabalho.

Aos meus pais e irmão, que nunca mediram esforços para que eu tivesse o melhor ensino possível, me proporcionaram a oportunidade de estudar e me aperfeiçoar, sem cobranças. Sempre me apoiaram em minhas decisões, entenderam minhas ausências e foram os maiores e melhores exemplos que tive.

Ao Hospital de Câncer de Barretos, pela oportunidade de desenvolver minha pesquisa com os melhores equipamentos e condições que um Centro de Pesquisa poderia oferecer.

Aos amigos da linha de pesquisa em Câncer Hereditário, que por esse tempo foram minha segunda família, sempre me amparando e fazendo com que nosso conhecimento fosse desenvolvido em conjunto. Vocês são sensacionais!

À Dra. Renata, ao Dr. Renato, Dra. Viviane, Cíntia e Ma. Marcela, por toda ajuda na condução dos experimentos, na discussão de protocolos e resultados. Vocês foram parte essencial do meu trabalho.

À Natália, Rebeca e Paula, por todo apoio emocional nos momentos em que os obstáculos pareceram maiores do que as conquistas. Vocês tiveram grande importância

emocional e foram o apoio nos dias em que a desistência passou pela minha cabeça. Obrigada por existirem!

Ao Victor, por toda compreensão e apoio durante minha caminhada. Por estar comigo nos momentos de conquista e nas dificuldades. Por me fazer esquecer das experiências ruins e ressaltar o lado bom de tudo. Por se orgulhar e me fazer enxergar o quanto meu trabalho é importante, fazendo com que eu me orgulhasse dele também.

Por fim, mas não menos importante, aos amigos do CPOM, com os quais chorei toda vez que algo não saia como planejei, mas que também sorri a cada pequena vitória. Vocês se tornaram mais que amigos, os considero uma grande família, com a qual sei que posso contar em qualquer momento.



"Uma mente necessita de livros da mesma forma que uma espada necessita de uma pedra de amolar, se quisermos que se mantenha afiada".

**George R. R. Martin, Tyrion Lannister em Game of Thrones.**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Câncer de mama .....	1
1.2. Câncer de mama hereditário .....	2
1.3. Genes de alto risco para Câncer de mama hereditário .....	3
1.4. <i>PALB2</i> .....	5
1.4.1. Diretrizes do <i>National Comprehensive Cancer Network</i> (NCCN) e <i>PALB2</i> .....	9
1.5. Variantes com significado clínico desconhecido (VUS) .....	10
1.6. Ensaio funcionais para variantes em genes de predisposição ao câncer .....	11
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>13</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
3.1. Objetivo Principal .....	14
3.2. Objetivos específicos .....	14
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>15</b>
4.1. Delineamento do estudo .....	15
4.2. Variantes selecionadas .....	15
4.3. Linhagens celulares tumorais estabelecidas .....	18
4.4. Análise da autenticidade das linhagens celulares por quimerismo .....	18
4.5. Silenciamento de <i>PALB2</i> endógeno pelo sistema <i>CRISPR/Cas9</i> .....	18
4.5.1. Construção do plasmídeo .....	18
4.5.2. Confirmação da inserção dos gRNAs por Sequenciamento de Sanger .....	19
4.5.3. Transfecção do plasmídeo nas linhagens celulares .....	20
4.5.4. Confirmação de edição de linhagens por <i>Western Blot</i> anti- <i>PALB2</i> .....	21
4.5.5. Isolamento de células através de <i>Cell Sorting</i> e expansão dos clones .....	22
4.5.6. <i>Dot Blot</i> para a escolha do melhor clone <i>knockout</i> para <i>PALB2</i> .....	22
4.6. Construção de linhagens celulares com variantes de interesse no gene <i>PALB2</i> .....	23
4.6.1. Inserção das variantes L939W, F994C ou Q348* no gene <i>PALB2</i> .....	23
4.6.2. Amplificação de <i>PALB2</i> .....	24
4.6.3. Clonagem de <i>PALB2</i> no plasmídeo de expressão .....	24

4.7. Transfecção do pCI-neo com variantes nas linhagens <i>knockout</i> para <i>PALB2</i> .....	26
4.8. Confirmação da inserção das variantes.....	27
4.9. Ensaio funcionais.....	27
4.9.1. Análise de proliferação celular por BrdU.....	27
4.9.2 Análise de proliferação indireta e viabilidade Celular por MTS .....	28
4.9.3. Análise de apoptose por citometria de fluxo .....	28
4.9.4. Ensaio Clonogênico .....	29
4.9.5. Ensaio de reparo por recombinação homóloga .....	30
4.9.5.1. Ensaio de recombinação homóloga através da transfecção dos plamídeos pDR.GFP e pCBAScel nas linhagens construídas .....	30
4.9.5.2. Ensaio de recombinação homóloga através da superexpressão das variantes de interesse em células T47D e HS578T contendo o plasmídeo pDRGFP estável.....	31
4.10. Análise Estatística .....	32
<b>5. ASPECTOS ÉTICOS .....</b>	<b>33</b>
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
6.1. Edição gênica das linhagens T47D e HS578T.....	34
6.1.1. Construção do plasmídeo com o sistema <i>CRISPR/Cas9</i> .....	34
6.1.2. Deleção de <i>PALB2</i> endógeno .....	35
6.1.3. Inserção das variantes em <i>PALB2</i> .....	40
6.2. Ensaio Funcionais .....	43
6.2.1. Proliferação celular .....	43
6.2.2. Proliferação indireta e viabilidade celular .....	44
6.2.3. Análise de morte celular por citometria de fluxo.....	45
6.2.4. Análise de capacidade de formação de colônias.....	51
6.2.5. Capacidade de realizar reparo de danos ao DNA através da recombinação homóloga .....	54
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>57</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>65</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018, no Brasil, em mulheres, exceto pele não melanoma. Adaptada de INCA, 2017. ....	1
<b>FIGURA 2.</b> Reparo de dano de quebra de dupla fita do DNA pela via de recombinação homóloga.....	6
<b>FIGURA 3.</b> Variantes presentes em <i>PALB2</i> encontradas em pacientes com câncer de mama .9	
<b>FIGURA 4.</b> Fluxograma do delineamento geral do estudo.....	15
<b>FIGURA 5.</b> Eletroferograma do sequenciamento <i>forward</i> do plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) V2.0 .....	34
<b>FIGURA 6.</b> <i>Western Blot</i> para avaliar a expressão de PALB2 (~131 kDa) pela linhagem T47D depois da edição utilizando o sistema <i>CRISPR/Cas9</i> .....	35
<b>FIGURA 7.</b> Expressão da proteína PALB2 no clones isolados por <i>Single Cell Sorting</i> e <i>knockdown</i> para <i>PALB2</i> na linhagem T47D. ....	36
<b>FIGURA 8.</b> <i>Western Blot</i> para avaliar a expressão de PALB2 (~131 kDa) nos clones isolados por <i>Single Cell Sorting</i> da linhagem T47D dentre aqueles que apresentaram redução de expressão de PALB2 na primeira avaliação .....	37
<b>FIGURA 9.</b> <i>Western Blot</i> para avaliar a expressão de PALB2 (~131 kDa) pelas linhagens T47D e HS578T depois da edição utilizando o sistema <i>CRISPR/Cas9</i> .....	38
<b>FIGURA 10.</b> Expressão da proteína PALB2 no clones isolados por <i>Single Cell Sorting</i> e <i>knockdown</i> para <i>PALB2</i> na linhagem HS578T .....	39
<b>FIGURA 11.</b> <i>Western Blot</i> para avaliar a expressão de PALB2 (~131 kDa) nos clones isolados por <i>Single Cell Sorting</i> da linhagem HS578T dentre aqueles que apresentaram redução de expressão de PALB2 na primeira avaliação. ....	40
<b>FIGURA 12.</b> Eletroferograma do plasmídeo pDEST-FRT/TO-FLAG-PALB2 com a inserção da variante L939W por mutagênese sítio dirigida .....	41
<b>FIGURA 13.</b> Eletroferograma do plasmídeo pDEST-FRT/TO-FLAG-PALB2 com a inserção da variante F994C por mutagênese sítio dirigida.....	41
<b>FIGURA 14.</b> Eletroferograma do plasmídeo pDEST-FRT/TO-FLAG-PALB2 com a inserção da variante Q348* por mutagênese sítio dirigida.....	42
<b>FIGURA 15.</b> Gel de eletroforese para rastreio do plasmídeo pCI-neo com <i>PALB2</i> com ou sem variantes .....	42

<b>FIGURA 16.</b> Proliferação celular no tempo de 24 horas através da incorporação de BrdU ao DNA.....	43
<b>FIGURA 17.</b> Viabilidade celular nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas através do metabolismo do MTS.....	45
<b>FIGURA 18.</b> Avaliação de morte celular por apoptose em células derivadas da linhagem T47D não irradiadas ou irradiadas no tempo de 96 horas. ....	47
<b>FIGURA 19.</b> Comparação da porcentagem de morte celular por apoptose em células derivadas da linhagem T47D não irradiadas (cinza claro) ou irradiadas (cinza escuro) no tempo de 96 horas. ....	48
<b>FIGURA 20.</b> Avaliação de morte celular por apoptose em células derivadas da linhagem HS578T não irradiadas ou irradiadas no tempo de 96 horas.....	50
<b>FIGURA 21.</b> Comparação da porcentagem de morte celular por apoptose em células derivadas da linhagem HS578T não irradiadas (cinza claro) ou irradiadas (cinza escuro) no tempo de 96 horas. ....	51
<b>FIGURA 22.</b> Capacidade de formação de colônias das linhagens com <i>PALB2</i> editado através da contagem do número de colônias existentes .....	53
<b>FIGURA 23.</b> Capacidade de formação de colônias das linhagens com <i>PALB2</i> editado através da leitura da absorbância.. ....	54
<b>FIGURA 24.</b> Capacidade relativa de realizar reparo de danos do DNA por recombinação homóloga.....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.</b> Classificação das variantes segundo bancos de dados doença-específicos .....	16
<b>TABELA 2.</b> Frequência alélica das variantes em banco de dados populacionais (%).....	17
<b>TABELA 3.</b> Predições <i>in silico</i> para as variantes de interesse do estudo em diferentes ferramentas .....	17
<b>TABELA 4.</b> Sequências dos <i>primers</i> utilizados para a realização da mutagênese-sítio-dirigida em <i>PALB2</i> .....	23
<b>TABELA 5.</b> <i>Primers</i> utilizados para a amplificação e sequenciamento do DNA das diferentes linhagens para a confirmação da inserção das variantes de interesse.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD	7-amino actiomicina <i>D</i>
ACMG	Faculdade Americana de Genética e Genômica Médica (do inglês <i>American College of Medical Genetics and Genomics</i> )
ADP	Difosfato de adenosina
AMP	Associação para patologia molecular (do inglês <i>Association for Molecular Pathology</i> )
BRCA1	Câncer de mama 1 (do inglês <i>Breast Cancer 1</i> )
BRCA2	Câncer de mama 2 (do inglês <i>Breast Cancer 2</i> )
C	<i>Celsius</i>
CDH1	Caderina 1 (do inglês <i>Cadherin 1</i> )
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
Cys	Cisteína
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
CMV	Citomegalovirus (do latim <i>Cytomegalovirus</i> )
CO <sub>2</sub>	Gás Carbônico
CRISPR	Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas (do inglês <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> )
CRISPR/Cas9	CRISPR associado ao sistema Cas 9 (do inglês <i>CRISPR associated system 9</i> )
del	Deleção
DMEM	Meio de cultura celular (do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
DPBS	Tampão fosfato salino (do inglês <i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> )
DSB	Quebra de dupla fita (do inglês <i>Double Strand Break</i> )
<i>E. coli</i>	do latim <i>Escherichia coli</i>
ECL	Revelador de quimioluminescência (do inglês <i>Enhanced Chemiluminescence</i> )
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )

EGFP	Proteína verde fluorescente otimizada (do inglês <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> )
ENIGMA	Rede de interpretação de alelos mutados germinativos baseada em evidência (do inglês <i>Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles</i> )
F	Farad
F994C	p.Phe994Cys
FANCN	Anemia fanconi presente no grupo N
FLOSSIES	Senhoras fabulosas com mais de 70 anos (do inglês <i>Fabulous Ladies Over Seventy</i> )
GC-HBOC	Consórcio Alemão para câncer de mama e ovário hereditário (do inglês <i>German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer</i> )
GFP	Proteína verde fluorescente (do inglês <i>Green Fluorescent Protein</i> )
Gln	Glutamina
GLOBOCAN	Observatório de câncer global (do inglês <i>Global Cancer Observatory</i> )
gRNA	RNA guia
Gy	<i>Gray</i>
HBOC	Síndrome de câncer de mama e ovário hereditários (do inglês <i>Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome</i> )
HCL	Ácido Clorídrico
HGMD	Banco de dados de mutações gênicas humanas (do inglês <i>The Human Gene Mutation Database</i> )
HSF	Localizador de <i>splicing</i> humano (do inglês <i>Human Splicing Finder</i> )
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IgG	Imunoglobulina G
ins	Inserção
IR	Irrelevante
kDa	QuiloDaltons
KO	Depletado (do inglês <i>Knockout</i> )
L939W	p.Leu939Trp
LB	Luria-Bertani
Leu	Leucina



LOH	Perda de heterozigose (do inglês <i>Loss of Heterozygosis</i> )
M	Molar
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
ms	Milisegundos
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenilo)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
N	Equivalente à molar
NCCN	Rede Nacional Integrativa do Câncer (do inglês <i>National Comprehensive Cancer Network</i> )
NES	Sequência de exportação nuclear (do inglês <i>Nuclear Export Sequence</i> )
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
OD	<i>Odds ratio</i>
PALB2	Parceiro e localizador de BRCA2 do inglês ( <i>Partner and localizer of BRCA2</i> )
PARP	Polimerase de ribose poli ADP (do inglês <i>Poly ADP-ribose polymerase</i> )
PCR	Síntese de reação em cadeia (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PE	Ficoeritrina (do inglês <i>Phycoerythrin</i> )
Phe	Fenilalanina
piBRCA2	<i>Piccolo</i> BRCA2
PS	Penicilina/Estreptomicina (do inglês <i>Penicillin/Streptomycin</i> )
PHTS	Síndrome do tumor de Hamartoma de PTEN (do inglês <i>PTEN hamartoma tumour syndrome</i> )
PNK	Polinucleotídeo quinase do 5'-hidroxil (do inglês <i>Polynucleotide 5'-hydroxyl-kinase</i> )
PROVEAN	Analizador de efeito de variação proteica (do inglês <i>Protein Variation Effect Analyzer</i> )
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina (do inglês <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i> )
pX459	pSpCas9(BB)-2A-Puro

Q348*	p.Gln348*
RAD51C	Parálogo de RAD51 (do inglês <i>RAD51 Paralog C</i> )
RH/HR	Recombinação Homóloga (do inglês <i>Homologous recombination</i> )
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic acid</i> )
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SDS-PAGE	Dodecil Sulfato de Sódio - Gel de Acrilamida para Eletroforese do inglês ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
SIFT	Transformação de parâmetros de escala invariante (do inglês <i>Scale-Invariant Feature Transform</i> )
SLF	Síndrome de Li-Fraumeni
SOC	Meio de cultura otimizado com repressão catabólica (do inglês <i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i> )
STK11	Serina/Treonina Quinase 11 (do inglês <i>Serine/Trreonine Kinase 11</i> )
STR	Repetições curtas em tandem (do inglês <i>Short Tandem Repeat</i> )
TBS-T	Tampão Tris com Tween 20 (do inglês <i>Tris-Buffered Saline com Tween 20</i> )
Ter	Tercina
TMB	3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TP53	Poteína tumoral p53 (do inglês <i>Tumor Protein p53</i> )
Trp	Triptofano
USA	Estados Unidos da América (do inglês <i>United States of America</i> )
V	Volts
VUS	Variante de significado clínico desconhecido (do inglês <i>Variant of Uncertain Significance</i> )
WT	Selvagem (do inglês <i>Wild-type</i> )
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar

## LISTA DE SÍMBOLOS

()	Parenteses
/	Barra
~	Til. Nesta dissertação: Aproximadamente
*	Asterisco. Nesta dissertação: <i>Stop codon</i>
%	Porcentagem
—	<i>Underline</i>
:	Dois pontos. Nesta dissertação: razão
"	Aspas
-	Hífen
#	<i>Hashtag</i>
<	Menor
>	Maior. Nesta dissertação: "mudança para"
°	Grau
®	Registrado
μ	<i>Mi</i>
™	<i>Trade Mark</i>
x	Multiplicação
10 <sup>6</sup>	Elevado à sexta potência
10 <sup>5</sup>	Elevado à quinta potência
10 <sup>4</sup>	Elevado à quarta potência
α	<i>Alpha</i>
γ	<i>Gamma</i>
+	Soma

## RESUMO

**Justificativa:** Recentemente *PALB2* foi adicionado ao grupo de genes de alto risco para predisposição ao câncer de mama hereditário, fazendo com que ele tenha uma importância maior neste cenário. Quando são encontradas variantes em genes de predisposição ao câncer hereditário, há um grande desafio em relação àquelas que são classificadas como variantes de significado clínico desconhecido (VUS), uma vez que pacientes cujo teste genético identifica esse tipo de variante tem seu manejo clínico dificultado. Diante disso, seria muito importante, do ponto de vista de prevenção e rastreamento se todas as VUS pudessem ser classificadas como patogênicas ou benignas. **Objetivos:** Determinar o papel de duas variantes de significado clínico desconhecido no gene *PALB2* em processos biológicos como proliferação, viabilidade, apoptose, formação de colônias e capacidade de realizar a recombinação homóloga (RH), através de ensaios funcionais com duas linhagens celulares de câncer de mama (T47D e HS578T). **Material e Métodos:** Foi realizada edição gênica (deleção) do gene *PALB2* através do sistema *CRISPR/Cas9*. As linhagens foram transfectadas com um plasmídeo para expressão das variantes L939W e F994C, escolhidas para o estudo, e Q348\* (controle positivo). Após o estabelecimento das linhagens com *PALB2* reconstituído com ou sem variantes, foram realizados os ensaios de proliferação (BrdU), viabilidade celular (MTS), clonogênico (formação de colônias), apoptose (citometria de fluxo) e reparo através da recombinação homóloga (citometria de fluxo). **Resultados:** Para as linhagens derivadas de HS578T, aquelas que expressam as variantes (L939W, F994C e Q348\*) em *PALB2* demonstraram aumento na proliferação em comparação à WT. Para as linhagens derivadas de T47D, aquela com a variante L939W demonstrou menor capacidade de formação de colônias, enquanto com a variante F994C aumentou a capacidade de formar colônias quando comparadas à WT. Para as linhagens derivadas da T47D, quando irradiadas, a *wild type* (WT) apresentou menor porcentagem de células viáveis e maior porcentagem de células em apoptose inicial, em comparação às demais linhagens. Além disso, todas as linhagens, incluindo as derivadas da HS578T, demonstraram maiores porcentagens de células em apoptose e menor porcentagem de células viáveis quando irradiadas em comparação às mesmas linhagens não irradiadas. Por fim, a variante L939W demonstrou ineficiência no reparo por recombinação homóloga, principal função desempenhada por *PALB2*. **Conclusões:** Aparentemente, a variante L939W possui um comportamento

semelhante à variante Q348\*, como proliferação aumentada e a deficiência no reparo por RH. No entanto, são necessários mais estudos para que essa variante possa ser classificada como provavelmente patogênica ou patogênica.

**Palavras-chave:** Câncer de mama hereditário; PALB2; variantes de significado clínico desconhecido; genes de predisposição ao câncer de mama; ensaios funcionais; edição gênica.

## **ABSTRACT**

**Background:** Recently PALB2 has been added to the group of high risk genes for predisposition to hereditary breast cancer, making it of greater importance in this scenario. When variants are found in predisposition genes to hereditary cancer, there is a great challenge in relation to those that are classified as variants of uncertain significance (VUS), because patients whose genetic test identifies this type of variant has its clinical management made difficult. Given this, it would be very important, from the point of view of prevention and screening, if all VUS could be classified as pathogenic or benign. **Aims:** To determine the role of two VUS the *PALB2* gene in biological processes such as proliferation, viability, apoptosis, colony formation and ability to repair the damage DNA by homologous recombination (HR) through functional assays with two cell lines (T47D and HS578T).

**Material and Methods:** Genetic editing (deletion) of the *PALB2* gene was performed through the CRISPR / Cas9 system. The cell lines were transfected with a plasmid for expression of the variants L939W and F994C, chosen for the study, and Q348\* (positive control). After the establishment of cell lines with *PALB2* reconstituted with or without variants, proliferation (BrdU), cell viability (MTS), clonogenic (colony formation), apoptosis (flow cytometry) and DNA damage repair by HR (flow cytometry) were performed. **Results:** For HS578T-derived cell lines, those expressing the variants (L939W, F994C and Q348\*) in *PALB2* demonstrated increased proliferation compared to WT. For the cell lines derived from T47D, the one with the L939W variant showed less ability to form colonies, while with the variant F994C it increased the ability to form colonies when compared to WT. When the T47D-derived cell lines were irradiated, the wild-type (WT) cell line presented a lower percentage of viable cells and a higher percentage of cells in initial apoptosis, when compared to the other cell lines. In addition, all cell lines, including those derived from HS578T, showed higher

percentages of cells in apoptosis and lower percentage of viable cells when irradiated compared to the same non-irradiated cell lines. Finally, the L939W variant demonstrated deficiency in DNA damage repair by HR, the main function performed by PALB2.

**Conclusions:** Apparently, the L939W variant exhibits similar behavior to the Q348\* variant, such as increased proliferation and deficiency in HR. However, further studies are needed so that this variant can be classified as probably pathogenic or pathogenic.

**Keywords:** Hereditary breast cancer; PALB2; variants of uncertain significance; breast cancer predisposition genes; functional analysis; gene edition .

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Câncer de mama

O Câncer de mama é o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres, sendo o mais comum na América do Norte, Europa e Oceania e, juntamente com o câncer cervical, o mais diagnosticado na América Latina, Caribe, África e maior parte da Ásia. Além disso, é responsável pelo maior número de mortes de mulheres por aspectos relacionados ao câncer<sup>1</sup>.

Nos Estados Unidos, estimou-se que em 2017 ocorreriam, aproximadamente, 253 mil novos casos de câncer de mama em mulheres, representando 30% dos casos entre todos os tipos de câncer, e cerca de 71 mil casos de morte, representando 25% do total de morte por câncer entre mulheres<sup>2</sup>. No Canadá, o câncer de mama é o terceiro tipo de câncer mais comum entre todos os tipos, e o mais comum em mulheres, representando cerca de 25% dos cânceres<sup>3</sup>.

No Brasil, estima-se que para o biênio 2018-2019 tenhamos cerca de 59.700 casos/ano, representando cerca de 29% dos casos de câncer em mulheres (Figura 1). Além disso, com exceção da região norte, é o tipo de câncer mais frequente em mulheres de todas as Regiões do país, excluindo casos de câncer de pele não melanoma. Essa neoplasia apresenta uma incidência de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres, podendo chegar a um número de até 73,07 casos a cada 100 mil mulheres (região sul)<sup>4</sup>.

	Localização Primária	Casos	%
<b>Mulheres</b> 	Mama Feminina	59.700	29,5%
	Cólon e Reto	18.980	9,4%
	Colo do Útero	16.370	8,1%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
	Estômago	7.750	3,8%
	Corpo do Útero	6.600	3,3%
	Ovário	6.150	3,0%
	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
	Leucemias	4.860	2,4%

**Figura 1.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018, no Brasil, em mulheres, exceto pele não melanoma. Adaptada de INCA, 2017<sup>4</sup>.

Os fatores hormonais e reprodutivos, como a nuliparidade, primeira gestação ou menopausa tardia e menarca precoce, o uso de contraceptivos orais e utilização de terapia hormonal após a menopausa, bem como o sedentarismo, dieta, o excesso de peso e o consumo de álcool são os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama<sup>1,3,5</sup>.

A ampla gama de fatores de risco associadas ao câncer de mama juntamente com o rastreamento tardio, são apontados como as principais causas da alta incidência de câncer de mama em países desenvolvidos. Nesses países, apesar da alta incidência, observou-se a diminuição no número de mortes a partir dos anos 90, que foi atribuída ao diagnóstico precoce e ao aprimoramento do tratamento, além de mudanças nos fatores hormonais ao longo do tempo<sup>1,3</sup>. Por outro lado, em países subdesenvolvidos, além de uma alta incidência, observamos uma alta mortalidade<sup>1</sup>. Corroborando com esses dados, para o ano de 2018, o GLOBOCAN estima que tanto para os países com maior índice de desenvolvimento humano (IDH) quanto para aqueles com menor IDH, entre as mulheres, o câncer de mama será o tipo tumoral mais incidente, sendo que nos países de menor IDH, a taxa de mortalidade será maior<sup>6</sup>.

## 1.2. Câncer de mama hereditário

Estima-se que, aproximadamente, 5-10% dos casos de câncer de mama são hereditários e se desenvolvem em indivíduos portadores de variantes germinativas patogênicas em genes de predisposição ao câncer de mama. A probabilidade desses indivíduos desenvolverem este tipo de câncer é bem maior quando comparada aos demais indivíduos da população<sup>7</sup>.

Os genes de predisposição ao câncer de mama são classificados em genes de alto, moderado e baixo risco de acordo com o risco conferido para o desenvolvimento tumoral. Dentre os genes de alto risco destacam-se os genes *Breast Cancer 1 (BRCA1)*, *Breast Cancer 2 (BRCA2)*, *Tumor Protein p53 (TP53)*, *Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN)*, *Cadherin 1 (CDH1)*, *Serine/Threonine Kinase 11 (STK11)* e, mais recentemente, o *Partner and localizer of BRCA2 (PALB2)*<sup>8</sup>. Indivíduos com variantes patogênicas nesses genes apresentam um risco aumentado de desenvolvimento de câncer, o qual geralmente ocorre em idades mais jovens que os tumores observados na população em geral. De maneira adicional, variantes em



genes de alto risco respondem por aproximadamente 25% dos casos de câncer de mama hereditário, sendo que aquelas presentes em *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis por 90% dos casos dentro deste grupo<sup>7</sup>.

Quando identificados, indivíduos que apresentam perfil de risco para câncer de mama hereditário devem ser encaminhados para o aconselhamento genético, visto que o risco desses indivíduos desenvolverem câncer é bem maior do que o do restante da população. Adicionalmente, seus familiares podem apresentar risco aumentado, dado se tratar, na grande maioria dos casos, de uma predisposição genética com padrão de herança autossômico dominante, ou seja, familiares apresentam um risco de 50% de herdar a variante segregando na família. Neste sentido, é interessante que haja a possibilidade de um rastreamento mais eficaz, que seja adequado ao tipo de gene ou variante segregando na família, assim como de realizar medidas preventivas, como cirurgias e outros métodos profiláticos<sup>9</sup>.

### **1.3. Genes de alto risco para câncer de mama hereditário**

Sabe-se que alguns genes de predisposição conferem um risco aumentado ao câncer de mama e, portanto, o conhecimento sobre a patogenia de suas variantes é de grande interesse clínico. Os genes destacados a seguir são considerados de alto risco para o câncer de mama.

Dentre os genes sabidamente envolvidos no câncer de mama hereditário, os mais conhecidos e importantes são os genes *BRCA1* e *BRCA2*. Apesar de não serem genes parálogos, eles possuem certa similaridade em suas funções. São genes supressores de tumor, envolvidos em uma série de processos celulares, como o controle da integridade genômica, a diferenciação e o crescimento celular. Além disso, participam ativamente no reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga, na embriogênese e na regulação da expressão gênica. Interagem com diversas proteínas, incluindo aquelas envolvidas na recombinação homóloga cromossômica<sup>10</sup>.

Mulheres portadoras de variantes germinativas nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* possuem um risco cumulativo de 72% e 69%, respectivamente, para desenvolver câncer de mama até os 80 anos de idade e, um risco de 44% e 17% para câncer de ovário<sup>11</sup>. Embora existam outros tumores, além de mama e ovário, associados à presença de mutações germinativas

nesses genes, ambos são conhecidos por causar a *Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome* (HBOC). Variantes nesses genes são encontradas, predominantemente, em mulheres jovens com muitos casos de câncer de mama ou ovário na família<sup>7</sup>. Nessa perspectiva, variantes em *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis pelo desenvolvimento de 3 a 6% de todos os casos de câncer de mama, apresentando diferenças em suas frequências pelo mundo<sup>7,12</sup>. A mais alta prevalência é encontrada na população feminina judia Ashkenazi (2,5%), caracterizada pela frequência elevada de três variantes fundadoras: c.68\_69del e c.5266dupC no gene *BRCA1* e c.5946del em *BRCA2*<sup>13</sup>.

O gene supressor tumoral *TP53* quando mutado (variantes germinativas), leva ao desenvolvimento da Síndrome de Li-Fraumeni (SLF), uma condição autossômica dominante com alta penetrância, que predispõe a vários tipos de câncer, principalmente em idade jovem, dentre eles: osteossarcoma, sarcomas de partes moles, carcinoma adrenocortical, tumores do sistema nervoso central, leucemia e câncer de mama pré-menopáusico<sup>14-16</sup>. Para mulheres, o tipo tumoral mais diagnosticado é o câncer de mama, e o risco cumulativo para o desenvolvimento de qualquer tumor da SLF até os 31 anos é de 50%, enquanto para homens, encontramos essa mesma taxa aos 46 anos. Quando observamos o risco cumulativo para tumores primários até a idade de 70 anos em ambos os sexos, encontramos uma porcentagem próxima a 100%<sup>17</sup>. A proteína codificada pelo gene *TP53* é ativada quando afetada por algum estresse celular e atua no reparo de danos ao DNA e na regulação do ciclo celular, suprimindo a transformação e proliferação celular, além de mediar a apoptose<sup>18</sup>.

O gene *PTEN* é um gene supressor tumoral que atua no controle da proliferação e sobrevivência celular<sup>19</sup>. Suas variantes germinativas estão relacionadas às síndromes que coletivamente são chamadas de *PTEN hamartoma tumour syndrome* (PHTS), sendo a principal delas, às vezes considerada como sinônimo, a *Cowden Syndrome* (Síndrome de Cowden)<sup>20</sup>, que é autossômica dominante. Mulheres que possuem variantes patogênicas nesse gene possuem risco cumulativo de 77% para câncer de mama até os 70 anos<sup>21</sup>. Além disso, variantes no gene *PTEN* foram associadas com outros tipos de câncer, como de tireóide, melanoma, endometrial, fígado e coloretal<sup>22</sup>.

*CDH1* é um gene responsável pela produção de E-cadherina, uma proteína de adesão célula-célula<sup>23</sup>. Variantes no gene *CDH1* respondem por cerca de 30-40% das famílias com câncer gástrico difuso hereditário (HDGC)<sup>24</sup>. Portadores de variantes patogênicas nesse gene

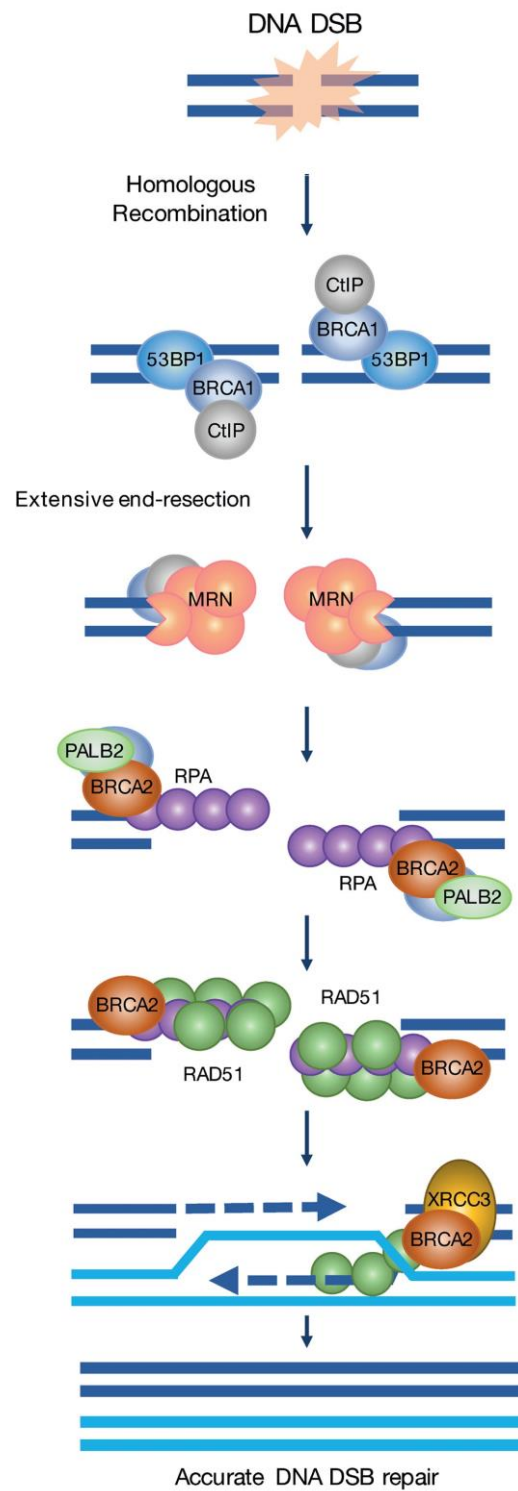
apresentam um risco cumulativo, para câncer gástrico difuso de 70% e 56% em homens e mulheres, respectivamente, até os 80 anos<sup>25</sup>. Também foi demonstrado que mulheres com variantes germinativas em *CDH1* apresentam grandes chances, ao longo da vida, de desenvolver câncer de mama, apesar de o risco para câncer gástrico ser maior. O risco cumulativo, para câncer de mama, é de 52% até os 75 anos, sendo o tipo lobular o mais frequente<sup>24</sup>.

A Síndrome de Peutz-Jeghers é uma condição autossômica dominante caracterizada pela polipose gastrointestinal e predisposição ao câncer<sup>26</sup>. Ela é causada por variantes patogênicas no gene *STK11* e pode afetar, além do intestino, a mama e o ovário. Mulheres portadoras da síndrome podem apresentar risco para câncer de mama igual ao de mulheres que possuem uma variante patogênica em *BRCA1* ou *BRCA2*<sup>26</sup>, chegando a apresentar um risco de até 50% de desenvolver câncer de mama<sup>27</sup>.

Outro gene, que vem ganhando importância no que diz respeito à predisposição ao câncer de mama, é o *PALB2*, o qual vem sendo associado a um risco moderado a alto para diversos tipos de tumores, dentre eles o câncer de mama<sup>28-29</sup>.

#### **1.4. *PALB2***

*PALB2* (OMIM #610355) é um gene que desempenha uma função quase central em uma rede de supressores tumorais, além de realizar outras funções celulares. A proteína *PALB2* está envolvida na sinalização de danos ao DNA para que, através de sua ligação com *BRCA2*, atue no reparo da quebra de fita dupla do DNA pelo mecanismo de recombinação homóloga (Figura 2)<sup>30</sup>. Além disso, atua na remodelação de histonas e na regulação das respostas ao estresse oxidativo<sup>31</sup>.



**Figura 2.** Reparo de dano de quebra de dupla fita do DNA pela via de recombinação homóloga. Figura adaptada de NESIC, K. *et al.*, 2018<sup>30</sup>.

Indivíduos portadores de variantes em homozigose no gene *PALB2* desenvolvem a anemia de fanconi. O gene está presente no grupo N da anemia fanconi e, por isso, também

é conhecido como FANCN. Nesta síndrome, os indivíduos possuem falhas no sistema de reparo ao DNA pela via da anemia fanconi, apresentando instabilidade genômica e hipersensibilidade a agentes que causam aduto no DNA<sup>32</sup>.

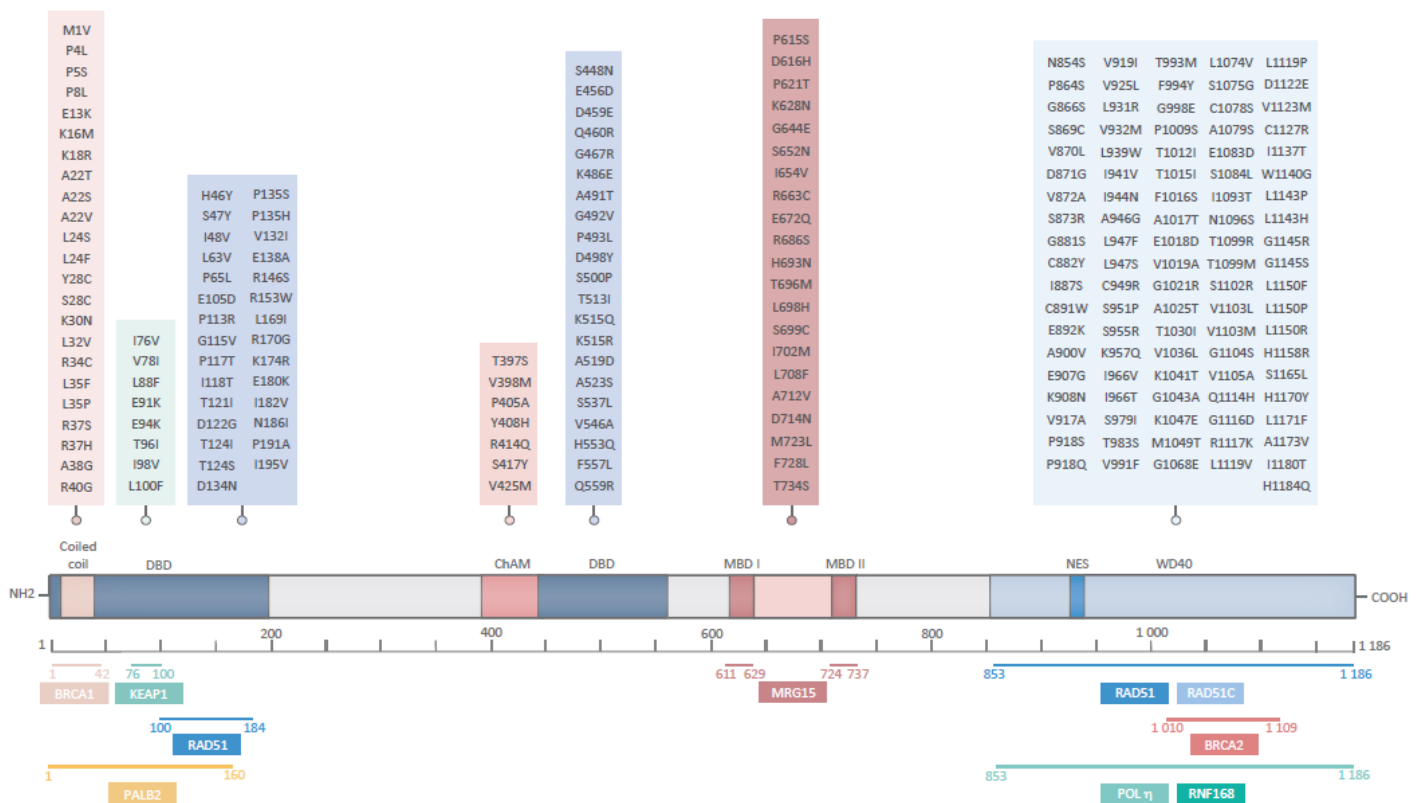
Além disso, variantes germinativas no gene *PALB2*, em heterozigose, podem estar associadas a vários tipos tumorais, como câncer de pâncreas<sup>33-39</sup>, gástrico<sup>38,40-42</sup>, próstata<sup>43</sup>, câncer de mama feminino<sup>44</sup> e masculino<sup>38,39</sup>, colorretal<sup>45</sup>, endométrio<sup>38</sup> e ovário<sup>39,46</sup>, sendo considerado até mesmo um gene Pan-Cancer<sup>40</sup>. Variantes que levam à perda de função em *PALB2* vêm sendo associadas ao câncer de mama hereditário<sup>7,28-29</sup>. Portadoras de variantes germinativas patogênicas nesse gene podem ter o risco de desenvolver esse tipo de câncer semelhante ao de quem possui variantes em *BRCA2*<sup>28</sup>.

Um estudo envolvendo mulheres portadoras de variantes patogênicas no gene *PALB2* demonstrou que aquelas que não apresentaram história familiar de câncer de mama possuíam um risco de 35% de desenvolver a doença até os 70 anos. Já em mulheres que possuíam dois familiares de primeiro grau com diagnóstico de câncer de mama até os 50 anos, o risco de desenvolver a doença até os 70 anos era de 58%<sup>28</sup>. Quando o risco cumulativo foi comparado à incidência de câncer de mama no Reino Unido entre os anos de 1993 e 1997, mulheres com variantes em *PALB2* apresentaram uma estimativa de 47,5% (IC95%, 38,6-57,4%) de chance de desenvolver a doença até os 70 anos de idade<sup>28</sup>. Adicionalmente, estudo realizado por Antoniou e colaboradores demonstrou que o risco relativo para câncer de mama, para mulheres com variantes em *PALB2*, pode chegar até 9,01 (CI95%: 5,70 - 14,16) em mulheres de 20 a 24 anos<sup>28</sup>.

Em uma coorte de 35.000 mulheres com câncer de mama, testadas para um painel gênico composto por 25 genes já associados a síndromes de predisposição hereditária, 51,5% das mulheres que apresentavam variantes patogênicas eram *BRCA1/BRCA2* WT. Em 9,3% desses casos, as variantes estavam localizadas em *PALB2*<sup>47</sup>. Outro estudo recente com aproximadamente 65.000 mulheres que realizaram teste genético para câncer hereditário, demonstrou que aquelas que possuíam variantes no gene *PALB2* apresentam alto risco para o desenvolvimento de câncer de mama (OR 7,46; IC95%, 5,12-11,19)<sup>28</sup>. Além de conferir um risco elevado para o desenvolvimento de câncer de mama em mulheres, também foi observado que homens com variantes patogênicas em *PALB2* têm o risco significativamente aumentado para esse tipo de câncer (OR 6,6,  $p < 0,01$ )<sup>48</sup>.

Diante da importância de *PALB2* na predisposição hereditária ao câncer de mama, é de suma importância que possamos avaliar o efeito de variantes que possam ser identificadas nesse gene, além dos riscos associados a elas. Ducey e colaboradores (2019) realizaram um mapeamento de variantes *missense* em *PALB2* encontradas em mulheres com câncer de mama e observou-se que muitas delas estavam presentes em domínios de interação com outras proteínas, que são importantes para que *PALB2* realize suas funções celulares (Figura 3)<sup>49</sup>. De forma a avaliar o efeito biológico de variantes presentes em domínios funcionais de *PALB2*, Foo e colaboradores (2017) conseguiram, através de ensaios funcionais, determinar que a variante c.104T>C em *PALB2* faz com que a ligação *PALB2*-*BRCA1* seja comprometida e as células não sejam capazes de reparar o dano ao DNA através da recombinação homóloga, demonstrando que a ligação com *BRCA1*, assim como com *BRCA2*, parece ser fundamental para que a RH aconteça<sup>50</sup>. Além disso, mulheres com variantes germinativas patogênicas em *PALB2* apresentam, no tecido tumoral, uma segunda inativação no gene<sup>51</sup>, corroborando com o que se conhece acerca do comportamento dos genes supressores tumorais sugerido por Knudson<sup>52</sup>. Nesse modelo, indivíduos que possuem variantes germinativas possuem um dos alelos não funcional e, portanto, apresentam um "hit", sofreriam o segundo "hit" somaticamente e perderiam sua heterozigose, tornando o gene inativo<sup>52</sup>. Esse fenômeno é conhecido como perda de heterozigose ou LOH (*loss of heterozygosis*). Conforme Buisson e colaboradores (2010), em todos os casos em que *PALB2* sofria inativação bialélica, o sistema de reparo por recombinação homóloga apresentava uma grande deficiência<sup>53</sup>.

De maneira adicional, estudos *in vitro* já demonstraram que células com perda de função em *PALB2* apresentam hipersensibilidade ao tratamento com inibidores de *Poly ADP-ribose polymerase* (PARP)<sup>54,55</sup>, se comportando de forma semelhante às células com variantes em *BRCA*<sup>40</sup>, e apresentaram regressão de tumor *in vivo*, em modelos xenográficos, com doses únicas de Mitomicina C<sup>54</sup>.



**Figura 3.** Variantes presentes em *PALB2* encontradas em pacientes com câncer de mama. DUCY et al., 2019<sup>49</sup>.

#### 1.4.1. Diretrizes do National Comprehensive Cancer Network (NCCN) e *PALB2*

Em 2016 o gene passou a integrar a lista de genes que possuem intervenções nos *guidelines* do National Comprehensive Cancer Network (NCCN)<sup>56</sup>, e passou a ter um manejo clínico-cirúrgico estabelecido para os pacientes/familiares com o gene mutado. Na versão 2019 do NCCN<sup>57</sup>, o recomendado para indivíduos que, de acordo com o teste genético, apresentam variantes germinativas patogênicas nesse gene, é a realização do rastreamento mamográfico anual, iniciando-se aos 30 anos de idade. Além disso, pode ser considerado o uso de mamografia e ressonância magnética da mama, de acordo com a história pessoal e a história familiar apresentada. Em casos onde há evidência suficiente de risco aumentado para câncer de mama, baseando-se na história familiar, pode-se considerar a mastectomia para redução de risco<sup>57</sup>, embora não haja dados na literatura que apontem para benefícios nessa abordagem em mulheres com variante em *PALB2*<sup>58</sup>. Para outros tipos de câncer não há, até o presente momento, recomendações de risco e manejo<sup>57</sup>.

### 1.5. Variantes com significado clínico desconhecido (VUS)

Segundo o *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) e a *Association for Molecular Pathology* (AMP), as variantes gênicas germinativas podem ser classificadas em cinco categorias diferentes: patogênica, provavelmente patogênica, de significado clínico desconhecido, provavelmente benigna e benigna. Essa classificação se dá através da análise de evidências em bancos de dados populacionais, bancos doença-específicos, ferramentas de predições *in silico* ou de acordo com a literatura existente, seguindo uma série de critérios<sup>59</sup>.

Dizemos que uma variante possui significado clínico desconhecido (*variant of uncertain significance* - VUS) quando não se sabe se a proteína resultante de um gene que apresenta essa variante tem sua função alterada e, conseqüentemente se apresentará ou não algum impacto clínico<sup>60</sup>. Quando uma variante é classificada como VUS, os testes genéticos realizados em indivíduos e/ou famílias que a possuem têm seu resultado e, posteriormente, definição de condutas de tratamento ou prevenção dificultados, uma vez que as decisões são tomadas com base no impacto clínico que a variante genética identificada possui<sup>60-62</sup>.

Na tentativa de conhecer melhor as variantes classificadas como VUS, foi criado o *Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles* (ENIGMA). O ENIGMA é um consórcio que tem como principal objetivo avaliar o significado clínico das variantes dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, assim como nos demais genes classificados como de alto risco para câncer de mama. Além disso, é responsável por desenvolver modelos de interpretação e análise dessas variantes que permitam uma melhor definição das condutas clínicas a serem seguidas<sup>63</sup>.

Seria muito importante, do ponto de vista de prevenção e rastreamento, se todas as VUS pudessem ser classificadas como patogênicas ou benignas. Isso aliviaria o pesado fardo da dúvida para o paciente e seus familiares. A indefinição da patogenicidade pode induzir uma mulher a uma cirurgia para retirada das mamas e ovários de modo inapropriado, enquanto outro paciente pode não receber informação sobre o alto risco que pode carregar consigo. Mesmo com a utilização de vários métodos estatísticos e probabilísticos para determinar a patogenicidade, é muito difícil demonstrar definitivamente se uma variante específica é causal ou não. Nesse sentido, a realização de análises funcionais traz



contribuições de grande importância para a caracterização dos efeitos de uma determinada variante no gene em que ela se encontra.

### **1.6. Ensaios funcionais para variantes em genes de predisposição ao câncer**

A realização de ensaios funcionais robustos e bem desenhados pode representar uma poderosa ferramenta para classificar variantes conforme o seu impacto biológico e clínico. Através deste tipo de estudo é possível avaliar se genes com variantes presentes em domínios importantes para sua função, podem ter sua interação com outras proteínas prejudicadas e, conseqüentemente, se essas modificações afetam a via da qual fazem parte<sup>50,64</sup>.

Desta forma, é essencial que ensaios funcionais sejam realizados para que se possa avaliar essa capacidade das proteínas resultantes em realizar suas principais atividades<sup>65</sup>. Com este tipo de avaliação foi possível, por exemplo, estabelecer que variantes localizadas próximas a uma sequência de exportação nuclear (NES) localizada no domínio WD40 de *PALB2*, podem fazer com que esta seja exposta<sup>64</sup>. Quando isso acontece, a proteína de exportação CRM1 reconhece esta sequência e encaminha a proteína resultando de *PALB2* com a variante para o citoplasma, fazendo com que suas interações proteicas e, conseqüentemente, suas funções, sejam prejudicadas<sup>64</sup>. Outro foi capaz de demonstrar que a variante L35P, presente em *PALB2*, comprometia a ligação entre BRCA1 e *PALB2*, resultando na não realização do reparo por recombinação homóloga<sup>50</sup>.

Os ensaios funcionais também são importantes para a classificação de variantes. É comum que aquelas variantes encontradas pela primeira vez em uma população sejam primariamente classificadas por ferramentas de predição *in silico*. No entanto, um estudo realizado com um banco de dados alemão (GC-HBOC), com informações que pertenciam a mulheres que possuem HBOC demonstrou que, quando eram comparados os resultados de três dessas ferramentas de predição *in silico* (SIFT, *Mutation Taster 2* e *PolyPhen 2*) com resultados de análises funcionais, as variantes demonstravam grande discrepância em relação à sua classificação. Entre as variantes encontradas, 25% foram classificadas como patogênicas pelas ferramentas, enquanto nos estudos funcionais, apenas 13,2% receberam essa classificação. Ao considerar apenas variantes *missense*, 55,9% foram discordantes entre os dois métodos<sup>66</sup>. Ainda neste estudo, os autores discutem que, levando em conta a

classificação das ferramentas de predição *in silico*, sem que outros parâmetros fossem analisados, cerca de 76,5% das pacientes teriam recebido um resultado falso positivo, ou seja, as variantes teriam sido classificadas em uma categoria de risco maior do que realmente apresentavam (5 foram classificadas como patogênicas e 16 como VUS, enquanto eram benignas, e 4 patogênicas enquanto eram VUS)<sup>66</sup>.

Por fim, esses estudos também são utilizados para que possamos estabelecer a responsividade à farmacos e, assim, possamos definir quais pacientes e quais tumores podem se beneficiar ou responder a quais tipos de tratamentos<sup>65,53-55</sup>.

## 2. JUSTIFICATIVA

No contexto do câncer hereditário, os testes genéticos são indicados, principalmente, para indivíduos que apresentam história familiar de câncer, para que haja uma avaliação do risco para a doença através da investigação da presença de alterações em genes que conferem predisposição ao desenvolvimento do câncer. Portanto, quando uma variante identificada é classificada como de significado clínico desconhecido, esse processo de avaliação de risco é dificultado, uma vez que não se sabe se a alteração encontrada é patogênica e, conseqüentemente, se traz aumento de risco para o desenvolvimento de câncer. Além disso, gera-se um certo estresse para a família, já que os resultados não implicarão em uma resposta capaz de ajudar na tomada de decisões a respeito do manejo clínico e, tampouco permitirão uma tranquilidade da família acerca do risco conferido por tal variante.

Diante disso, se faz necessária a realização de estudos que possibilitem um maior conhecimento sobre as conseqüências biológicas dessas variantes. Para isso, os ensaios funcionais constituem ótimas ferramentas, uma vez que permitem analisar o impacto da presença de variantes de significado clínico desconhecido na função biológica desses genes e, assim, auxiliam na definição de seu impacto clínico.

Dessa maneira a presente proposta pretende auxiliar na definição do significado biológico de duas variantes de significado clínico desconhecido no gene *PALB2*, que recentemente foi categorizado como sendo de alto risco, identificadas em famílias de alto risco para câncer de mama hereditário, testadas junto ao Centro de Diagnóstico Molecular do Hospital de Câncer de Barretos.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Principal

Determinar o impacto biológico de variantes genéticas no gene *PALB2*, identificadas em famílias de alto risco para câncer de mama hereditário.

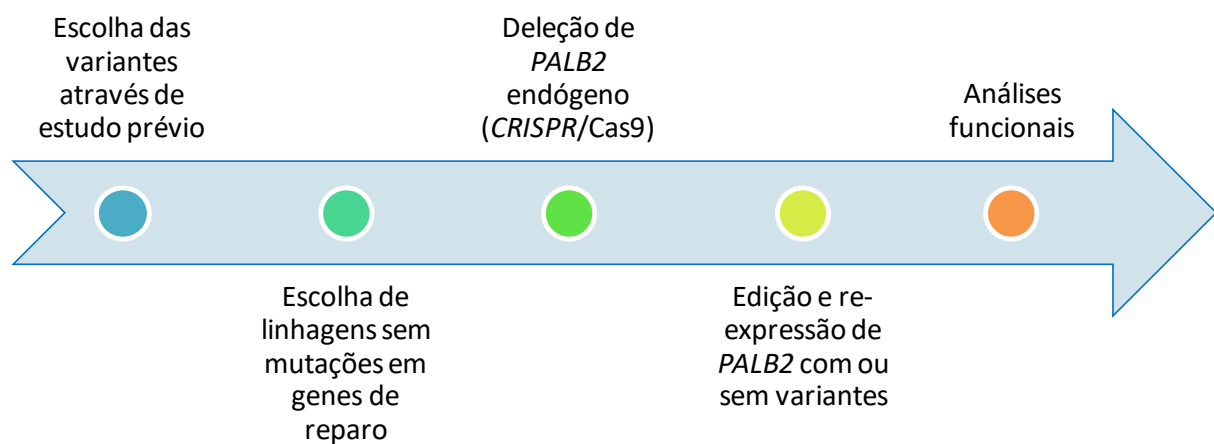
#### 3.2. Objetivos específicos

- Criar linhagens celulares *knockout* para o gene *PALB2*;
- Criar linhagens celulares de tumores de mama com variantes de significado clínico desconhecido no gene *PALB2* pela técnica de mutagênese sítio-dirigida;
- Avaliar o efeito de variantes de significado clínico desconhecido no gene *PALB2* sobre a proliferação e viabilidade celular, apoptose, capacidade de formação de colônias e reparo de danos ao DNA;
- Fornecer dados que possam auxiliar na reclassificação das variantes de significado clínico desconhecido do gene *PALB2* avaliadas, como patogênicas, provavelmente patogênicas, provavelmente benignas ou benignas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Delineamento do estudo

A Figura 4 ilustra as principais etapas do estudo, que serão detalhadas nos próximos tópicos.



**Figura 4.** Fluxograma do delineamento geral do estudo.

### 4.2. Escolha das variantes através de estudo prévio

Em um estudo preliminar do nosso grupo, foram sequenciados os exomas de 46 mulheres de alto risco para câncer de mama e ovário hereditários e negativas para variantes patogênicas nos genes *BRCA1/BRCA2*. Nesse estudo foram identificadas algumas variantes no gene *PALB2* não descritas em bancos de dados ou que apresentavam um significado clínico desconhecido. Dentre elas, cabe destacar as variantes c.2816T>G (p.Leu939Trp ou L939W), classificada como conflitante ou patogênica pelos bancos de dados doença-específicos (*ClinVar* e *Human Genome Mutation Database* - HGMD) e a variante c.2981T>G (p.Phe994Cys ou F994C), não reportada anteriormente (Tabela 1).

A paciente portadora da variante L939W foi diagnosticada com câncer de mama aos 47 anos. Foi testada para variantes germinativas em *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*, mas os resultados foram negativos. Seu pai foi diagnosticado com câncer de pâncreas aos 35 anos, no entanto, não há mais informações sobre a história familiar paterna. Com relação à história familiar materna, possui um tio diagnosticado com câncer de fígado aos 75 anos, outro tio diagnosticado com câncer de pulmão aos 70 anos e uma prima diagnosticada com câncer de

pulmão aos 32 anos. Seus avós maternos também foram diagnosticados com tumores, porém os sítios primários dos tumores eram desconhecidos.

A paciente portadora da variante F994C, foi diagnosticada com câncer de mama e dermofibrosarcoma aos 38 anos. Foi testada para variantes germinativas em *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*, mas os resultados foram negativos. Em sua história familiar paterna, possui um irmão do avô diagnosticado com câncer de estômago, que possui duas filhas com câncer de mama. Outro irmão do avô também com câncer de estômago, que possui uma filha diagnosticada com câncer de mama. Ainda outro irmão do avô com câncer de intestino, uma sobrinha do avô diagnosticada com câncer de mama, uma bisavó com câncer de ovário e um bisavô com câncer de intestino. Em nenhum dos casos citados acima obtivemos os dados da idade ao diagnóstico dos tumores. Com relação à história familiar materna, possui uma prima com câncer de sistema nervoso central diagnosticada aos 21 anos, uma irmã da avó com câncer ósseo e um irmão da avó com câncer de garganta. Além disso, possui uma sobrinha da avó com câncer de mama, que possui uma filha com câncer de ovário.

Para que as frequências alélicas das variantes fossem determinadas, fizemos a busca em bancos de dados populacionais, como o *1000 Genomes*, *Gnomad*, *Fabulous Ladies Over Seventy* (FLOSSIES) e *ABraOM*, sendo este último um banco de dados de indivíduos brasileiros (Tabela 2). Além das duas variantes de interesse do estudo, como um controle a mais, também escolhemos a variante *nonsense* c.1042C>T (p.Gln348Ter ou Q348\*), que insere um codon de parada prematuro na proteína e é classificada como patogênica ou provavelmente patogênica pelo *ClinVar* (Tabela 1).

**Tabela 1.** Classificação das variantes segundo bancos de dados doença-específicos.

Variantes	Bancos de dados doença-específicos	
	<i>ClinVar</i> *	HGMD
<b>L939W</b>	Interpretações conflitantes de patogenicidade**	Patogênica
<b>F994C</b>	Não reportada	Não reportada
<b>Q348*</b>	Patogênica/provavelmente patogênica	Não reportada

\*Última consulta ao *ClinVar* feita em 16/01/2019

\*\*5 classificações como Benigna, 6 como Provável Benigna e 6 como VUS

**Tabela 2.** Frequência alélica das variantes em bancos de dados populacionais (%)

Variantes	Bancos de dados populacionais			
	<i>1000 Genomes</i>	<i>Gnomad</i>	<i>FLOSSIES</i>	<i>ABraOM</i>
<b>L939W</b>	0,08%	0,098%	Não reportada	0,2%
<b>F994C</b>	Não reportada	Não reportada	Não reportada	Não reportada

Na sequência, essas variantes passaram por análises de predição *in silico* em diferentes ferramentas (*PolyPhen-2*, *PROVEAN*, *Mutation Assessor*, *Mutation Taster*, *Align GVGD*, *Panther*, *MutPred* e *HSF*), sendo que as duas variantes foram apontadas como provavelmente danosas ou sem consenso pelas ferramentas (Tabela 3).

**Tabela 3.** Predições *in silico* para as variantes de interesse do estudo em diferentes ferramentas.

Alteração	c.2816T>G (p.Leu939Trp ou L939W)	c.2981T>G (p.Phe994Cys ou F994C)
<b>PolyPhen-2</b>	Provavelmente danosa	Provavelmente danosa
<b>PROVEAN</b>	Deletéria	Deletéria
<b>Mutation Assessor</b>	Médio Impacto	Médio Impacto
<b>Mutation Taster</b>	Causadora de Doença	Polimorfismo
<b>Align GVGD</b>	C55	C35
<b>Panther</b>	Possivelmente danosa	Provavelmente benigna
<b>MutPred</b>	Maligna	Médio impacto
<b>HSF</b>	Alteração de <i>Splicing</i>	Sem alteração
<b>Parâmetros avaliados pelas ferramentas</b>	Sequência de aminoácidos alterada, heterozigose em TGP ou EXAC, parâmetros protéicos afetados, alteração de sítio de <i>splicing</i> , criação de sítio exônico ESS, alteração de sítio exônico ESSE, perda de hélice, ganho de cadeia, proteína transmembrânica alterada.	Estabilidade alterada, sequência de aminoácidos alterada, parâmetros protéicos afetados, alteração de sítio de <i>splicing</i> .

Portanto, a fim de determinar o significado biológico dessas duas alterações, foram criadas linhagens contendo essas variantes em *PALB2* e, na sequência, realizados ensaios funcionais de acordo com os objetivos previamente listados. De maneira adicional, foi

construída uma linhagem com a variante Q348\* (p.Gln348\*), considerada patogênica pelo *ClinVar*, para utilizarmos como controle positivo. O controle negativo foi constituído por células primariamente *knockout* para *PALB2*, que tiveram o gene re-expresso, sem nenhuma variante, através do plasmídeo pCI-neo (*Promega*). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **4.3. Seleção das linhagens celulares tumorais estabelecidas**

A escolha das linhagens celulares estabelecidas que foram utilizadas nesse trabalho baseou-se inicialmente, em uma busca na literatura de linhagens que não apresentassem alterações patogênicas em genes de reparo. O critério seguinte foi que as linhagens representassem diferentes subtipos de câncer de mama. Diante disso, e obedecendo a ambos os critérios previamente estabelecidos, as linhagens T47D, subtipo luminal<sup>67</sup>, e HS578T, subtipo triplo-negativo<sup>67</sup>, foram as escolhidas. A linhagem T47D faz parte do repositório de células do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos (adquirida e gentilmente cedida pelo Dr. Rui Reis), e a HS578T, foi gentilmente cedida pela Dra. Cláudia Aparecida Rainho, da Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho". Essas linhagens foram mantidas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup>, contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies) e 1% de *penicillin/streptomycin* (PS), em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Ao atingirem confluência, as células foram dissociadas com o auxílio de uma solução de tripsina (0,05% EDTA 0,53 mM - *TripLE Express, Life Technologies*), cultivadas e mantidas nas condições descritas anteriormente para a realização dos ensaios funcionais.

#### **4.4. Análise da autenticidade das linhagens celulares por quimerismo**

Para que a autenticidade das linhagens celulares pudesse ser confirmada, foi realizada a análise de *Short Tandem Repeat* (STR), de acordo com a *International Reference Standard for Authentication of Human Cell Lines*, usando um painel de 9 *loci* STR<sup>68</sup>.

#### **4.5. Deleção de *PALB2* endógeno pelo sistema *CRISPR/Cas9***

##### **4.5.1. Construção do plasmídeo**



Para que o gene *PALB2* endógeno não fosse expresso nas linhagens celulares do estudo, foi utilizado o plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) v2.0, que confere resistência à Ampicilina e Puromicina, que contém o sistema CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/CRISPR associated system 9*) (Addgene, USA) e confere resistência à ampicilina e puromicina. Para a deleção de *PALB2* foram utilizados dois RNA-guias (gRNA): **gRNA\_1**: 5'-CACCGTGCCCGATGGACGAGCCTCC -3' e 5'-AAACGGAGGCTCGTCCATCGGGCAC-3'; **gRNA\_2**: e 5'-CACCGTCACCGCAGCTAAAACACTC-3', 5'-AAACGAGTGTTTTAGCTGCGGTGAC -3'. O plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) v2.0 foi digerido através da enzima de restrição BbsI (*New England Biolabs, USA*) e, o produto da digestão foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose a 1%. A purificação do gel para extração de DNA foi realizada com o Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (*Promega, USA*) de acordo com o protocolo do fabricante. Paralelamente, os gRNAs construídos para *PALB2* foram anelados e fosforilados através da enzima T4 PNK (*New England Biolabs, USA*). Em seguida, com o auxílio da enzima *Quick Ligase* (*New England Biolabs, USA*) foi realizada a ligação do plasmídeo com os gRNAs.

Com o produto da ligação fez-se a transformação em bactérias *DH5alpha Competent E. coli* (*New England Biolabs, USA*), para amplificação do material genético. De maneira resumida, em 20 µL de bactéria foram acrescentados 2 µL de produto da ligação, que foram incubados por 30 minutos em gelo e submetidos a um choque térmico, que consistiu em 30 segundos a 42°C e 2 minutos em gelo. Foram acrescentados 200 µL de *SOC Outgrowth Medium* (*New England Biolabs, USA*), e as bactérias com os plasmídeos foram cultivadas a 37°C em meio ágar com ampicilina na concentração de 0,1 mg/mL. As bactérias selecionadas foram cultivadas a 37°C em meio *LB Broth* líquido com 0,1 mg/mL de ampicilina por aproximadamente 16 horas. Posterior à seleção, o DNA plasmidial das bactérias foi extraído com o auxílio do kit *Nucleo Bond® Xtra Maxi Plus* (*Macherey-Nagel, USA*) e quantificado no equipamento *NanoDrop* (*Thermo Fisher Scientific*) de acordo com o protocolo do fabricante.

#### 4.5.2. Confirmação da inserção dos gRNAs por sequenciamento de Sanger

A confirmação da inserção dos gRNAs foi realizada pela técnica de sequenciamento de Sanger. Foram adicionados a um microtubo 200 ng de DNA do plasmídeo, 1 µL do *primer* da região em que a sequência seria inserida, 2 µL de *buffer* de sequenciamento, 0,3 µL de

*BigDye™ Terminator (Thermo Fisher Scientific)* e água ultrapura em um volume final de 10 µL de solução. A reação foi colocada em um termociclador, com o programa de 10 segundos à 96°C, 5 segundos à 50°C e 4 minutos à 60°C, por 30 ciclos. Em seguida, foi realizada a purificação da reação de sequenciamento. Após a centrifugação da placa com as reações de sequenciamento, foi adicionado, a cada poço, uma solução contendo 25 µL de etanol absoluto, 1 µL de EDTA 125 µM e 1 µL de acetato de sódio 3M. A placa foi agitada por 2 minutos, incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 2000 g por 45 minutos. Após a centrifugação, a placa foi imediatamente vertida na pia, desprezando o sobrenadante, e centrifugada invertida sobre papel filtro a 190 g por 1 minuto. Foram adicionados 35 µL de etanol 70% em cada poço e realizada outra centrifugação a 1670 g por 15 minutos. Novamente a placa foi invertida na pia para que o sobrenadante fosse desprezado e, sem desvirá-la, passou por uma nova centrifugação sobre papel filtro a 190 g por 1 minuto. A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente para que todo o etanol evaporasse. As amostras foram ressuspensas em 10 µL de *Hi-Di™ Formamide (Thermo Fisher Scientific)*, desnaturadas à 90°C por 5 minutos e incubadas em gelo por mais 5 minutos. O sequenciamento das amostras foi realizado com a plataforma 3500 *Series Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific)*, com o modo de corrida StdSeq\_BDX\_50\_POP7. Todas as análises dos produtos sequenciados foram realizadas com o auxílio do programa *Vector NTI 10.3.0 (Invitrogen)*.

#### **4.5.3. Transfecção do plasmídeo nas linhagens celulares**

As linhagens T47D e HS578T mantidas em cultura passaram pelo processo de dissociação com tripsina no momento em que atingiram confluência, foram ressuspensas e contadas com auxílio do *Countess (Invitrogen)*. Em uma placa de 6 poços foram cultivadas  $5 \times 10^5$  células por poço, para quatro condições diferentes. As células foram incubadas por 24 horas nas condições de cultivo. As transfecções foram realizadas com Lipofectamine 2000 (*Thermo Fisher Scientific*), seguindo as recomendações do fabricante. Foram realizados três tipos de transfecção, sendo que uma contava com o plasmídeo construído com os gRNA, outra com o plasmídeo sem os gRNA (irrelevante) e a última com EGFP como um controle de eficiência da transfecção (plasmídeo pEGFP.C1 - Promega). Também foram utilizadas células não transfectadas, as quais serviram como controle de seleção através de puomicina.

Depois de confirmado o funcionamento da transfecção, com exceção das células transfectadas com EGFP, as demais foram transferidas para uma placa de *petri*, utilizando três titulações de células diferentes para cada condição. Na primeira placa foram cultivadas  $1 \times 10^6$  células, na segunda placa  $1 \times 10^5$  células e na terceira placa  $1 \times 10^4$  células. Após 24 horas, iniciou-se a seleção com puromicina em meio DMEM à 10% de SFB e 1% de PS. Para a linhagem T47D foi utilizada a concentração de 1,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de puromicina, já para a linhagem HS578T a concentração era de 0,8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . O meio com o antibiótico foi trocado a cada três dias, até que todas as células utilizadas como controle (sem transfecção) estivessem mortas. A partir desse momento, os clones obtidos foram isolados da placa com o auxílio de papel filtro embebido em tripsina e colocados em placas de 24 poços. Os clones foram expandidos para a realização do *Western Blot*.

#### 4.5.4. Confirmação de edição de linhagens por *Western Blot* anti-PALB2

Para confirmar a deleção de *PALB2* através do sistema *CRISPR/Cas9*, foi utilizada a técnica de *Western Blot*. As linhagens celulares foram cultivadas em placas de 6 poços e, depois de 24 horas, coletadas. As células foram lisadas no gelo com tampão de lise (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 0,25 M glicose, 6N HCl, 1 mM EDTA) e inibidores de protease para extração de proteínas. Os sobrenadantes foram coletados, e a concentração total de proteínas foi mensurada pelo ensaio de Bradford<sup>69</sup> (Sigma). Foram utilizados 60  $\mu\text{g}$  de proteína para cada amostra da linhagem T47D e 50  $\mu\text{g}$  para HS578T, 10  $\mu\text{L}$  de *2x Laemmli Sample Buffer* (Bio-Rad) e uma quantidade de água ajustada para um volume final de 20  $\mu\text{L}$  por poço. As amostras contendo as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% sob condições desnaturantes e não redutoras (SDS-PAGE), e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (*Hybond-C™ Extra, Amersham Biosciences*) no sistema de transferência submersa por 4 horas. Ao fim da transferência, a membrana foi corada com uma solução à 0,1% de Ponceau S (Sigma) e 5% de ácido acético. A membrana foi lavada e bloqueada com 5% de leite em pó desnatado diluído em TBS-T por uma hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio a membrana foi incubada com o anticorpo primário específico anti-PALB2 (*Abcam - ab170513*) em uma concentração de 1:50 *overnight* à 4°C. Por fim, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-*rabbit* conjugado com peroxidase na concentração de 1:5000, por 1 hora à temperatura ambiente. A reação foi

revelada por quimiluminescência ECL (GE), detectada pelo sistema de fotodocumentação *ImageQuant LAS 4000 mini* (GE) e as bandas foram quantificadas por densitometria utilizando o software *Image J*.

#### **4.5.5. Isolamento de células através de *Cell Sorting* e expansão dos clones**

Para clones cuja expressão de PALB2 foi diminuída, mas não completamente perdida, foi utilizada a técnica de *Single Cell Sorting* para o isolamento de células sem expressão do gene. Essa técnica foi realizada no Laboratório de Citometria de Fluxo da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, em colaboração com a Pesquisadora do laboratório Patrícia Vianna Bonini Palma. Para esse ensaio foi utilizado o equipamento FACSARIA™ Fusion (BD Biosciences), que isolou as populações celulares levando em consideração o tamanho e complexidade celular. Essas células foram isoladas em placas de 96 poços, sendo coletada uma célula por poço. Aquelas células que conseguiram formar colônias foram colocadas em placas de 24 e depois de 6 poços, subseqüentemente, para que fossem expandidas. Para que fosse escolhido o melhor clone, ou seja, aquele com perda de expressão de PALB2, realizamos a técnica *Dot Blot*<sup>70</sup> para um *screening* inicial.

#### **4.5.6. *Dot Blot* para a escolha do melhor clone *knockout* para PALB2**

A técnica foi realizada de acordo com Estep *et al.* (2016)<sup>70</sup>, com algumas modificações. Os clones cultivados em placas de 96 poços foram lisados com tampão de lise e inibidores de proteases, como descrito anteriormente (item 4.5.4) para o *Western Blot* e coletados. Em uma membrana de nitrocelulose, foi colocado 1 µL da solução com as células lisadas, tampão de lise e inibidores. Esse procedimento foi realizado em duas membranas diferentes, sendo uma espelho da outra. As membranas permaneceram em repouso por cerca de 20 minutos, até que estivessem completamente secas. Após esse momento, as membranas foram incubadas por uma hora com leite em pó desnatado diluído em TBS-T, para que houvesse o bloqueio de sítios inespecíficos. Uma das membranas foi incubada por duas horas com anticorpo anti-PALB2 na concentração de 1:50 em leite em pó desnatado diluído em TBS-T à 4°C, e, a membrana espelho, nas mesmas condições, em anticorpo anti- $\alpha$ -tubulina na concentração de 1:2000. Foram realizadas três lavagens das membranas, por 5 minutos cada, com TBS-T. Em seguida, a membrana utilizada para a marcação de PALB2 foi

incubada por 1 hora com anticorpo anti-*rabbit* conjugado com peroxidase em leite em pó desnatado e diluído em TBS-T na concentração de 1:5000, à temperatura ambiente. A membrana com a marcação para  $\alpha$ -tubulina foi incubada em anticorpo anti-*mouse* em leite em pó diluído em TBS-T na concentração de 1:5000. Por fim, foram realizadas três lavagens de 5 minutos cada com TBS-T. A reação foi revelada por quimiluminescência ECL (GE) e detectada pelo sistema de fotodocumentação *ImageQuant LAS 4000 mini* (GE). Os clones que se mostraram promissores para o *knockout* em *PALB2* foram selecionados para que houvesse a confirmação de perda de expressão da proteína pela técnica *Western Blot*, como descrito anteriormente.

#### 4.6. Construção de linhagens celulares com variantes de interesse no gene *PALB2*

##### 4.6.1. Inserção das variantes L939W, F994C e Q348\* no gene *PALB2*

A inserção das variantes L939W, F994C e Q348\* no gene *PALB2* foi realizada paralelamente através da técnica de mutagênese sítio-dirigida. Para isso, foi realizada a amplificação do plasmídeo pDEST-FRT/TO-Flag-PALB2 (*Addgene*, USA) utilizando os *primers* específicos que continham as variantes de interesse (destacadas em vermelho) no meio de sua sequência, conforme a tabela 4.

**Tabela 4.** Sequências dos *primers* utilizados para a realização da mutagênese-sítio-dirigida em *PALB2*.

Variante	Sequência de <i>primers</i>
<b>L939W</b>	<i>Forward:</i> GTAGCTTTGGGAAATTGGGAAATCAGAGAGATCAGGGCATTG <i>Reverse:</i> CAATGCCCTGATCTCTCTGATTTCCCAATTTCCCAAAGCTAC
<b>F994C</b>	<i>Forward:</i> ACAAGTAGAAGTCATGACGTGTGCAGAAGATGGAGGAGGC <i>Reverse:</i> GCCTCCTCCATCTTCTGCACACGTCATGACTTCTACTTGTTGATCAG
<b>Q348*</b>	<i>Forward:</i> AAAACCAAACTTAAAAGAATAAAAATCAAACAGAGAAATCT <i>Reverse:</i> AGATTTCTCTGTTTGATTTTATTCTTTTAAGTTTTGGTTTT

As bases destacadas em vermelho correspondem às variantes selecionadas para o estudo.

Para a síntese, foi utilizada a enzima *DNA polimerase Phusion* (*New England Biolabs*, USA). A ciclagem utilizada consistia em uma etapa de 30 segundos à 98°C, outra etapa com

25 ciclos de 10 segundos à 98°C, 20 segundos à 60°C e 2 minutos e 15 segundos à 72°C, seguido de uma última etapa de 2 minutos à 72°C. Após a mutagênese sítio-dirigida foi feita a clivagem de cada produto com 1 µL da enzima *DpnI* (*Thermo Fisher Scientific*), à 37°C por 1 hora. Após a clivagem, realizou-se a purificação do produto com o *Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (*Macherey-Nagel*, USA) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Em seguida, foram realizadas as transformações em bactérias *Dh5alpha Competent E. coli* (*New England Biolabs*, USA) de acordo com as orientações do fabricante. Os clones foram selecionados com ampicilina, já que o plasmídeo possui uma sequência que confere resistência a esse antibiótico, e expandidos em meio líquido *LB Broth* à 0,1 mg/mL de ampicilina. O DNA das bactérias foi extraído através do *Kit NucleoSpin® Plasmid* (*Macherey-Nagel*, USA). A confirmação da inserção das variantes se deu através do sequenciamento de Sanger.

#### 4.6.2. Amplificação de *PALB2*

Depois de confirmada a inserção de cada variante, *PALB2* presente no plasmídeo pDEST-FRT/TO-Flag-*PALB2* (*Addgene*, USA), com as respectivas variantes ou sem variantes, foi amplificado com a utilização dos *primers forward*: CACCATGGATTACAAGGATGACGATGACAAGGACGAGCCTCCCGGAAGCC, que possui uma sequência “flag” (em vermelho) em seu início, e *reverse*: TTATGAATAGTGGTATACAAATATATTTCC. O produto oriundo da amplificação foi analisado em um gel de agarose à 1%. As bandas correspondentes ao tamanho do fragmento de *PALB2* foram cortadas e purificadas através do *Kit Nucleo Spin® Gel and PCR Clean-up* (*Macherey-Nagel*, USA) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante.

#### 4.6.3. Clonagem de *PALB2* no plasmídeo de expressão

Em um primeiro momento, foi realizada a clivagem do plasmídeo de expressão pCI-neo (*Promega*) para que ele pudesse receber os insertos de interesse. Para isso, foi utilizada a enzima *SmaI* (*Thermo Fisher Scientific*). Na clivagem foram utilizados 3 µg do plasmídeo, 0,5 µL da enzima, 3 µL do buffer específico da enzima e água em uma quantidade para completar um volume final de solução de 30 µL. A solução foi incubada por 2 horas à 30°C. Em seguida, foi adicionado 1 µL de fosfatase alcalina e realizada nova incubação por 1 hora à

37°C. A reação foi purificada através do *Kit Nucleo Spin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel, USA) conforme as recomendações do fabricante.

Após a clivagem do plasmídeo foi realizada sua ligação com o fragmento de *PALB2* com ou sem variantes. Para essa etapa, foram utilizados 7 µL do nosso inserto de interesse, 1 µL do vetor (pCI-neo clivado), 1 µL de T4 DNA ligase (*Thermo Fisher Scientific*) e 1 µL do buffer específico da enzima. A reação foi incubada à 16°C *overnight*. Após a incubação, o produto de cada ligação foi transformado em bactérias *Dh5alpha Competent E. coli* (*New England Biolabs*, USA), seguindo as recomendações do fabricante.

Para a amplificação do material de interesse, as bactérias foram colocadas em meio líquido com ampicilina à 37°C e 1.000 rpm *overnight*. A extração de DNA foi realizada pelo método de lise alcalina, onde 1 mL do meio contendo as bactérias passou por uma centrifugação de 5 minutos à 4°C e 14.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e adicionado 200 µL de um tampão contendo RNase para que as bactérias fossem ressuspendidas. Foram adicionados 200 µL de tampão de lise e o produto foi incubado por 4 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 200 µL de um tampão de neutralização da lise e a solução foi centrifugada por 15 minutos à 4°C e 14.000 rpm. O sobrenadante foi retirado com cuidado e colocado em outro tubo, onde foi adicionado isopropanol e centrifugado por 15 minutos, à 4°C e 14.000 rpm, para que houvesse a precipitação do DNA. O sobrenadante foi desprezado, e, na sequência foi adicionado etanol 70% e submetido à nova centrifugação, nas mesmas condições descritas anteriormente, para que fossem retirados os resquícios de isopropanol. O sobrenadante foi desprezado e os tubos ficaram invertidos por cerca de 30 minutos para que todo etanol evaporasse. Por fim, o DNA de cada tubo foi eluído em 30 µL de água ultrapura.

Foi realizada a clivagem do DNA extraído para que o perfil de bandas exibido pudesse ser avaliado e, através disso confirmado se *PALB2* foi inserido no plasmídeo no sentido correto (*sense*). Na clivagem, foram utilizados 23,8 µL de água ultrapura, 0,2 µL da enzima *HindIII*, 3 µL do buffer específico da enzima e 3 µL do DNA extraído. A reação foi incubada por 1 hora à 37°C. Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose à 1% para que o perfil de bandas gerado *in silico* através do programa *Vector NTI 10.3.0* (Invitrogen) fosse analisado e comparado com aquele perfil apresentado pelas clivagens. O gel foi revelado pelo fotodocumentador L-Pix EX (*Loccus*). Após confirmada a inserção do gene na posição

correta, foi realizada uma amplificação das bactérias com pCI-neo contendo os insertos de interesse em 400 mL de meio *LB Broth* líquido com 0,1 mg/mL de ampicilina. Foi realizada a extração do DNA plasmidial das bactérias utilizando o kit *NucleoBond® Xtra Midi Plus* (*Macherey-Nagel*, USA), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. O plasmídeo contendo o gene foi sequenciado com pares de *primers* que flanqueavam a região de inserção do gene. Os *primers* utilizados foram 5'-CAGGGTCAGTGACCCTAGTG-3', 5'-TCTCCCAGTGACTCTTG-3', 5'-TTGGATGATGATGCTTTCAC-3', 5'-CCTGTGACTGTGACTCTGTC-3', 5'-ATGCAAGAAGCTCTGCTTGG-3', 5'-AAGGCTAGAGTACTTAATACGA-3' e 5'-ATTAACCCTCACTAAAGGGA-3'. Quando confirmadas as inserções do gene com as variantes no sentido *sense*, sem a inserção acidental de outras variantes, os plasmídeos estavam prontos para as transfecções nas linhagens *knockout* ou *knockdown* para *PALB2*.

#### **4.7. Transfecção do pCI-neo com variantes nas linhagens *knockout* para *PALB2***

A transfecção de pCI-neo contendo os insertos nas linhagens celulares T47D e HS578T *knockout* para *PALB2* endógeno foi realizada com Lipofectamine 3000 (*Thermo Fisher Scientific*), de acordo com as recomendações do fabricante. Em uma placa de 6 poços, foram cultivadas  $6 \times 10^5$  células *knockout* para *PALB2* por poço, que foi incubada por 24 horas nas condições normais de cultivo das células. Em um dos poços, as células permaneceram sem transfecção, em outro poço foi transfectado um plasmídeo pCI-neo com a sequência de *EGFP*, para controle de funcionamento da transfecção e, para cada um dos demais 4 poços foram transfectados *PALB2 WT*, *PALB2* com a variante L939W, *PALB2* com a variante F994C e *PALB2* com a variante Q348\*. Após 24 horas da transfecção, as células foram transferidas para uma placa de petri onde iniciou-se a seleção com o antibiótico G418 (*Sigma Aldrich*), já que o plasmídeo pCI-neo possui uma sequência que induz a resistência para esse antibiótico. O procedimento foi realizado para as duas linhagens celulares, T47D e HS578T, sendo que para a linhagem T47D a seleção se deu com a concentração de 0,8 mg/mL e para HS578T 0,5 mg/mL de antibiótico, diluído em meio de cultura a 10% de SFB e 1% PS. A seleção ocorreu até que as células sem transfecção morressem completamente (cerca de 10 dias). As células selecionadas foram expandidas e a inserção das variantes confirmada por sequenciamento de Sanger.



#### 4.8. Confirmação da inserção das variantes

Para que fosse confirmada a inserção de cada variante nas linhagens *knockdown* ou *knockout* para *PALB2*, foi coletado o *pellet* de células de cada condição e o DNA extraído com o *Kit BioPur Mini Spin Plus (BioPur)*. Em seguida, os fragmentos das regiões em que as variantes se encontravam foram amplificados e sequenciados por Sanger com os *primers* descritos na Tabela 5.

**Tabela 5.** *Primers* utilizados para a amplificação e sequenciamento do DNA das diferentes linhagens para a confirmação da inserção das variantes de interesse.

Variante	Primer
L939W e F994C	<i>Forward:</i> AAAGCTCTGGATGCTTGGCA
	<i>Reverse:</i> CTTGCATCCCTTGGACCTCA
Q348*	<i>Forward:</i> TAAGTAAAAGTGGCCAAGTCC
	<i>Reverse:</i> GATGACGACTTTTCTTCCCTTTCA

Após a confirmação da inserção das variantes, os ensaios funcionais começaram a ser conduzidos com as linhagens celulares T47D *PALB2* WT, T47D *PALB2* KO, T47D *PALB2* L939W, T47D *PALB2* F994C, T47D *PALB2* Q348\*, HS578T *PALB2* WT, HS578T *PALB2* KO, HS578T *PALB2* L939W, HS578T *PALB2* F994C e HS578T *PALB2* Q348\*.

#### 4.9. Ensaios funcionais

##### 4.9.1. Análise de proliferação celular por BrdU

Para análise de proliferação celular foi utilizada a técnica colorimétrica de incorporação de BrdU através do *BrdU Cell Proliferation ELISA Kit colorimetric (Abcam)*. Em placas de 96 poços foram semeadas  $2 \times 10^4$  células por poço (100  $\mu$ L por poço de uma suspensão com  $2 \times 10^5$  células/mL) e, em seguida, adicionados 20  $\mu$ L do reagente BrdU preparado de acordo com as instruções do fabricante. Após 24 horas, foram adicionados 200  $\mu$ L da *Fixing Solution*, seguindo o protocolo para células aderentes, e a placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Foram realizadas três lavagens com o *Wash Buffer* e adicionados 100  $\mu$ L do *Detector Antibody* anti-BrdU. A placa foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente e, em seguida, foram realizadas mais três lavagens como descrito

acima. A solução de *Peroxidase Goat Anti-mouse IgG Conjugate* foi preparada como recomendado pelo fabricante e foram adicionados 100 µL desta solução por poço, seguido de uma incubação por 30 minutos à temperatura ambiente. Novamente foram realizadas três lavagens, seguidas de uma lavagem com água destilada para a remoção completa do *buffer* de lavagem. Foram adicionados 100 µL de *TMB Peroxidase Substrate* por poço e a placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Por fim, foi adicionada a *Stop Solution* (100 µL/poço) e a leitura da absorbância foi realizada com o auxílio do leitor de placas Varioskan™ (Thermo Fisher Scientific) no comprimento de onda de 450 nm.

#### **4.9.2. Análise de proliferação indireta e viabilidade Celular por MTS**

Para que pudéssemos avaliar a proliferação indireta e a viabilidade celular foi utilizado o kit comercial colorimétrico *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (MTS) (*Promega*). O ensaio baseia-se na redução de MTS *tetrazolium* a formazan com coloração, através de sua metabolização por células viáveis. A viabilidade foi mensurada nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas, sendo o tempo de 0 horas considerado como possuindo 100% de células viáveis. Para isso, foram semeadas 5.000 células por poço em placas de 96 poços e cultivadas nos tempos descritos acima. Foram aplicados 10 µL do reagente MTS diluídos em 90 µL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de PS. Quando aplicado o reagente, as placas eram mantidas por 4 horas na estufa nas condições de manutenção das células para que o MTS fosse metabolizado. Em seguida, as absorbâncias foram quantificadas com o auxílio do leitor de placas Varioskan™ (*Thermo Fisher Scientific*) e comparadas. Foi possível realizarmos uma análise de proliferação indireta (metabólica) das linhagens a partir das medidas de viabilidade em diferentes tempos. As células foram plaqueadas em sextuplicata e foram realizados 2 experimentos independentes.

#### **4.9.3 Análise de apoptose por citometria de fluxo**

O ensaio de apoptose foi conduzido segundo Mao e colaboradores (2018)<sup>71</sup>, com algumas modificações. Em placas de 6 poços, foram semeadas  $2,5 \times 10^5$  células por poço para as linhagens derivadas da linhagem parental T47D e  $2,8 \times 10^5$  células por poço para aquelas derivadas da HS578T. As células foram plaqueadas em duas placas (espelho) para que uma

delas fosse irradiada e a outra não. A irradiação teve o propósito de causar um dano no DNA, para a comparação da porcentagem de células em apoptose em condições basais e irradiada de cada linhagem, uma vez que PALB2 atua no reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga. Após 24 horas, os meios foram trocados e uma das placas foi irradiada com 4 Gy<sup>71</sup> com o auxílio do irradiador RS-2000 (*Rad Source Technologies*). As placas foram incubadas por 72 horas em condições normais de manutenção das células. Os sobrenadantes das células foram coletados em tubos de citometria e, com o auxílio da enzima acutase (250 µL/poço, durante 5 minutos à temperatura ambiente), as células foram dissociadas e adicionadas aos seus respectivos tubos com o sobrenadante. Em seguida foi realizada uma centrifugação por 5 minutos a 1.500 g e o sobrenadante foi descartado. As células foram resuspendidas em *buffer* e marcadas com 2,5 µL de Anexina V-PE e 7-AAD (*BD Biosciences*). Para a avaliação de células em apoptose, foi utilizado o citômetro de fluxo *BD Accuri™ C6 Plus* (*BD Biosciences*) para as linhagens derivadas da HS578T e da T47D.

#### 4.9.4. Ensaio Clonogênico

Para avaliar a capacidade de formação de colônias das diferentes linhagens celulares, foi realizado o ensaio clonogênico. Em placas de 6 poços, foram semeadas 500 células de cada linhagem e as placas foram incubadas em condições de manutenção normal das células por cerca de 10 dias, até que as colônias fossem visíveis. O meio das células foi retirado e foi realizada a lavagem dos poços com *Dulbecco's phosphate-buffered saline* (DPBS - *Sigma*). Após a retirada do DPBS, foi adicionado 1 mL de metanol gelado e as placas foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente para que as células fossem fixadas. Novamente foi realizada uma lavagem como descrito acima, e adicionados 500 µL de uma solução filtrada de cristal violeta (*Sigma*) 0,5% diluído em água ultrapura por 5 minutos à temperatura ambiente. Foram realizadas lavagens com DPBS até que o excesso de cristal violeta fosse retirado. Os poços das diferentes condições foram fotografados e a avaliação do número de colônias foi realizada com o auxílio do *software* Image J. Além disso, depois de documentados, os poços passaram por um processo de descoloração com uma solução de ácido acético 10% diluído em água ultrapura. Em triplicata, foram colocados 100 µL do sobrenadante dessa solução em placas de 96 poços e as absorbâncias foram mensuradas com o auxílio do leitor de placas *Varioskan™* (*Thermo Fisher Scientific*) no comprimento de

onda 590 nm. Essa análise foi realizada para que, além da contagem do número de colônias por imagens, também pudéssemos comparar a capacidade de formação de colônias através da leitura de absorbâncias.

#### **4.9.5. Ensaio de reparo por recombinação homóloga**

Para analisar a eficiência do mecanismo de reparo ao dano de DNA através da via de recombinação homóloga das variantes de interesse foram utilizadas duas metodologias distintas, de acordo com Seluanov, Mao, e Gorbunova (2010)<sup>72</sup> e Gunn e Stark (2012)<sup>73</sup> com modificações, detalhadas nos subitens 4.9.5.1 e 4.9.5.2.

##### **4.9.5.1. Ensaio de recombinação homóloga através da transfecção dos plasmídeos pDRGFP e pCBAScel nas linhagens derivadas**

Uma das maneiras de avaliar a recombinação homóloga no estudo foi através da co-transfecção dos plasmídeos pDRGFP (*Addgene*, USA), pCBAScel (*Addgene*, USA) e pCI-neo:mCherry. Resumidamente, o plasmídeo pDRGFP possui duas cópias em *tandem* do gene *Green Fluorescent Protein* (GFP), sendo uma das cópias, a *SceGFP*, inativa já que possui um *stop codon* dentro do sítio de clivagem do vetor de expressão. A outra cópia, *iGFP*, codifica uma proteína truncada que também não apresenta fluorescência. Através da co-transfecção dos plasmídeos pCI-neo:mCherry, como controle interno de transfecção, e pCBAScel, contendo a enzima de restrição I-SceI, ocorre a clivagem de *SceGFP* e, caso a via de reparo por recombinação homóloga esteja funcionando adequadamente, *iGFP* será utilizada como molde para restaurar o quadro de leitura de *SceGFP*<sup>74</sup>. Por isso, apenas na ativação do reparo por recombinação homóloga haverá uma cópia do gene funcional. Assim, a razão entre células GFP positivas e mCherry positivas representa a extensão da ativação dessa via de reparo, sendo mensurado por citometria de fluxo<sup>74</sup>.

Para a realização do ensaio com as linhagens derivadas de T47D, foram eletroporadas 10<sup>6</sup> células de cada condição em 100 µL de meio OPTIMEM (*Thermo Fischer Scientific*) utilizando cubetas de 4 mm. Juntamente, foram adicionados 20 µg de cada vetor (pCI-neo:mCherry, pBAScel e pDRGFP). As células foram eletroporadas, com o auxílio do *Gene Pulser Xcell™ Eletroporation System* (*Bio-Rad*), em pulso único de 120 V, com a capacitância de 960 µF por 10 ms. Após a eletroporação, as células foram recuperadas em 4 mL de meio

DMEM suplementado com 10% SFB e 1% PS e divididas em dois poços de placas de 6 poços, sendo 2 mL para cada poço<sup>72,73</sup>.

Para as linhagens derivadas da HS578T, o protocolo de transfecção utilizado foi o da Lipofectamine 3000 (*Thermo Fisher Scientific*), de acordo com as orientações do fabricante. Foram preparados dois mixes (mix A e mix B) de acordo com as orientações do fabricante para cada condição a ser observada. No Mix A foram adicionados 500 ng de DNA dos vetores utilizados (pCI-neo:mCherry, pBAScel e, pDRGFP), totalizando 1500 ng de vetores no mix. Além disso, neste mix também foram adicionados 25 µL de OPTIMEM e 1 µL de P3000 *Reagent* para cada 500 ng de DNA de Vetor (podendo totalizar 3 µL de P3000 *Reagent*). O mix foi incubado por 5 minutos à temperatura ambiente. No mix B foram adicionados 25 µL de OPITMEM e 1,5 µL de Lipofectamine 3000 (*Thermo Fisher Scientific*). Os Mixes A e B foram misturados e incubados por 15 minutos à temperatura ambiente. Em uma placa de 6 poços, foram adicionados 2 mL de meio DMEM suplementado com 10% SBF e 1% PS por poço. Em seguida, foi adicionada a mistura dos mixes de cada condição. Por fim, no meio contendo os reagentes para a transfecção, foram semeadas  $1 \times 10^5$  células HS578T.

Em ambas as situações, para linhagens derivadas de T47D e HS578T, as placas foram incubadas nas condições de cultivo de células por 72 horas e analisadas por citometria de fluxo utilizando o *FACSMelody™* (*BD Biosciences*). Foram analisados 20.000 eventos no *gate* da população viável para os canais FITC (GFP) e PE-CY594 (mCherry). O cálculo utilizado para determinar a eficiência de reparo por recombinação homóloga foi a razão de células EGFP+/mCherry+. Após a normalização das taxas de transfecção, as taxas de reparo foram relativizadas em relação à condição sem dano, onde a condição sem dano recebeu o valor de 1 e as taxas das demais condições foram calculadas com base nesse valor.

#### **4.9.5.2. Ensaio de recombinação homóloga através da superexpressão das variantes de interesse em células T47D contendo o plasmídeo pDRGFP estável**

Para este ensaio foram utilizadas células da linhagem T47D transfectadas estavelmente com o plasmídeo pDRGFP, que foram estabelecidas pelo nosso grupo de pesquisa. Foram eletroporadas  $1 \times 10^6$  células para cada uma das condições em cubetas de 4 mm com 100 µL de meio OPTIMEM contendo 20 µg de cada vetor (pCI-neo:mCherry, pBAScel e, pCI-neo:PALB2, com cada uma das variantes de interesse). As células foram

eletroporadas, com o auxílio do *Gene Pulser Xcell™ Eletroporation System (Bio-Rad)*, em pulso único de 120 V, com a capacitância de 960  $\mu$ F por 10 ms. Após a eletroporação, as células foram recuperadas em 4 mL de meio DMEM suplementado com 10% SFB e 1% PS e divididas em dois poços de placas de 6 poços, sendo 2ml para cada poço. As placas foram incubadas nas condições de cultivo de células por 72 horas e analisadas por citometria de fluxo utilizando o *FACSMelody™ (BD Biosciences)*. Foram analisados 20.000 eventos no *gate* da população viável para os canais FITC (GFP) e PE-CY594 (mCherry). O cálculo utilizado para determinar a eficiência da edição foi a razão de células EGFP+/mCherry+<sup>72,73</sup>. Após a normalização das taxas de transfecção, as taxas de reparo foram relativizadas em relação à condição sem dano, onde a condição sem dano recebeu o valor de 1 e as taxas das demais condições foram calculadas com base nesse valor.

#### **4.10. Análise Estatística**

Os dados obtidos foram analisados como média e erro padrão utilizando o programa *GraphPad Prisma versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)*. Em casos de testes paramétricos as diferenças entre grupos foram analisadas pelo teste *One-way ANOVA* com pós-teste de Tukey; casos não pareados foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis. Consideramos significantes as diferenças estatísticas quando  $p < 0,05$ .

Para os ensaios de apoptose onde foram comparadas as condições de células viáveis, células em apoptose inicial, células em apoptose tardia ou necrose e células não viáveis, foram utilizadas as análises de dados agrupados *Two-way ANOVA* com pós teste de Bonferroni comparando cada uma das linhagens editadas à linhagem com *PALB2 WT* reconstituído. Para a comparação entre linhagens não irradiadas e irradiadas, foi utilizado o teste *One-Way ANOVA* com pós-teste de Bonferroni comparando cada par de colunas selecionadas.

## **5. ASPECTOS ÉTICOS**

O presente projeto não utiliza material biológico de pacientes e/ou linhagens celulares primárias, conta apenas com linhagens comerciais e, portanto, não houve necessidade de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). No entanto, o CEP da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos possui ciência do projeto que foi cadastrado sob o número 1360/2017.

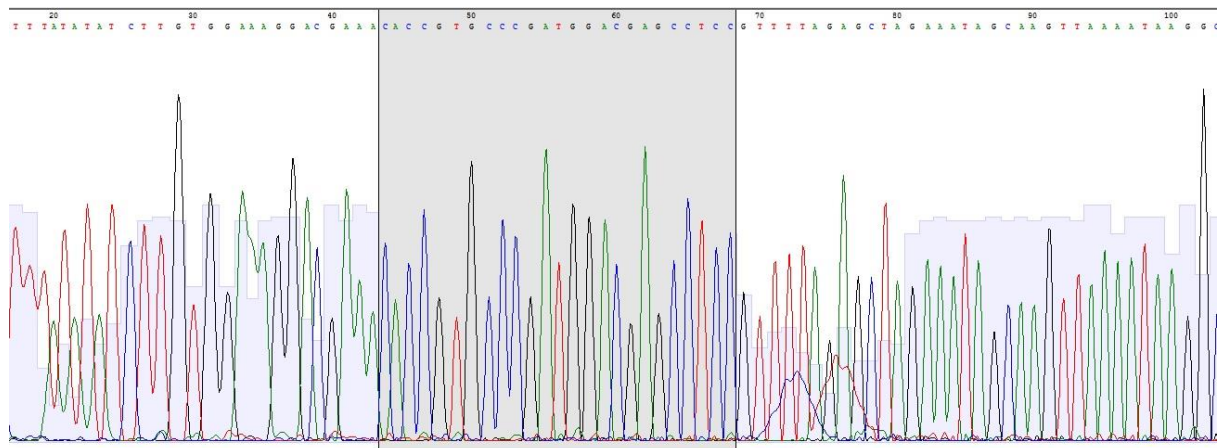
## 6. RESULTADOS

### 6.1. Edição gênica das linhagens T47D e HS578T

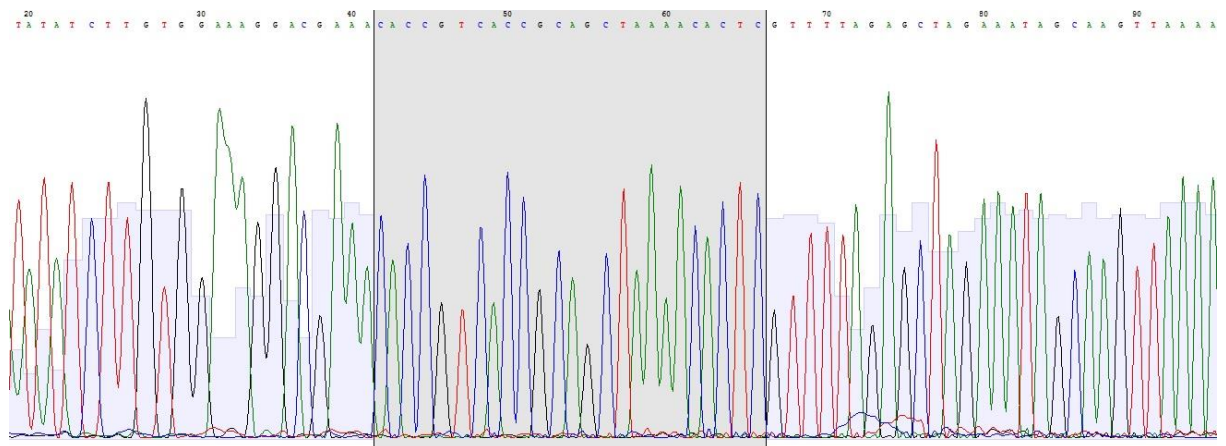
#### 6.1.1. Construção do plasmídeo com o sistema *CRISPR/Cas9*

Os processos de inserção dos gRNAs para deleção de *PALB2* endógeno no plasmídeo pX459 foi realizado e ambos os oligonucleotídeos foram incorporados no plasmídeo como demonstrado em destaque na Figura 5 (A e B). Diante disso, o sistema *CRISPR/Cas9* tornou-se apto a reconhecer a sequência de *PALB2* para que o processo de edição gênica fosse iniciado.

**A**



**B**



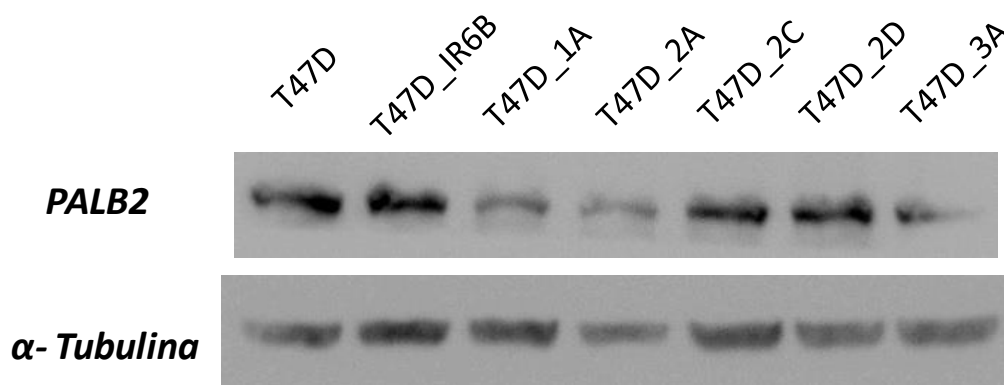
**Figura 5.** Eletroferograma do sequenciamento *forward* do plasmídeo pSpCas9(BB)-2A-Puro (pX459) v2.0. Destacado em cinza as sequências dos oligos gRNA para a deleção do gene *PALB2*. A - Sequência *forward* do oligonucleotídeo 1 (5'-CACCGTGCCCGATGGACGAGCCTCC-3') para o *knockout* de *PALB2* incorporada no plasmídeo. B - Sequência *forward* do oligonucleotídeo 2 (5'-CACCGTCACGCAGCTAAAACACTC-3') para o *knockout* de *PALB2* incorporada no plasmídeo.



### 6.1.2. Deleção de *PALB2* endógeno

Após a construção do plasmídeo com o sistema *CRISPR/Cas9*, as linhagens T47D e HS578T foram transfectadas para que não apresentassem expressão de *PALB2* endógeno. Ao final da seleção com puromicina, foram obtidos 9 clones resistentes ao antibiótico da linhagem T47D e 18 clones da linhagem HS578T.

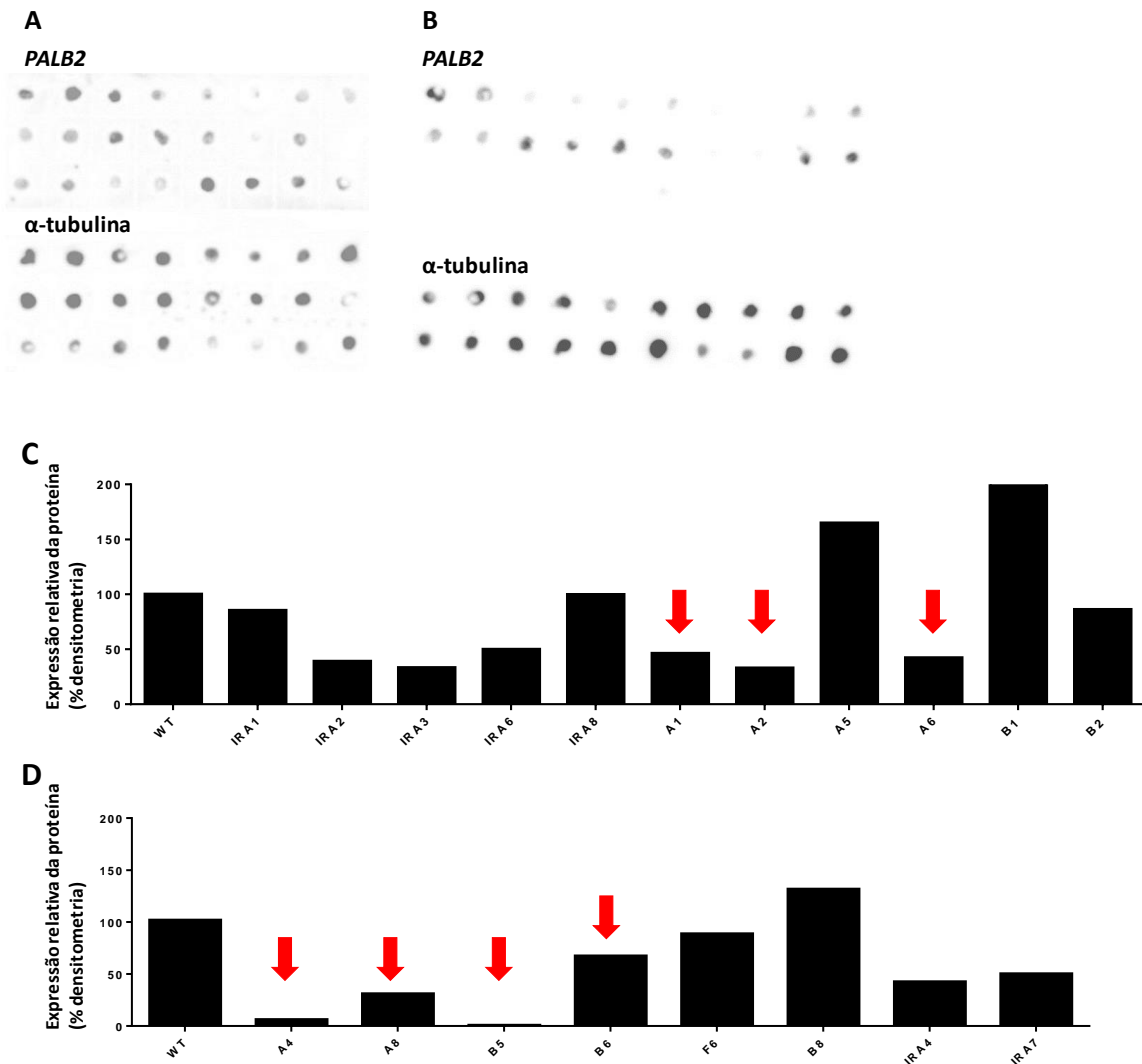
Os clones obtidos após a seleção foram expandidos e a perda da expressão de *PALB2* foi avaliada pelo método de *Western Blot*, sendo encontrados dois clones com elevada diminuição da expressão na linhagem T47D: os clone 1A e 2A (Figura 6). Esses clones foram submetidos à técnica de *Single Cell Sorting* para que células que não apresentassem expressão da proteína fossem isoladas daquelas que apresentassem.



**Figura 6.** *Western Blot* para avaliar a expressão de *PALB2* (~131 kDa) nos clones obtidos da linhagem T47D depois da edição utilizando o sistema *CRISPR/Cas9*. Foram utilizados os clones de T47D sem edição, T47D clone IR6B (transfectado apenas com o plasmídeo sem os gRNA) e os clones 1A, 2A, 2C, 2D e 3A transfectados com o plasmídeo contendo o sistema *CRISPR/Cas9*.

Com a realização da técnica de *Single Cell Sorting*, 92 células foram isoladas e 12 tornaram-se clones viáveis, nos quais o nível de expressão de *PALB2* foi novamente mensurado pela técnica de *Dot Blot*. Os clones que passaram pela técnica foram IRA1, IRA2, IRA3, IRA6 e IRA8, que foram utilizados como controle de transfecção, já que eram transfectados com o plasmídeo pX459 sem os gRNAs para o *knockout* de *PALB2*, e os clones A1, A2, A4, A5, A6, A8, B1, B2, B5, B6 e F6, isolados a partir de clones *knockdown* por *Single Cell Sorting* (Figura 7 A e B).

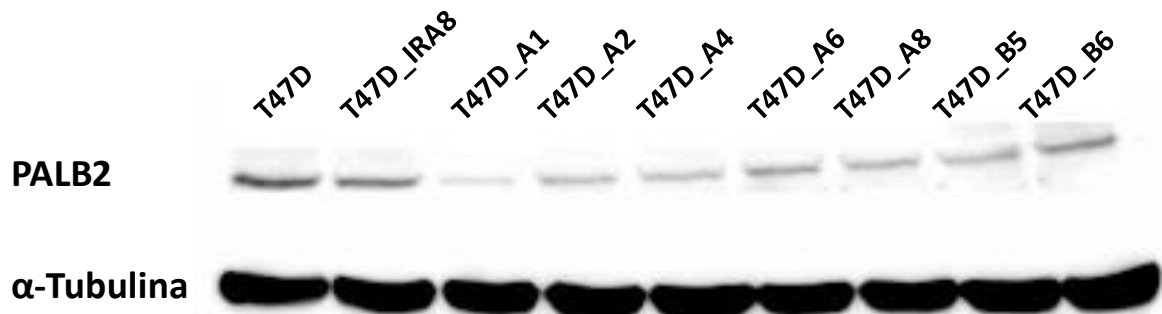
Após uma normalização, utilizando a expressão da proteína  $\alpha$ -tubulina para a comparação dos clones com a linhagem parental, obtivemos uma expressão relativa de *PALB2* (Figura 7 C e D).



**Figura 7.** Expressão relativa da proteína PALB2 nos clones isolados por *Single Cell Sorting* e *knockdown* para *PALB2* na linhagem T47D. **A** - Expressão da proteína PALB2 nos clones isolados pela técnica *Dot Blot*. Cada clone foi avaliado em duplicata sendo a ordem das duplicatas, na primeira fileira a linhagem T47D *Wild Type* (WT), os clones IRA1, IRA2 e IRA3 (transfectados apenas com o plasmídeo sem os gRNAs para o *knockout* de *PALB2*), na segunda fileira os clones IRA6, IRA8 (também transfectados apenas com o plasmídeo sem os gRNAs), A1 e A2, isolados por *Single Cell Sorting*, e na terceira fileira os clones A5, A6, B1 e B2, também isolados no *Single Cell Sorting*. **B** - Expressão da proteína PALB2 nos clones isolados pela técnica *Dot Blot*. Cada clone foi avaliado em duplicata sendo a ordem das duplicatas, na primeira fileira a linhagem T47D *Wild Type* (WT), os clones A4, A8, B5 e B6, isolados por *Single Cell Sorting*, na segunda fileira os clones F6, e B8 (também isolados por *Single Cell Sorting*), IRA4, IRA5 e IRA7 (transfectados apenas com o plasmídeo sem os gRNAs). **C** e **D** - Após a normalização, utilizando densitometria dos *Dots*, realizada com relação à expressão da proteína endógena  $\alpha$ -Tubulina, foi calculada a expressão relativa de PALB2, sendo na figura C, o gráfico referente aos clones representados na figura A e na figura D, o gráfico referente aos clones representados na figura B. Na figura D, foi excluída a análise do clone IRA5 por problemas na amostra. As flechas em vermelho indicam clones selecionados para a realização do *Western Blot*. A expressão pela linhagem T47D *wild type* (WT) foi utilizada como a referência de 100%.

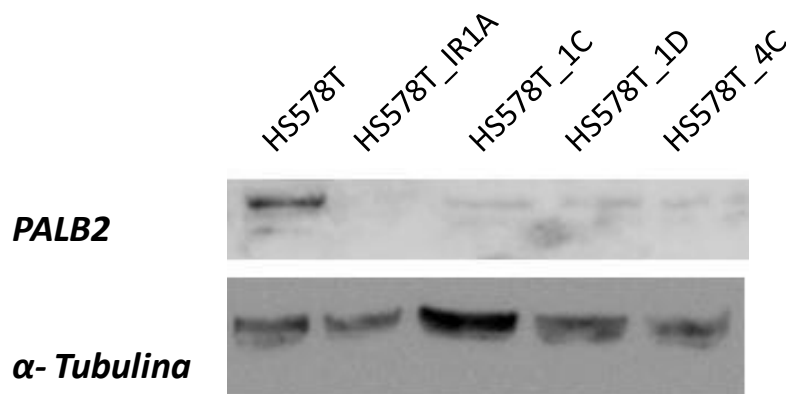
A partir dessa avaliação, sete clones foram selecionados para a realização do *Western Blot*, sendo eles A1, A2, A4, A6, A8, B5 e B6 (apontados com flechas em vermelho), para que pudéssemos confirmar a perda de expressão da proteína. Também foi utilizado o clone IRA8, transfectado apenas com o plasmídeo pX459, sem os gRNAs para *knockout* de *PALB2*, como um controle interno.

Podemos observar que não obtivemos clones com perda completa da expressão de *PALB2* (Figura 8). No entanto, o clone A1 demonstrou elevada perda de expressão da proteína e, por isso, esse clone foi escolhido para dar seguimento ao trabalho.



**Figura 8.** *Western Blot* para avaliar a expressão de *PALB2* (~131 kDa) nos clones isolados por *Single Cell Sorting* da linhagem T47D dentre aqueles que apresentaram redução de expressão de *PALB2* na primeira avaliação. Foram utilizadas extrações proteicas da linhagem T47D sem edição, T47D clone IRA8, transfectado apenas com o plasmídeo sem os gRNAs, e os clones A1, A2, A4, A6, A8, B5 e B6, isolados a partir do *Single Cell Sorting* de clones com baixa expressão de *PALB2* na linhagem T47D.

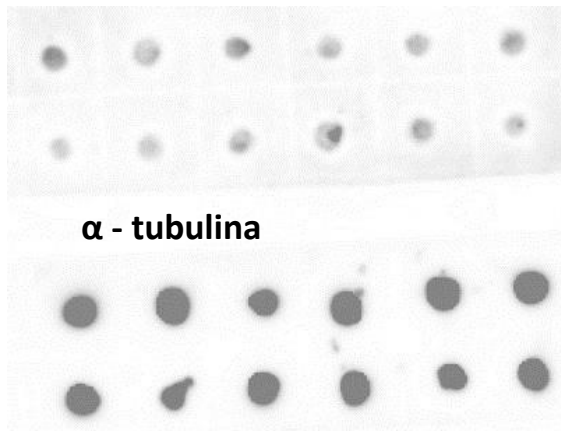
Com relação à linhagem HS578T, ao realizarmos a técnica de *Western Blot* para avaliar a expressão de *PALB2* nos clones transfectados com o pX459 e selecionados com puromicina, obtivemos 3 clones cuja expressão da proteína foi reduzida, os clones 1C, 1D e 4C (Figura 9). Assim como na linhagem T47D, um clone (clone 1C) foi selecionado para a realização do *Single Cell Sorting*, para que células que não apresentassem expressão da proteína fossem isoladas.



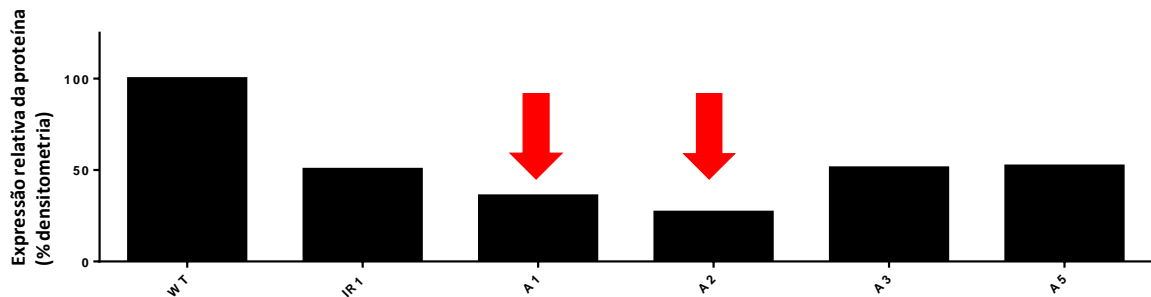
**Figura 9.** Western Blot para avaliar a expressão de PALB2 (~131 kDa) pelos clones obtidos da linhagem HS578T depois da edição utilizando o sistema CRISPR/Cas9. Foram utilizados os clones da linhagem HS578T sem edição, HS578T clone IR1A, transfectado apenas com o plasmídeo sem os gRNA, e os clones 1C, 1D e 4C, transfectados com o plasmídeo contendo o sistema *CRISPR/Cas9*.

Após a realização do *Single Cell Sorting* foram isoladas 10 células, no entanto, apenas 6 delas se expandiram, formando clones, os quais foram avaliados quanto à expressão de PALB2 por *Dot Blot*. Os clones analisados em duplicata foram o da linhagem HS578T *Wild Type* (WT), o clone IRA1, transfectado apenas com o plasmídeo pX459 sem os gRNAs para o *knockout* de PALB2, e os clones A1, A2, A3 e A5, isolados a partir do clone *knockdown* para PALB2 (Figura 10A). Também foi avaliada a expressão relativa dos clones, sendo que a expressão da linhagem WT foi considerada como 100% de expressão. A partir dessa avaliação, selecionamos dois clones, A1 e A2 (destacados com flechas em vermelho), que demonstraram elevada perda de expressão de PALB2 (Figura 10B) para que fosse realizada a confirmação da perda de expressão por *Western Blot*. Também selecionamos os clones A4 e A7 para a realização do *Western Blot* já que não foi possível realizar uma avaliação preliminar por *Dot Blot*.

A

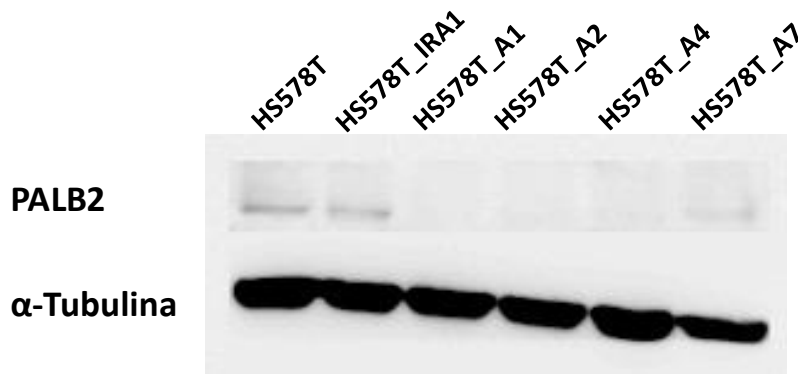
**PALB2**

B



**Figura 10.** Expressão relativa da proteína PALB2 no clones isolados por *Single Cell Sorting* e *knockdown* para PALB2 na linhagem HS578T. **A** - Expressão da proteína PALB2 nos clones isolados pela técnica *Dot Blot*. Cada clone foi avaliado em duplicata sendo a ordem das duplicatas, na primeira fileira a linhagem HS578T *Wild Type* (WT), o clone IRA1 (transfectado apenas com o plasmídeo sem os gRNAs para o *knockout* de PALB2) e A1, (isolado por *Single Cell Sorting*), e na segunda fileira os clones A2, A3 e A5, também isolados no *Single Cell Sorting*. **B** - Após a normalização, utilizando densitometria dos *Dots*, realizada com relação à expressão da proteína endógena  $\alpha$ -Tubulina, foi calculada a expressão relativa de PALB2. As flechas em vermelho indicam os clones selecionados para a realização do *Western Blot*. A expressão pela linhagem HS578T WT foi utilizada como a referência de 100%.

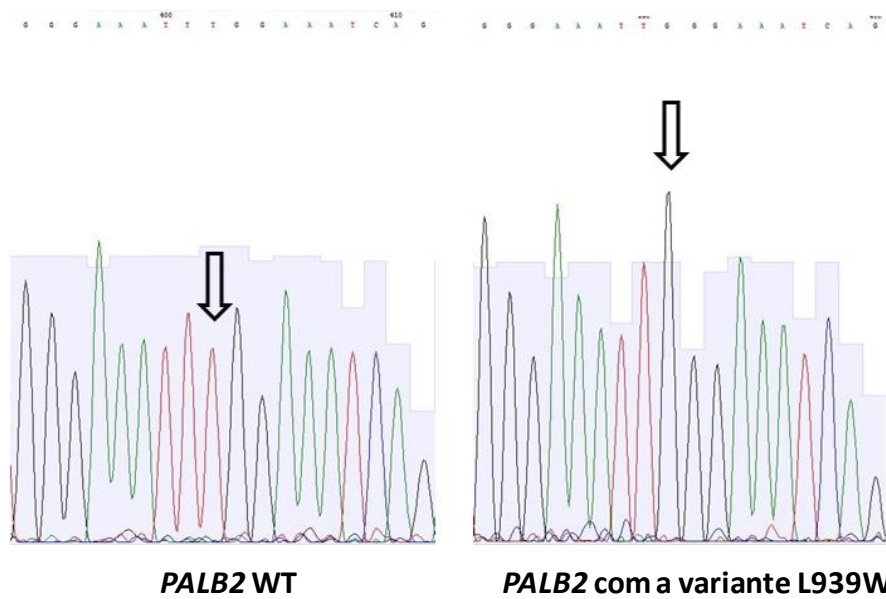
Na avaliação da expressão de PALB2 por *Western Blot*, notamos que dois clones, A1 e A2, não apresentaram expressão da proteína, enquanto os clones A4 e A7 apresentaram elevada perda de expressão (Figura 11). Por isso, o clone A1 foi selecionado para dar seguimento ao trabalho.



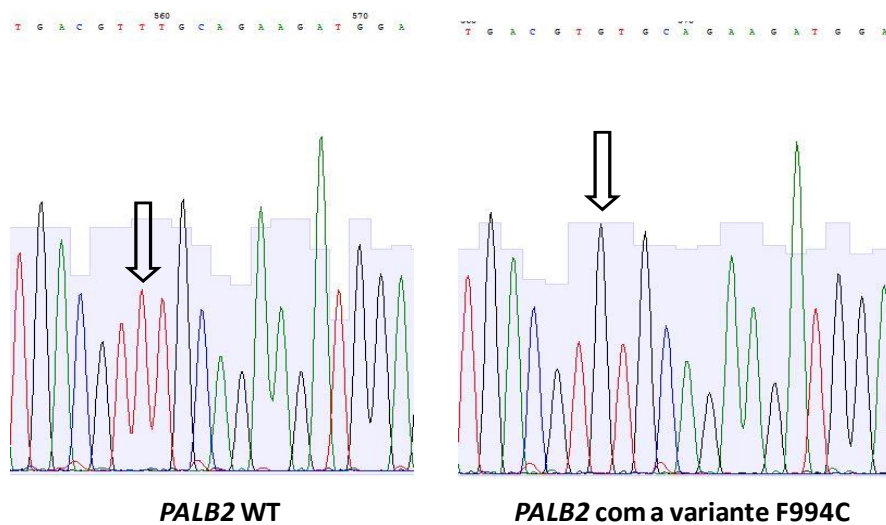
**Figura 11.** *Western Blot* para avaliar a expressão de PALB2 (~131 kDa) nos clones isolados por *Single Cell Sorting* da linhagem HS578T dentre aqueles que apresentaram redução de expressão de PALB2 na primeira avaliação. Foram utilizadas extrações proteicas da linhagem HS578T WT, HS578T clone IRA1, transfetado apenas com o plasmídeo sem os gRNAs e os clones A1, A2, A4, e A7 isolados a partir do *Single Cell Sorting* de clones com baixa expressão de PALB2 na linhagem HS578T.

### 6.1.3. Inserção das variantes em *PALB2*

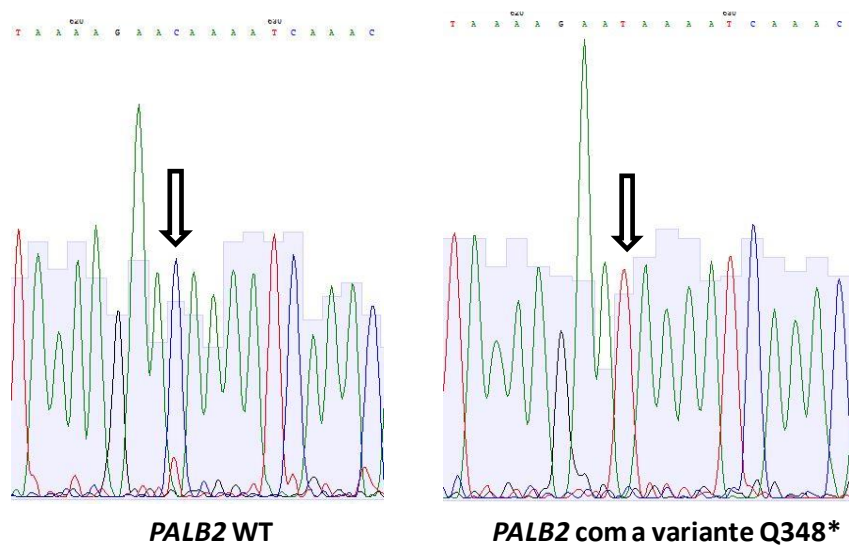
Através da técnica de mutagênese sítio-dirigida, foram inseridas as variantes L939W, F994C e Q348\*. Após a confirmação da inserção pelo sequenciamento de Sanger (Figuras 12, 13 e 14), apenas a região em que se encontrava a sequência de *PALB2* foi amplificada e inserida no plasmídeo pCI-neo através de clonagens. As colônias selecionadas por ampicilina (antibiótico de resistência do plasmídeo) passaram por um *screening* através do perfil de bandas exibido após uma clivagem com enzima de restrição. Foi realizado, na sequência, o *screening* de 6 clones com a ligação de pCI-neo e *PALB2* com a variante Q348\*, 126 clones com a ligação para *PALB2* com a variante L939W, 15 clones com a ligação para *PALB2* com a variante F994C e 210 clones com a ligação para *PALB2* WT, para que fossem confirmados plasmídeos que contivessem a inserção do gene no sentido *sense* em cada uma das condições (Figura 15). Para todos os casos o gene foi sequenciado para a confirmação de que nenhuma outra variante havia sido inserida de forma acidental. Depois de confirmada a inserção correta e a ausência de inserção de outras variantes, os clones foram amplificados para que pudessem ser transfetados nas linhagens T47D e HS578T *knockdown* ou *knockout* para *PALB2*.



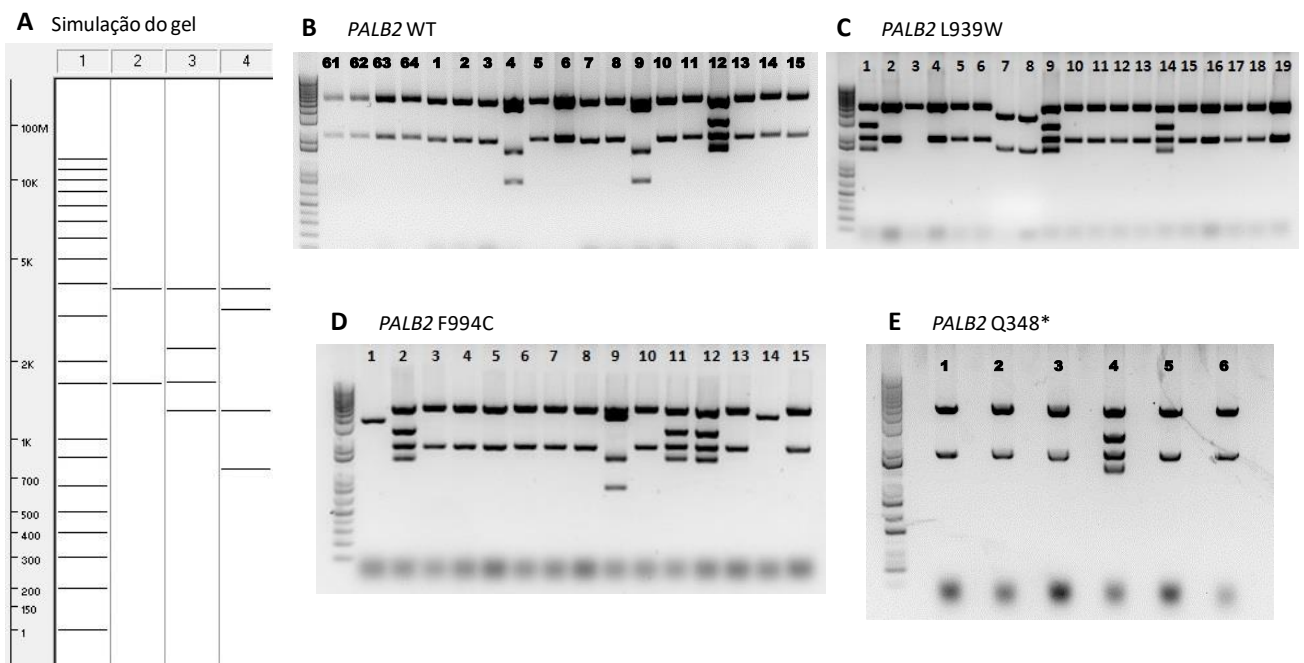
**Figura 12.** Eletroferograma do plasmídeo pDEST-FRT/TO-FLAG-PALB2. À esquerda o plasmídeo sem variantes e à direita o plasmídeo com a variante L939W (c.2816T>G). As flechas pretas indicam o local da troca de bases.



**Figura 13.** Eletroferograma do plasmídeo pDEST-FRT/TO-FLAG-PALB2. À esquerda o plasmídeo sem variantes e à direita o plasmídeo com a variante F994C (c.2981T>G). As flechas pretas indicam o local da troca de bases.



**Figura 14.** Eletroferograma do plasmídeo pDEST-FRT/TO-FLAG-PALB2. À esquerda o plasmídeo sem variantes e à direita o plasmídeo com a variante Q348\* (c.1042C>T). As flechas pretas indicam o local da troca de bases.



**Figura 15.** Gel de eletroforese para rastreamento do plasmídeo pCI-neo com *PALB2* com variantes. **A** - Gel simulado no programa Vector NTI, com as colunas do marcador (1), pCI-neo sem a inserção de *PALB2* (2), pCI-neo com *PALB2* inserido no sentido *sense* (3) e *PALB2* inserido no sentido *antisense*. **B** - Rastreamento de clones do pCI-neo com *PALB2* WT, obtendo um clone com inserção do gene no sentido *sense* (12) e dois clones com inserção do gene no sentido *antisense* (4 e 9). **C** - Rastreamento de clones do pCI-neo com *PALB2* com a variante L939W, obtendo três clones com a inserção do gene no sentido *sense* (1, 9 e 14). **D** - Rastreamento de clones do pCI-neo com *PALB2* com a variante F994C, obtendo três clones com inserção do gene no sentido *sense* (2, 11 e 12) e um clone com inserção do gene no sentido *antisense* (9). **E** - Rastreamento de clones do pCI-neo com *PALB2* com a variante Q348\*, obtendo um clone com a inserção do gene no sentido *sense* (4).



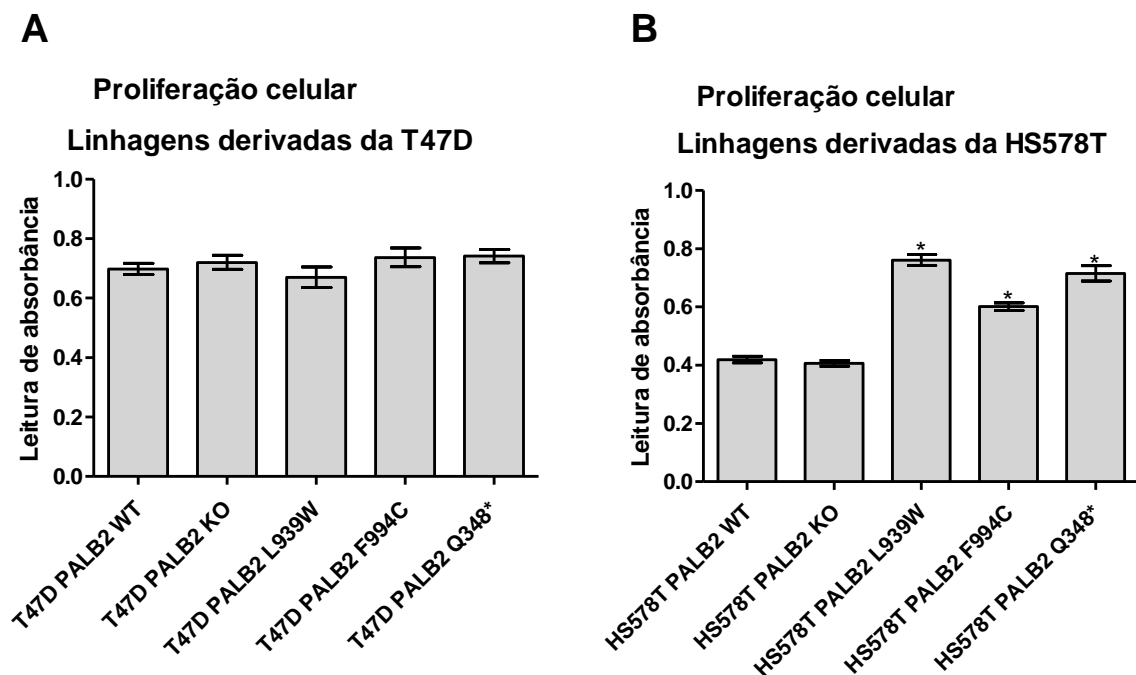
## 6.2. Ensaios Funcionais

### 6.2.1. Proliferação celular

Para analisar a proliferação celular, foi realizado o ensaio de proliferação através da incorporação de BrdU ao DNA, o qual retrata a proliferação celular no tempo de 24 horas.

Ao analisarmos as linhagens derivadas da T47D, podemos observar que não houve diferença estatística entre a linhagem com *PALB2* WT e àquelas editadas. No entanto, verificamos um ligeiro aumento na proliferação celular das linhagens *PALB2* KO e com as variantes F994C (variante de interesse) e Q348\* (variante patogênica) em relação àquela com *PALB2* WT. Ainda notamos que na linhagem em que o gene foi editado com a variante L939W, a proliferação foi diminuída em relação àquela com o gene WT (Figura 16A).

No que diz respeito às linhagens derivadas da HS578T, podemos verificar um aumento significativo na proliferação celular das linhagens onde *PALB2* foi reconstituído com as variantes L939W, F994C e Q348\* em relação à linhagem com *PALB2* WT. Não foi observada diferença entre as linhagens WT e *knockout* para o gene (Figura 16B).

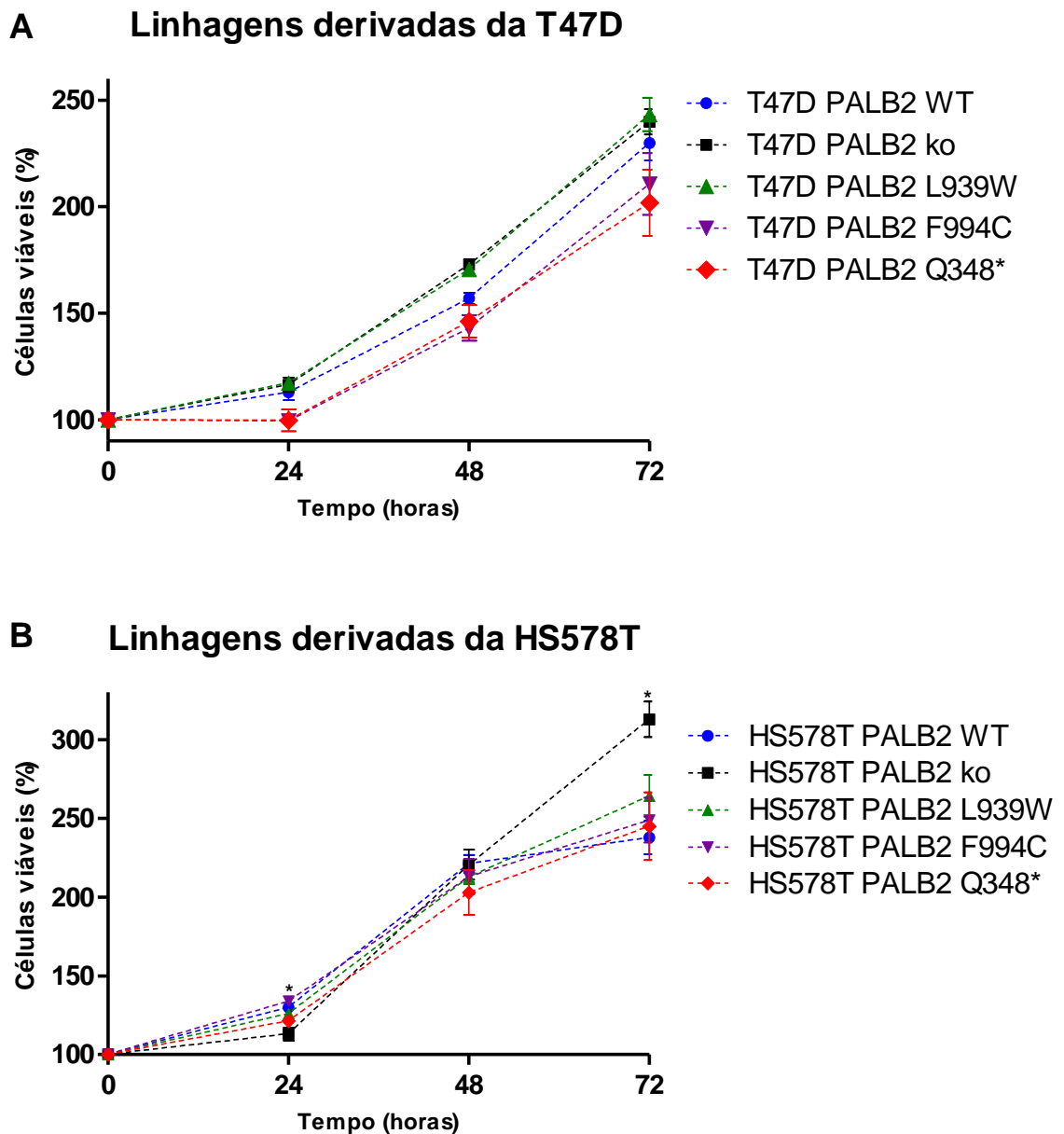


**Figura 16.** Proliferação celular no tempo de 24 horas através da incorporação de BrdU ao DNA. **A** - Proliferação celular das linhagens T47D PALB WT, T47D PALB2 KO, T47 PALB2 L939W, T47D PALB F994C e T47D PALB2 Q348\*, todas derivadas da linhagem comercial T47D. **B** - Proliferação celular nas linhagens HS578T PALB WT, HS578T PALB2 KO, T47PALB2 L939W, HS578T PALB F994C e HS578T PALB2 Q348\*, todas derivadas da linhagem comercial HS578T. Foram consideradas significantes as diferenças que apresentavam  $p < 0,05$  (\*) em relação às linhagens com PALB2 WT (controle).

### 6.2.2. Proliferação indireta e viabilidade celular

A viabilidade celular foi analisada nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas e representada em um gráfico onde podemos inferir a proliferação indireta das células, através do metabolismo do MTS. Quando levamos em consideração as linhagens derivadas da T47D, notamos que as linhagens que possuem as variantes F994C e Q348\* (patogênica) no gene *PALB2*, possuem uma porcentagem de células viáveis menor do que aquelas células que possuem o gene WT. Já as linhagens com a deleção do gene e com a modificação L939W apresentam maior porcentagem de células viáveis. Esse fenômeno também ocorre nos tempos de 48 e 72 horas e as linhagens seguem o mesmo padrão de curva de proliferação (Figura 17A). No entanto, nenhuma das linhagens apresentou viabilidade com diferença estatisticamente significativa em relação à WT nos tempos avaliados.

Em relação às linhagens derivadas da HS578T, podemos observar que no tempo de 24 horas, aquela com *PALB2* deletada possui menor porcentagem de células viáveis em comparação com a linhagem que expressa a construção selvagem. No entanto, ao final de 72 horas, notamos um aumento de células viáveis quando ocorre o *knockout* para o gene, nos indicando que a proliferação nessa condição, se dá mais lentamente quando comparamos às demais. Além disso, com o tempo de 24 horas, somente células com a variante F994C em *PALB2* apresentava um número maior de células viáveis quando comparávamos com células WT, mas ao final de 72 horas, a linhagem WT foi a que apresentou menor porcentagem de células viáveis dentre todas. A linhagem KO apresentou viabilidade com diferença estatisticamente significativa em relação à WT nos tempos de 24 e 72 horas.



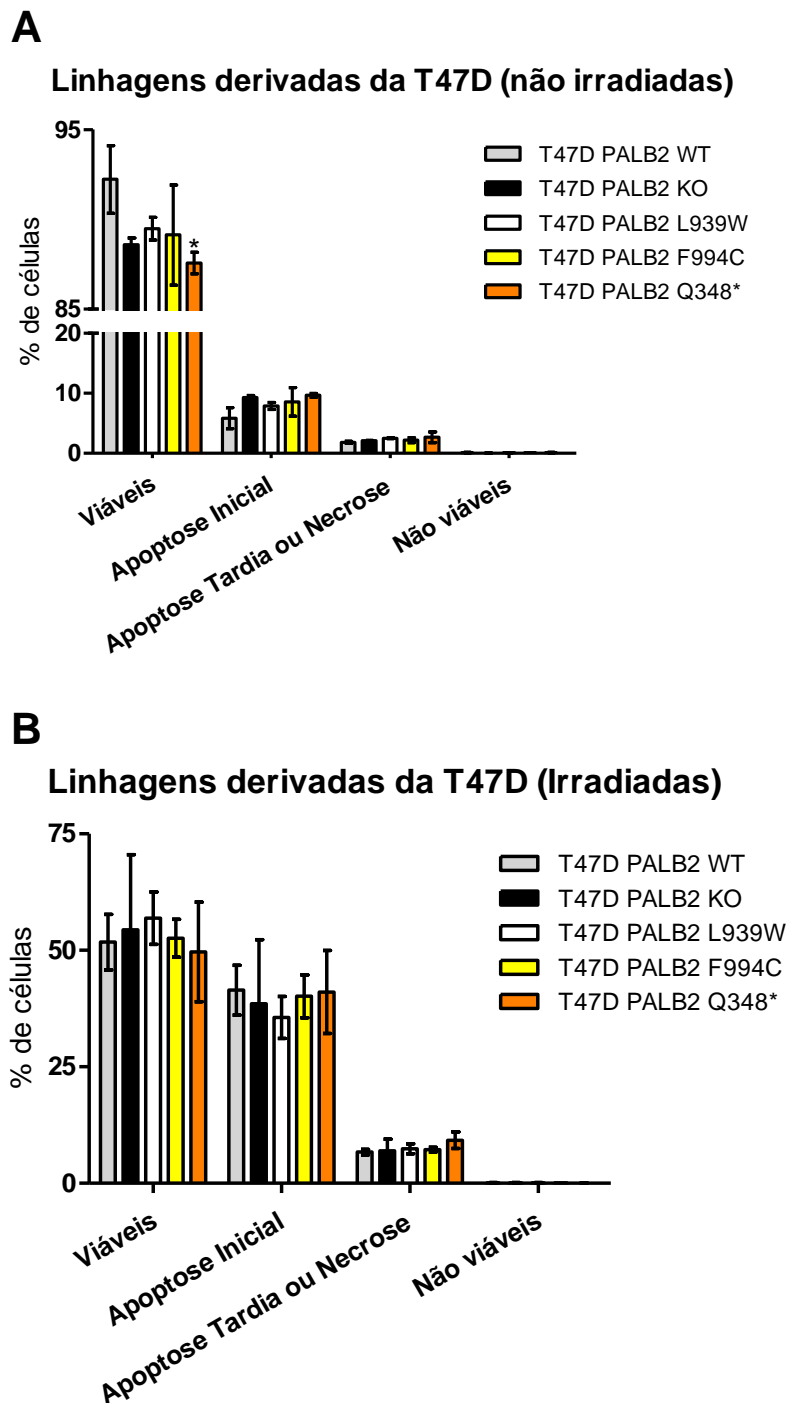
**Figura 17.** Viabilidade celular nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas através do metabolismo do MTS. **A** - Viabilidade celular das linhagens T47D PALB WT, T47D PALB2 KO, T47 PALB2 L939W, T47D PALB F994C e T47D PALB2 Q348\*, todas derivadas da linhagem comercial T47D. **B** - Viabilidade celular das linhagens HS578T PALB WT, HS578T PALB2 KO, T47PALB2 L939W, HS578T PALB F994C e HS578T PALB2 Q348\*, todas derivadas da linhagem comercial HS578T. Foram consideradas significantes as diferenças que apresentavam  $p < 0,05$  (\*) em relação às linhagens com PALB2 WT (controle).

### 6.2.3. Análise de apoptose por citometria de fluxo

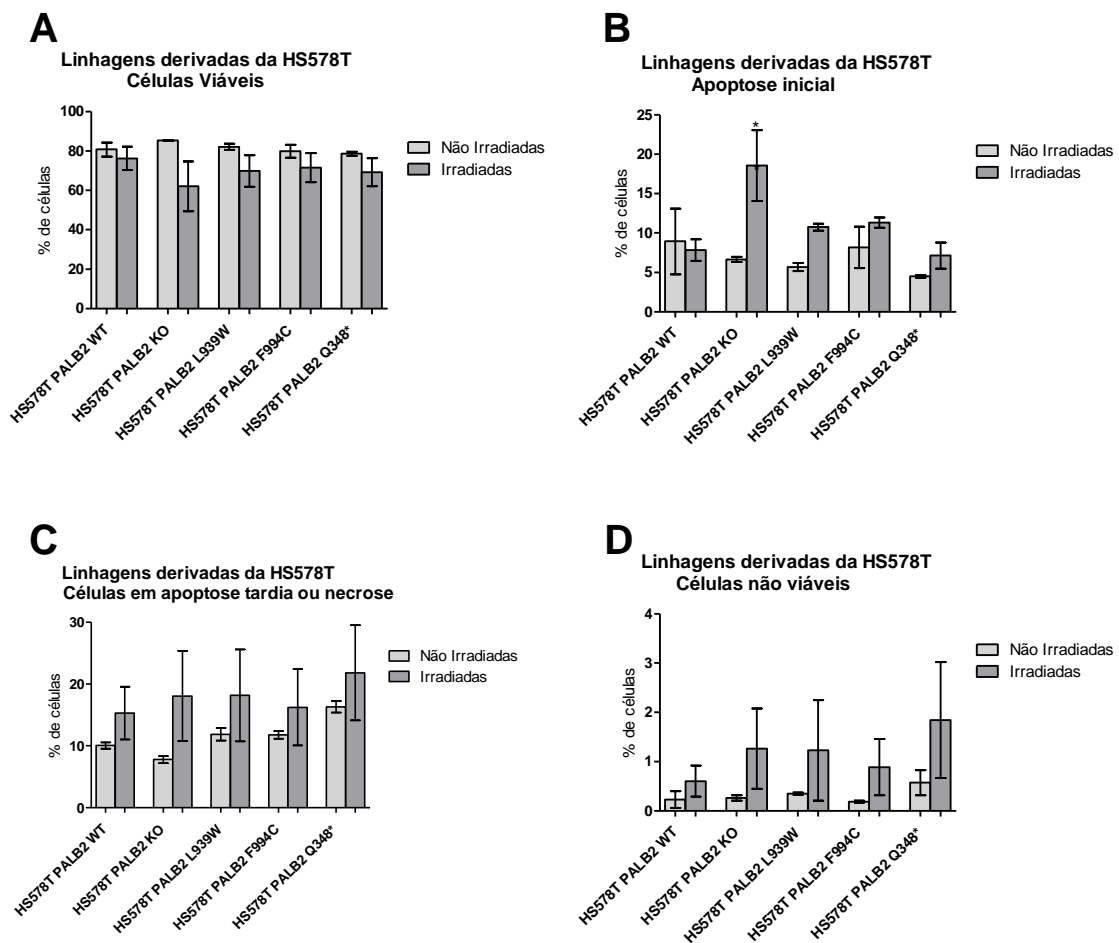
A morte celular foi avaliada através do mecanismo de apoptose a fim de investigar se as variantes presentes no gene *PALB2* eram capazes de aumentar ou diminuir a porcentagem de células que entram em apoptose ou estão em apoptose tardia.

Para as linhagens derivadas da T47D que não foram irradiadas, observamos que as condições *PALB2* KO e com as variantes L939W, F994C e Q348\* apresentam uma diminuição da porcentagem de células viáveis, mas somente aquela que apresenta a variante patogênica (Q384\*) apresenta diferença significativa em relação à linhagem WT. Quando avaliamos a porcentagem de células em apoptose inicial, apesar de não encontrarmos diferenças estatisticamente significantes entre as linhagens, notamos que aquelas *PALB2* KO e com as variantes, apresentam maior porcentagem de células nesta condição do que aquela WT (Figura 18A). Quando observamos as células derivadas de T47D irradiadas, não são observadas diferenças estatísticas significantes em nenhum dos grupos (Figura 18B), apesar de observarmos que a linhagem *PALB2* WT apresentar menor porcentagem de células viáveis e maior porcentagem de células em apoptose inicial do que aquelas *PALB2* KO ou com as variantes, diferente do que acontece quando essas mesmas linhagens não são irradiadas.

Ao compararmos as linhagens derivadas da T47D que foram ou não irradiadas entre os grupos viáveis, células em apoptose inicial, apoptose tardia ou necrose e células não viáveis, notamos que, quando irradiadas, todas as células apresentam menor porcentagem de células viáveis e apresentam diferença estatisticamente significativa quando comparadas às mesmas linhagens não irradiadas (Figura 19A). Em relação à apoptose inicial, todas as linhagens apresentam diferença estatisticamente significativa quando comparamos as irradiadas com as não irradiadas, sendo as irradiadas aquelas que apresentam maior porcentagem de células em apoptose (Figura 19B). Apesar de apenas as variantes F994C e Q348\* apresentarem diferença estatística significativa quando comparamos células irradiadas e não irradiadas, ao observarmos as porcentagens de células em apoptose tardia ou necrose, vemos um aumento da porcentagem de células nesta condição entre aquelas que estão irradiadas (Figura 19C). Com relação às células não viáveis, não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre linhagens irradiadas e não irradiadas, mas notamos que existe uma maior porcentagem de células não viáveis na linhagem com *PALB2* KO irradiada quando comparada àquela não irradiada, mostrando um fenômeno diferente do que o encontrado nas outras linhagens (Figura 19D).



**Figura 18.** Avaliação de morte celular por apoptose em células derivadas da linhagem T47D não irradiadas ou irradiadas no tempo de 96 horas. **A** - Porcentagem de células viáveis e células que entraram em apoptose nas linhagens derivadas de T47D não irradiadas, sendo em cinza células com *PALB2* WT, em preto *PALB2* KO, em branco *PALB2* com a variante L939W, em amarelo *PALB2* com a variante F994C e em laranja *PALB2* com a variante Q348\*. **B** - Porcentagem de células viáveis e células que entraram em apoptose nas linhagens derivadas de T47D irradiadas, sendo em cinza células com *PALB2* WT, em preto *PALB2* KO, em branco *PALB2* com a variante L939W, em amarelo *PALB2* com a variante F994C e em laranja *PALB2* com a variante Q348\*. Foram consideradas significantes as diferenças que apresentavam  $p < 0,05$  (\*) em relação às linhagens com *PALB2* WT (controle).

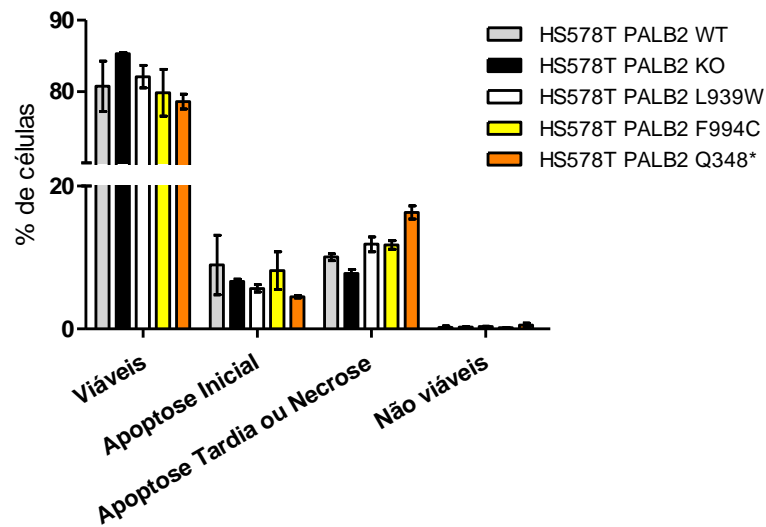
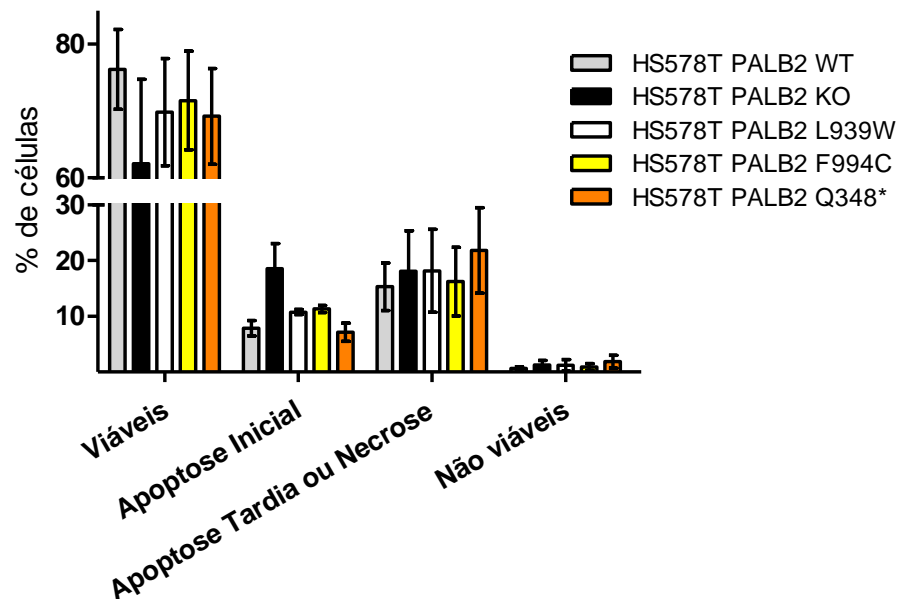


**Figura 19.** Comparação da porcentagem de morte celular por apoptose em células derivadas da linhagem T47D não irradiadas (cinza claro) ou irradiadas (cinza escuro) no tempo de 96 horas. **A** - Comparação da porcentagem de células viáveis nas linhagens derivadas de T47D não irradiadas (cinza claro) e irradiadas (cinza escuro). **B** - Comparação da porcentagem de células em apoptose inicial nas linhagens derivadas de T47D não irradiadas (cinza claro) e irradiadas (cinza escuro). **C** - Comparação da porcentagem de células em apoptose tardia ou necrose nas linhagens derivadas de T47D não irradiadas (cinza claro) e irradiadas (cinza escuro). **D** - Comparação da porcentagem de células não viáveis nas linhagens derivadas de T47D não irradiadas (cinza claro) e irradiadas (cinza escuro). Foram consideradas significantes as diferenças que apresentavam  $p < 0,05$  (\*) em relação às linhagens com PALB2 WT (controle).  $p < 0,01$  (\*\*).

Na análise de morte celular por apoptose em linhagens derivadas da HS578T, observamos que não há diferença significativa entre as linhagens não irradiadas. No entanto, notamos uma porcentagem maior de células *PALB2* KO, e com a variante L939W, viáveis em comparação àquelas *PALB2* WT. Em contrapartida, a porcentagem de células em apoptose inicial é maior na linhagem com a sequência do gene WT, enquanto aquela com a variante Q348\* (patogênica) apresenta a maior porcentagem de células em apoptose tardia ou necrose, seguida das linhagens com as variantes L939W e F994C (Figura 20A).

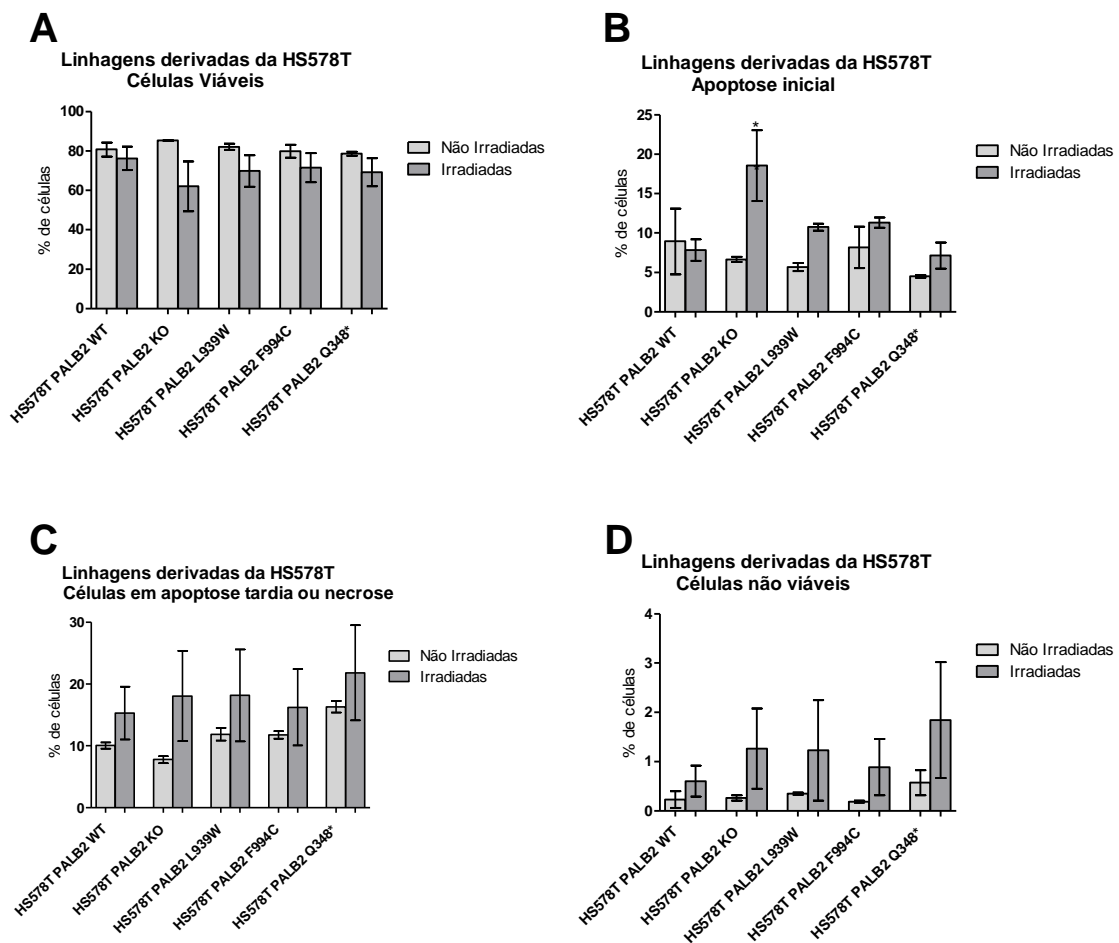
Quando as linhagens derivadas de HS578T são irradiadas, novamente não observamos nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as condições, no entanto, observamos que ocorre o fenômeno inverso ao de quando as linhagens não são irradiadas. Temos uma porcentagem maior de células *PALB2* WT viáveis, em comparação às demais linhagens, sendo àquela *PALB2* KO a com menor porcentagem nesta condição. Ao analisarmos as células em apoptose inicial, a linhagem *PALB2* WT é a que apresenta menor porcentagem de células, sendo a *PALB2* KO com maior porcentagem nesta condição, seguida das linhagens com as variantes L939W e F994C, respectivamente. Já na condição de apoptose tardia ou necrose, notamos uma maior porcentagem de células com a variante Q348\* (patogênica), seguida da linhagem *PALB2* KO e das linhagens com as variantes L939W e F994C, sendo a linhagem *PALB2* WT a que apresenta menor porcentagem de células nesta condição (Figura 20B).

Assim como nas linhagens derivadas de T47D, também analisamos cada linhagem comparando as condições irradiada e não irradiada. Entre as células viáveis, não houve diferença significativa quando comparamos as linhagens irradiadas com as não irradiadas. No entanto, em todas as linhagens, a porcentagem de células viáveis era maior quando não estavam irradiadas (Figura 21A). Entre as células em apoptose inicial, observamos diferença estatisticamente significativa quando a linhagem *PALB2* KO é irradiada em comparação à mesma linhagem não irradiada, fazendo com que a porcentagem de células irradiadas em apoptose inicial seja maior. Com exceção da linhagem *PALB2* WT, todas as outras linhagens também apresentaram porcentagens maiores de células em apoptose inicial quando irradiadas em comparação às não irradiadas (Figura 21B). Ao analisarmos as células que se apresentavam em apoptose tardia ou necrose, todas as linhagens possuem uma porcentagem maior de células nesta condição após terem sido irradiadas, apesar de não encontrarmos diferença significativa do ponto de vista estatístico. Podemos destacar a linhagem com a variante Q348\*, seguida das linhagens *PALB2* KO e com a variante L393W, as quais apresentam as maiores porcentagens de células nesta condição (Figura 21C). Entre as células não viáveis, novamente, não encontramos diferença significativa entre linhagens irradiadas e não irradiadas, mas, assim como nas linhagens em apoptose tardia ou necrose, observamos maior número de células nesta condição na linhagem com a variante Q348\*, seguida das linhagens *PALB2* KO e com a variante L939W (Figura 21D).

**A****Linhagens derivadas da HS578T (não irradiadas)****B****Linhagens derivadas da HS578T (irradiadas)**

**Figura 20.** Avaliação de morte celular por apoptose em células derivadas da linhagem HS578T não irradiadas ou irradiadas no tempo de 96 horas. **A** - Porcentagem de células viáveis e células que entraram em apoptose nas linhagens derivadas de HS578T não irradiadas, sendo em cinza células com *PALB2* WT, em preto *PALB2* KO, em branco *PALB2* com a variante L939W, em amarelo *PALB2* com a variante F994C e em laranja *PALB2* com a variante Q348\*. **B** - Porcentagem de células viáveis e células que entraram em apoptose nas linhagens derivadas de HS578T irradiadas, sendo em cinza células com *PALB2* WT, em preto *PALB2* KO, em branco *PALB2* com a variante L939W, em amarelo *PALB2* com a variante F994C e em laranja *PALB2* com a variante Q348\*. Foram consideradas significantes as diferenças que apresentavam  $p < 0,05$  (\*) em relação às linhagens com *PALB2* WT (controle).





**Figura 21.** Comparação da porcentagem de morte celular por apoptose em células derivadas da linhagem HS578T não irradiadas (cinza claro) ou irradiadas (cinza escuro) no tempo de 96 horas. **A** - Comparação da porcentagem de células viáveis nas linhagens derivadas de HS578T não irradiadas (cinza claro) e irradiadas (cinza escuro). **B** - Comparação da porcentagem de células em apoptose inicial nas linhagens derivadas de HS578T não irradiadas (cinza claro) e irradiadas (cinza escuro). **C** - Comparação da porcentagem de células em apoptose tardia ou necrose nas linhagens derivadas de HS578T não irradiadas (cinza claro) e irradiadas (cinza escuro). **D** - Comparação da porcentagem de células não viáveis nas linhagens derivadas de HS578T não irradiadas (cinza claro) e irradiadas (cinza escuro). Foram consideradas significantes as diferenças que apresentavam  $p < 0,05$  (\*) em relação às linhagens com PALB2 WT (controle).

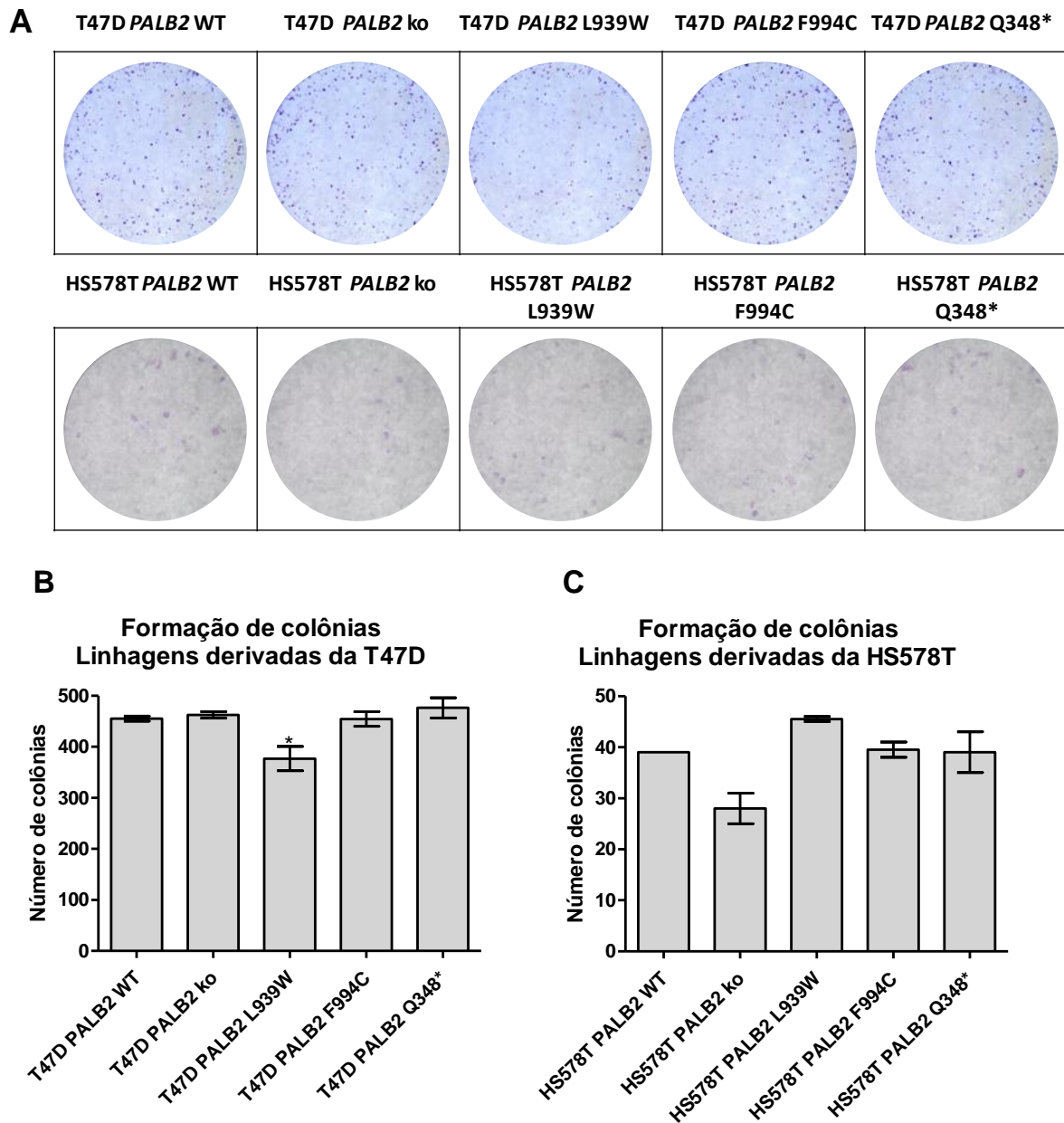
#### 6.2.4. Análise de capacidade de formação de colônias

Foram realizados ensaios clonogênicos para analisar a capacidade de formação de colônias das linhagens editadas (Figura 22A). Os ensaios foram mensurados de duas maneiras diferentes, através da contagem das colônias e também através da leitura da absorbância resultante do descolorimento do cristal violeta presente nas colônias.

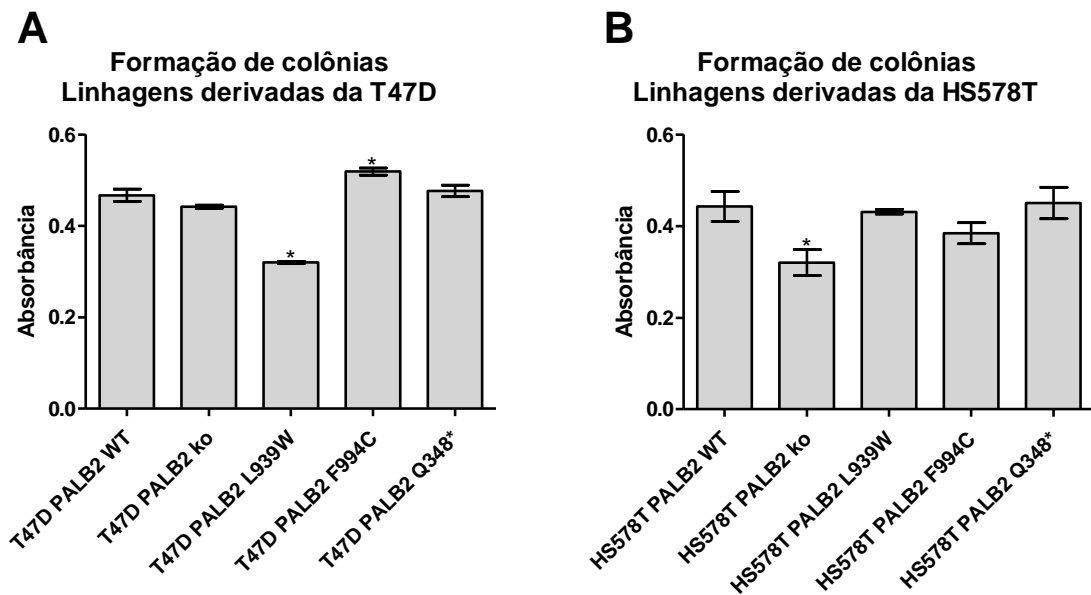
Com relação à análise realizada através da contagem de colônias formadas pelas diferentes linhagens, observamos uma diferença estatisticamente significativa no número de

colônias da linhagem T47D com *PALB2* contendo a variante L939W, que teve sua capacidade de formar colônias diminuída, quando comparada com a linhagem que possui o gene WT (Figura 22B). Para as linhagens derivadas da HS578T, não obtivemos significância estatística, no entanto, verificamos uma elevada diminuição no número de colônias formadas pela linhagem *knockout* para *PALB2* e um aumento no número de colônias formadas pela linhagem em que o gene apresenta a variante L939W (Figura 22C).

Na análise realizada por espectrofotometria para as linhagens derivadas da T47D, a linhagem com a variante F994C apresentou uma maior capacidade de formação de colônias, quando comparada àquela que possui o gene WT. Já a linhagem com a variante L939W apresentou uma menor capacidade de formar colônias quando comparada à linhagem *PALB2* WT (Figura 23A). Para as linhagens derivadas da HS578T, a linhagem *PALB2* KO apresentou uma menor capacidade de formação de colônias quando comparada à linhagem com o *PALB2* WT, e, apesar de não ter apresentado diferença estatística significativa, a linhagem que possui a variante L939W no gene demonstrou uma maior capacidade de formação de colônias quando comparada à linhagem com o gene WT (Figura 23B).



**Figura 22.** Capacidade de formação de colônias das linhagens com *PALB2* editado através da contagem do número de colônias existentes. **A** - Representação das colônias obtidas com as diferentes linhagens. **B** - Número de colônias apresentadas pelas linhagens T47D *PALB2* WT, T47D *PALB2* KO, T47D *PALB2* L939W, T47D *PALB2* F994C e T47D *PALB2* Q348\*, todas derivadas da linhagem comercial T47D. **C** - Número de colônias apresentadas pelas linhagens HS578T *PALB2* WT, HS578T *PALB2* KO, HS578T *PALB2* L939W, HS578T *PALB2* F994C e HS578T *PALB2* Q348\*, todas derivadas da linhagem comercial HS578T. Foram consideradas significantes as diferenças que apresentavam  $p < 0,05$  (\*) em relação às linhagens com *PALB2* WT (controle).



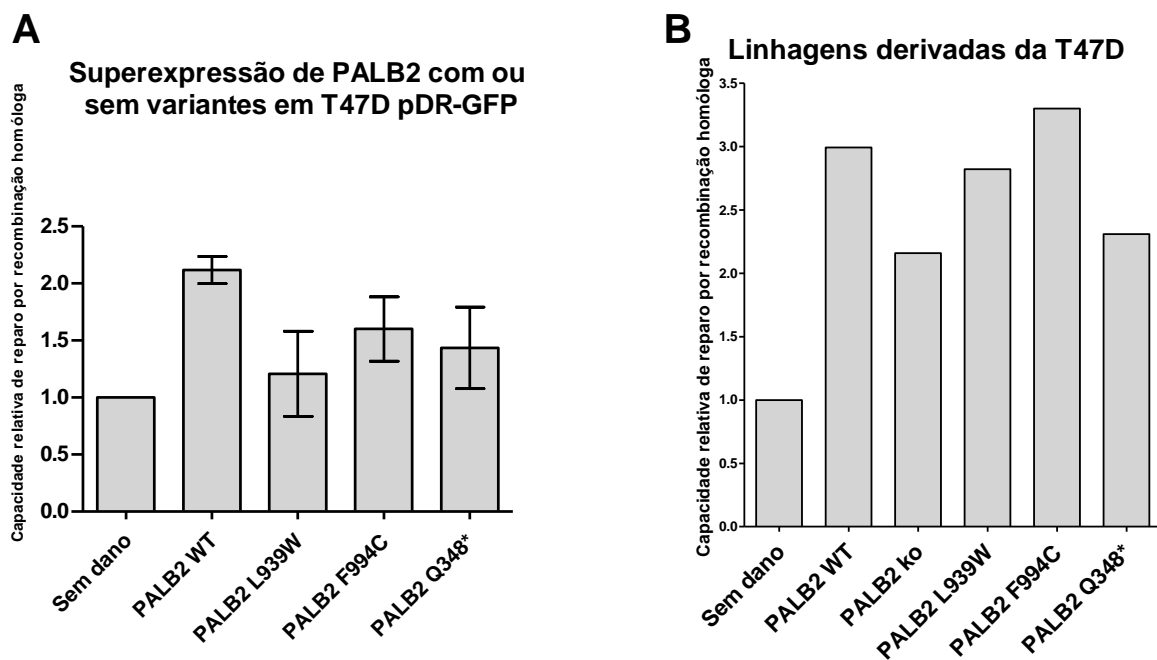
**Figura 23.** Capacidade de formação de colônias das linhagens com *PALB2* editado através da leitura da absorbância. **A** - Absorbância das linhagens T47D PALB WT, T47D PALB2 KO, T47D PALB2 L939W, T47D PALB2 F994C e T47D PALB2 Q348\*, todas derivadas da linhagem comercial T47D. **B** - Absorbância das linhagens HS578T PALB WT, HS578T PALB2 KO, HS578T PALB2 L939W, HS578T PALB2 F994C e HS578T PALB2 Q348\*, todas derivadas da linhagem comercial HS578T. Foram consideradas significantes as diferenças que apresentavam  $p < 0,05$  (\*) em relação às linhagens com PALB2 WT (controle).

### 6.2.5. Capacidade de realizar reparo de danos ao DNA através da recombinação homóloga

Para que pudéssemos analisar se as linhagens com *PALB2* editado ainda seriam capazes de realizar uma das principais funções na qual o gene está envolvido, avaliamos a capacidade de realizar reparo de danos ao DNA através da recombinação homóloga de duas maneiras diferentes.

Quando consideramos a análise realizada com a linhagem T47D que possui pDR-GFP constitutivo através da superexpressão de *PALB2* WT ou com as variantes L939, F994C e Q348\*, observamos que a linhagem com a superexpressão do gene WT dobra a taxa de evento de recombinação homóloga, quando comparamos à linhagem onde não há dano causado por pBASceI, e um fenômeno semelhante ocorre com a superexpressão de *PALB2* com a variante F994C. Em contrapartida, nos casos em que *PALB2* foi superexpresso com as variantes L939W e Q348\* (patôgena), as taxas de recombinação homóloga são semelhantes à situação onde não ocorre dano ao DNA, ou seja, as taxas se mantêm assim como as basais, nos indicando uma deficiência no reparo de danos por essa via (Figura 24A).

Ao verificarmos a análise realizada com as linhagens derivadas da T47D e estabelecidas com as variantes em *PALB2* (Figura 24B), notamos que as linhagens *PALB2* KO e com a variante Q348\* demonstram comportamento semelhante, com uma taxa de reparo maior do que o controle sem dano, porém menor do que as demais linhagens. A linhagem com a variante L939W apresenta uma taxa maior do que as duas citadas anteriormente, e menor do que a linhagem *PALB2* WT. Já a linhagem com a variante F994C apresenta uma taxa de recombinação homóloga maior do que a linhagem com o gene WT (Figura 24B).



**Figura 24.** Capacidade relativa de realizar reparo de danos do DNA por recombinação homóloga. **A** - Análise da taxa relativa de reparo ao DNA por de recombinação homóloga através da superexpressão de *PALB* WT ou com as variantes L939W, F994C e Q348\* na linhagem T47D com pDR-GFP constitutivo estabelecida pelo grupo. A linhagem estável com pDR-GFP que não recebeu o dano (a transfecção do plasmídeo pBAScel) recebe o valor de 1 e os valores das demais condições são relativos à condição sem dano. **B** - Análise da taxa de reparo ao DNA por recombinação homóloga através co-transfecção do plasmídeo pDR-GFP e do plasmídeo pBAScel, que promove uma ruptura de dupla fita sitio-específica por digestão enzimática (dano) no DNA nas linhagens derivadas da T47D com *PALB2* WT, *PALB2* KO, *PALB2* com a variante L939W, *PALB* com a variante F994C ou *PALB2* com a variante Q348\*. As linhagens sem indução de dano recebem o valor de 1 e os valores das demais condições são relativos à condição sem dano.

Não foi possível realizar nenhuma das análises com relação ao reparo por recombinação homóloga para as linhagens derivadas da HS578T porque ao normalizar os resultados das transfecções, estes ficaram abaixo dos níveis esperados para a detecção do método, conforme descrito por Seluanov, Mao e Gorbunova (2010)<sup>72</sup> para fibroblastos, (0,05

a 0,3). Novas estratégias estão sendo testadas para que o ensaio possa ser realizado para essa linhagem.

## 7. DISCUSSÃO

Levando em consideração a importância que o gene *PALB2* vem ganhando no cenário do câncer de mama hereditário, principalmente o feminino, este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto biológico de duas variantes, presentes em mulheres com alto risco para câncer de mama hereditário, que eram negativas para variantes patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. As variantes selecionadas foram L939W, descrita no ClinVar como VUS, e F994C, nunca antes descrita no ClinVar. Para isso, foram realizados uma série de ensaios funcionais, uma vez que eles são poderosas ferramentas no auxílio da classificação de variantes, e podem, juntamente com dados sobre o tipo e localização da variante, dados clínicos, de bancos de dados, frequência populacional e análises *in silico*, levar à determinação do impacto biológico de uma dada variante e conseqüentemente, à classificação da mesma. Além disso, segundo o ACMG, resultados provenientes de ensaios *in vitro* e *in vivo* seriam a melhor forma de determinar o papel de variantes genéticas na saúde humana<sup>59</sup>.

Vale ressaltar, que, ao nosso conhecimento, essa é a primeira vez que uma das variantes em *PALB2* aqui estudadas, F994C, é reportada e, portanto, caracterizada quanto aos diversos processos biológicos. Apesar disso, foi encontrada uma variante na mesma posição, c.2981T>A (p.Phe994Tyr ou F994Y), não descrita no *ClinVar*, presente em três indivíduos da população turca<sup>75</sup>. A paciente portadora da variante F994C (identificada em estudo prévio do nosso grupo), apresenta uma história pessoal e familiar bastante sugestiva para câncer de mama hereditário. São, ao todo, 11 tumores no lado paterno família (incluindo a probanda), sendo 9 indivíduos e quatro gerações afetadas. No lado materno, existem 6 casos de tumores (incluindo a probanda), totalizando 3 gerações afetadas. Somado a isso, não encontramos relatos de frequência da variante em bancos de dados populacionais (*1000 Genomes*, *Gnomad*, *FLOSSIES* e *ABraOM*), nos levando a crer que ela poderia apresentar patogenicidade.

Já a variante L939W, foi encontrada nas populações turca (2 indivíduos)<sup>75</sup>, espanhola (132 indivíduos)<sup>76</sup>, australiana (2 indivíduos)<sup>77</sup>, canadense descendente de franceses (96 indivíduos)<sup>78</sup> e norte-americana (7 indivíduos)<sup>79</sup>. Essa última variante não foi correlacionada ao risco para o câncer de mama<sup>75-77,79</sup>, no entanto, Guénard e

colaboradores (2010)<sup>78</sup> destacam que o aminoácido presente nessa posição na proteína selvagem (Leucina) é extremamente conservado em muitas espécies distantes evolutivamente. Esse fato nos leva a crer que exista uma restrição funcional ou mudança na conformação da proteína caso ela apresente diferenças em sua composição, o que poderia acarretar uma não funcionalidade<sup>78</sup>. Em nossa casuística essa variante foi identificada em uma família com associação de câncer de mama e pâncreas, sendo essa associação já relatada por famílias com<sup>33</sup>.

A localização das variantes de interesse é um fator importante, já que ambas estão presentes no domínio WD40, importante para as principais interações proteicas de PALB2, principalmente com BRCA2, RAD51 e RAD51C, que estão envolvidas na RH. Isso faz com que variantes presentes neste domínio tenham grandes chances de serem consideradas patogênicas, já que podem afetar a principal função da proteína, sendo necessários cada vez mais estudos funcionais para a re-classificação daquelas que são consideradas VUS<sup>49</sup>.

Nesse tipo de avaliação, é comum que se utilizem linhagens ou modelo *in vivo knockout* para o gene endógeno, ou com deficiência na expressão da proteína, em que as variantes estejam presentes, afim de comparação de funcionalidade da proteína<sup>32,50,54</sup>. Portanto, no presente estudo, um dos objetivos era criar linhagens *knockout* para o gene *PALB2*. Esse objetivo foi alcançado para a linhagem HS578T (Figura 11), no entanto, para a T47D, não conseguimos eliminar a expressão do gene, obtendo uma linhagem *knockdown*, isto é, com uma expressão bastante reduzida do gene *PALB2* (apesar de ser chamada de ko ao longo do estudo) (Figura 8). Ainda que alguns trabalhos consigam suprimir a expressão de seus genes de interesse, muitas vezes esse processo demanda bastante tempo, trazendo certa dificuldade para o estabelecimento dessas linhagens<sup>54,80</sup>. Independente de não termos conseguido a deleção de *PALB2* na linhagem T47D, entendemos que as inserções das variantes não seriam prejudicadas uma vez que elas se dariam através da transfecção do plasmídeo pCI-neo com o gene apresentando cada uma das condições. Esse plasmídeo promove a expressão constitutiva do inserto de interesse em células de mamíferos, através de promotores *Cytomegalovirus* (CMV)<sup>81</sup>, que possuem alta eficiência de expressão em uma variedade de tecidos<sup>82</sup>, nos levando a crer que seu poder de expressão proteica



seria maior do que aquela apresentada pelo gene endógeno *knockdown* em uma competição. A partir do estabelecimento das linhagens, pudemos avaliar o impacto das variantes no gene *PALB2*.

Diante do exposto, comparamos todos os resultados obtidos nos ensaios realizados com linhagens modificadas contendo as variantes de interesse, à linhagem com a variante Q348\* (variante que leva à formação de uma proteína truncada e dessa maneira, provavelmente não funcional) assim como a linhagem com a sequência codificante de *PALB2* WT, e à linhagem *PALB2* KO, tanto daquelas derivadas da T47D, quando da HS578T.

Os processos biológicos que optamos por avaliar foram proliferação, viabilidade, clonogenicidade e apoptose. Além disso, uma avaliação de grande interesse foi a da capacidade de realizar reparo por recombinação homóloga, dado que se trata da principal função desempenhada por *PALB2*<sup>30,53,54</sup>.

Não foram encontradas diferenças na proliferação (Figura 16A) e viabilidade celular (Figura 17A) entre as linhagens derivadas da T47D. Com relação às linhagens derivadas da HS578T, observamos um aumento significativo na proliferação daquelas que apresentam as variantes de interesse, bem como a variante patogênica (Figura 16B). Curiosamente, a linhagem com *PALB2* KO não apresentou taxa de proliferação diferente daquela da WT. No entanto, ao observarmos a proliferação indireta através do ensaio de MTS, notamos que ao fim de 72 horas, essa linhagem apresenta o maior número de células viáveis (Figura 17B). Nossa hipótese é de que sua proliferação ocorra mais lentamente. Sendo assim, em 72 horas, enquanto todas as outras linhagens já atingiram confluência dos poços das placas e diminuem sua taxa metabólica por falta de espaço, a linhagem com *PALB2* KO ainda possui espaço para se proliferar, e assim, continua contando com um número crescente de células viáveis, com uma taxa de proliferação indireta em ascensão, diferente das demais, que já atingiram um platô.

Quando observamos a capacidade de formar colônias, entre as linhagens derivadas da T47D, aquela com a variante L939W apresenta menor capacidade de formar colônias ao ser comparada com a WT. Aquela com a variante F994C, tem sua capacidade de formar colônias aumentada em relação à WT, principalmente quando

realizamos a análise de absorvâncias destas. Além disso, HS578T com *PALB2* KO também tem sua capacidade de formar colônias prejudicada. Isso pode também é um indício de que sua proliferação ocorre mais lentamente quando comparada às demais linhagens, interferindo na sua capacidade de formar colônias (Figuras 21B e 22A). Recentemente, observou-se que as ligações *PALB2*-*BRCA1* e *PALB2*-*BRCA2* possuem um papel importante no *checkpoint* na fase G2/M. Com isso, quando qualquer uma dessas ligações é comprometida, a resposta neste *checkpoint* também é prejudicada<sup>82</sup>. Caso as variantes estejam presentes nos domínios de interação com essas proteínas, as linhagens podem apresentar uma proliferação exacerbada com um acúmulo de erros resultante da incapacidade de *PALB2* se ligar aos seus principais parceiros e, conseqüentemente, não ser capaz de reparar esses danos. Com o passar do tempo, células que passaram por esse *checkpoint* e continuaram a se proliferar podem acumular um grande número de variantes e anormalidades cromossômicas, gerando uma grande instabilidade, que pode ser associada ao desenvolvimento tumoral através de rápida proliferação<sup>83</sup>.

Ainda com relação à capacidade de formar colônias, foram realizadas duas análises diferentes e, embora as duas análises tenham sido realizadas com os dados obtidos dos mesmos experimentos, é importante salientar que pode haver diferenças entre seus resultados devido aos parâmetros avaliados. Apesar de percebermos pequenas diferenças entre as análises, os fenômenos se mantiveram em ambos os gráficos tanto para as linhagens derivadas de T47D, quanto para aquelas derivadas de HS578T. Isso ocorre porque a contagem do número de colônias leva em consideração apenas seu número absoluto, não sendo influenciado pelo tamanho dessas colônias. Já a análise por espectrofotometria, realizada com base na leitura da absorvância obtida pelo descoramento das colônias, é influenciada pelo seu tamanho, visto que quanto maior a colônia, mais corante ela retém. Os dados deste ensaio vão ao encontro dos dados obtidos no ensaio de proliferação, principalmente nas linhagens derivadas da T47D (diferindo apenas naquela com a variante L939W) onde não foram encontradas diferenças estatisticamente significante entre a proliferação das linhagens.

Em relação a morte celular por apoptose, quando comparamos as porcentagens de células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia ou necrose e não viáveis,

notamos que a porcentagem de células viáveis em 96 horas é maior na linhagem *PALB2* WT, enquanto apresenta níveis baixos naquelas *knockout* para o gene e que apresentam a variante Q348\*. Já naquelas que se encontram em apoptose inicial as linhagens *PALB2* KO, ou aquelas com qualquer uma das variantes apresentam maior porcentagem, nos indicando que aquelas células estão acumulando muitos erros e são endereçadas para a apoptose. Ao observarmos essas mesmas linhagens irradiadas, notamos que em comparação àquelas que não foram irradiadas, a porcentagem de células viáveis é menor e as porcentagens de células em apoptose inicial, tardia ou necrose é maior em todas as linhagens.

Para HS578T, observamos no ensaio de apoptose que, em condições normais (sem irradiação) as linhagens *PALB2* KO e com a variante L939W apresentam maior porcentagem de células viáveis, além de ambas as variantes apresentam maiores porcentagens de células em necrose quando comparadas à WT. Adicionalmente, quando irradiadas, observamos uma tendência de aumento na porcentagem de células em apoptose inicial para as duas variantes, e também em apoptose tardia ou necrose para a linhagem com a variante L939W. Semelhante ao que acontece nas linhagens derivadas da T47D, quando irradiadas, as linhagens que apresentam as variantes têm sua porcentagem de células viáveis menor e as porcentagens de células em apoptose inicial ou tardia maiores do que as linhagens não irradiadas. Com isso, podemos concluir que as variantes possuem pouca influência no processo de apoptose ou necrose quando as células não são irradiadas. No entanto, quando irradiadas, podemos observar um aumento nas porcentagens de células em cada estágio de apoptose inicial ou tardia (Figuras 18 e 20). Neste sentido, foi demonstrado que *piccolo* BRCA2 (piBRCA2) interage com PALB2 endógena e, em casos em que o domínio WD40 estava ausente em PALB2, a ligação entre piBRCA2 e PALB2 era impossibilitada, dificultando a futura invasão na quebra do DNA para a realização da RH<sup>53</sup>. Isso pode nos dar indícios de que a irradiação ionizante está induzindo quebras de dupla fita no DNA e aquelas linhagens *PALB2* KO ou com as variantes não estão sendo capazes de realizar o reparo nessas células, endereçando-as para a morte. Além disso, as variantes podem estar interferindo nas ligações com BRCA1 e BRCA2, fazendo com que as células passem pelo *checkpoint* da fase G2/M, regulada pelas ligações dessas proteínas

com PALB2 e, novamente, com um acúmulo de danos e uma alta instabilidade genômica, faz com que essas células sejam enviadas para a morte programada<sup>83</sup>.

Através dos resultados obtidos no ensaio de reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga por meio da superexpressão das variantes, observamos a deficiência na realização desta função na linhagem que expressa a variante L939W (Figura 24A), corroborando com o estudo de Park e colaboradores (2014), onde esta mesma variante fez com que a ligação do complexo PALB2-RAD51C-BRCA2 fosse rompida parcialmente, diminuindo a eficiência da realização do reparo por RH<sup>84</sup>. Por outro lado, um trabalho publicado por Catucci e colaboradores (2016), demonstrou que a eficiência do reparo por recombinação homóloga não é afetada quando *PALB2* apresenta a variante L939W<sup>85</sup>. No entanto, este último estudo traz dados de ensaios de reparo por RH realizados em uma linhagem de tumor mamário de rato (B400) para avaliar o impacto de uma proteína humana. Acreditamos, que no nosso caso, onde as linhagens celulares parentais são humanas, tenhamos uma proximidade maior do real impacto dessas variantes, por se tratar de uma proteína humana sendo expressa por uma linhagem proveniente de humana. Já foi demonstrado que alguns modelos animais, como os camundongos, apesar de demonstrarem grande similaridade com a fisiologia humana, podem apresentar diferenças em relação à expressão de algumas proteínas em células específicas<sup>86</sup>. Sendo assim, é importante considerarmos essas diferenças encontradas entre espécies ao escolhermos os modelos para o estudo de determinadas doenças<sup>86</sup>.

Em contrapartida, no ensaio de recombinação homóloga realizado com as linhagens estabelecidas, observamos que a linhagem com a variante L939W tem menor taxa de reparo por recombinação homóloga em comparação à WT, enquanto as linhagens *PALB2* KO e com a variante Q348\* apresentam taxas ainda menores quando comparadas à L939W (Figura 24B). Essas diferenças entre métodos podem ser observadas devido a diversos fatores, como diferenças entre células presentes no *pool* que deu origem à linhagem, ou a inserção sequência de resistência ao antibiótico, a seleção pelo antibiótico e sua toxicidade<sup>87</sup>. Além disso, no início do estudo selecionamos linhagens que não apresentam variantes em genes de reparo. No entanto, ao fazermos o *knockout/knockdown* para *PALB2*, as linhagens podem ter

acumulado algumas alterações nesses genes, comprometendo a capacidade de análise do reparo de danos ao DNA por RH. Já a variante F994C, em ambos ensaios demonstrou comportamento semelhante à *PALB2* WT (Figura 24 A e B).

Apesar de *PALB2* ser conhecido pela sua ligação com *BRCA2*, o comprometimento do domínio WD40 também pode comprometer sua ligação com *RAD51*, já que esse é o domínio por onde essa interação ocorre<sup>49</sup>. *PALB2*, juntamente com *BRCA2*, é responsável pelo endereçamento correto de *RAD51* às lesões cromossômicas para que o reparo possa ocorrer de modo fiel. *PALB2* interage com *RAD51*, estimulando a formação do D-loop, juntamente com o *enhancer* do *RAD51*, *RAD51AP1*, além de auxiliar na invasão no local do dano, fazendo com que o reparo se inicie e a integridade do genoma siga protegida<sup>88</sup>. Adicionalmente, cabe destacar que ambas as variantes estão presentes na região próxima à NES (Figura 3)<sup>49</sup>, que se trata de uma sequência no domínio WD40 responsável por exportar proteínas do núcleo para o citoplasma<sup>64</sup>. Foi observado que quando essa região é exposta pela presença da variante W1038\*, ocorre o influxo de *PALB2* no citoplasma. Essa localização citoplasmática prejudica a interação de *PALB2* com *BRCA2* e *RAD51*, sendo que esse efeito pode ser mais acentuado em proteínas truncadas do que naquelas completamente inativas.<sup>64</sup>

As principais diferenças encontradas no estudo em relação às linhagens derivadas de T47D e HS578T podem se dar pelo fato de elas apresentarem subtipos moleculares diferentes. A linhagem comercial T47D é considerada do subtipo Luminal B, por apresentar receptores de estrógeno e progesterona, ser negativa para HER2 e apresentar  $Ki67 > 14\%$ <sup>67</sup>. Já a linhagem HS578T não possui receptores hormonais, sendo, portanto, uma linhagem do subtipo triplo-negativa<sup>67</sup>. Recentemente, Winnike e colaboradores (2018) demonstraram que, de acordo com o subtipo molecular da linhagem celular, luminal A ou triplo-negativo, foi possível estabelecer diferenças entre a produção e consumo de metabólitos, ou seja, a utilização energética pode variar de acordo com *status* dos receptores<sup>89</sup>. Similarmente, os perfis metabólicos de amostras de tecidos de câncer de mama em mulheres de descendência africana, apresentaram diferenças quando foram comparados tecidos tumorais do subtipo luminal com tecidos tumorais do subtipo triplo negativo. Adicionalmente, esses perfis também

diferiam quando eram comparados entre mulheres com descendência africana e caucasianas<sup>90</sup>.

Por fim, apesar de a variante L939W apresentar alta frequência em alguns locais do mundo<sup>76,78</sup>, nossos resultados indicam que quando ela está presente em *PALB2*, o gene tem seu comportamento semelhante ao de quando a variante patogênica, Q348\*, está presente, principalmente pelo fato de não realizar o reparo por recombinação homóloga de maneira apropriada, o que pudemos constatar no ensaio de recombinação homóloga através da superexpressão das variantes. Nessa perspectiva, genes que atuam na via de reparo por recombinação homóloga, possuem um papel importante na tumorigênese. Foi demonstrado que alterações genéticas bi-alélicas em genes presentes nesta via são a maior fonte de alteração na eficiência dessa função em vários tipos tumorais, não só na HBOC. Isso permitiu que um grande número de variantes consideradas VUS fossem re-analisadas, demonstrando fortes evidências de que poderiam ser reclassificadas quanto à sua patogenicidade<sup>91</sup>.

Com relação à variante F994C, apesar de em alguns momentos ela se aproximar ao comportamento da variante patogênica Q348\*, no ensaio de RH, principal funcionalidade do gene *PALB2*, ela se assemelha mais à linhagem *PALB2* WT, nos indicando que sua capacidade de reparar danos por RH não é alterada. Portanto, acreditamos que sua capacidade de se ligar às principais proteínas ligantes do gene não é alterada, e, assim, não teria um comportamento patogênico.

## 8. CONCLUSÕES

Foi possível, no presente estudo, o estabelecimento de uma linhagem *knockout* para *PALB2* derivada de HS578T e uma linhagem *knockdown* para *PALB2* derivada de T47D utilizando o sistema CRISPR/*Cas9*.

Após o estabelecimento de linhagens *knockout* ou *knockdown* para *PALB2* foi possível gerarmos 10 linhagens estáveis diferentes, sendo 5 derivadas da T47D (*PALB2* ko, *PALB2* WT, *PALB2* com a variante L939W, *PALB2* com a variante F994C e *PALB2* com a variante Q348\*) e 5 derivadas da HS578T (mesmas condições descritas para T47D) através de transfecções do plasmídeo de expressão pCI-neo com o gene *PALB2* apresentando cada umas das variantes ou a sequência codificante WT.

Nas linhagens derivadas de T47D foi observado que a variante L939W demonstrou uma menor capacidade de formar colônias e a perda de capacidade de realizar reparo ao DNA por RH, apesar de não haver diferença quanto à proliferação, viabilidade celular e apoptose quando comparada à linhagem WT. Já a linhagem com a variante F994C, apresentou maior capacidade de formar colônias, mas não apresentou diferenças nos outros ensaios quando comparada à WT. Ambas as variantes demonstraram maior porcentagem de células em apoptose quando irradiadas em comparação a quando não estão irradiadas. Com relação às linhagens derivadas da HS578T, notamos o aumento da proliferação nas linhagens com *PALB2* contendo as variantes. Não houve diferença entre a capacidade de formar colônias entre as linhagens com as variantes e a WT. Quando avaliamos a apoptose, não observamos diferença estatística, mas percebemos uma maior porcentagem de células em apoptose inicial, tardia ou necrose nas linhagens com as variantes ou KO em comparação à WT, quando irradiadas. Para as linhagens derivadas da HS578T não foi possível estabelecer a capacidade de realizar recombinação homóloga já que as taxas obtidas não atingiram níveis que pudessem ser retratados com fidedignidade pelo equipamento após as normalizações.

Diante dos resultados obtidos, acreditamos que a variante L939W se comporte como patogênica, principalmente pelos resultados apresentados pelo ensaio de recombinação homóloga, onde a linhagem com essa variante apresentou menor taxa ou taxa quase nula nos ensaios, alterando a funcionalidade de *PALB2*. Com relação à

variante F994C, apesar de em alguns momentos ela se comportar como a variante patogênica utilizada para comparação, no ensaio de recombinação homóloga, ela apresentou taxas semelhante à linhagem com *PALB2* WT, demonstrando que ela não afetou uma das funcionalidades do gene. Por isso, é importante salientar que são necessários mais estudos para que essas variantes possam ser classificadas definitivamente como patogênicas ou benignas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TORRE, L.A. *et al.* Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends — An Update. **Cancer epidemiol biomarkers prev**, 2016; 25(1): 16-27.
2. SIEGEL, R. L.; MILLER, K.D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA Cancer J Clin**, 2017; 67(1): 7-30.
3. CANADIAN CANCER SOCIETY'S ADVISORY COMMITTEE ON CANCER STATISTICS. Canadian Cancer Statistics 2017. Toronto, ON: **Canadian Cancer Society**; 2017. Disponível em: <[cancer.ca/Canadian-CancerStatistics-2017-EN.pdf](http://cancer.ca/Canadian-CancerStatistics-2017-EN.pdf)>. Acesso em: 04 abril 2018.
4. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, COORDENAÇÃO DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA. **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: 2017.
5. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Fatores de Risco**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/fatores\\_de\\_risco\\_1](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/fatores_de_risco_1)>. Acesso em: 6 jan. 2017.
6. BRAY, F. *et al.* Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. Global Cancer Statistics 2018. **CA: Cancer Journal for Clinicians**, 2018; 0: 3-31.
7. KLEIBL, Z.; KRISTENSEN, V.N. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. **The Breast**, 2016; 28: 136-144.
8. COUCH, F.J. *et al.* Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer. **JAMA Oncology**, 2017; 3(9) 1190-1196
9. KLEIN, C.E., MOLLINEAUX, L. Genetic screening for hereditary breast/ovarian cancer. **Primary Care Case Reviews**, 2001; 4(1): 15-22.
10. CIPOLLINI, G. *et al.* Genetic alterations in hereditary breast cancer. **Annals of oncology**, 2004; 15: i7-i13.
11. KUCHENBAECKER, K.B. *et al.* Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. **JAMA**, 2017; 317(23): 2402-2416.
12. REBBECK, T.R. *et al.* Mutational spectrum in a worldwide study of 29,700 families with *BRCA1* or *BRCA2* mutations. **Human mutaton**, 2018; 39(5): 593-620.

13. ROA, B.B. *et al.* Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutation in BRCA1 and BRCA2. **Nature genetics**, 1996; 14: 185-187.
14. GONZALEZ, K.D. *et al.* Beyond Li Fraumeni Syndrome: Clinical Characteristics of Families With p53 Germline Mutations. **Journal of Clinical Oncology**, 2009; 27(8): 1250-1256.
15. BOUGEARD, G. *et al.* Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers. **Journal of Clinical Oncology**, 2015; 33(21): 2345-2352.
16. VALDEZ, J.M., NICHOLS, K.E., KESSERWAN, C. Li-Fraumeni syndrome: a paradigm for the understanding of hereditary cancer predisposition. **Br J Haematol**, 2017; 176(4): 539-552.
17. MAI, P. L. *et al.* Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the NCI LFS cohort. **Cancer**, 2016; 122(23): 3673–3681.
18. BIEGIN, K.T.; MELLO, S.S.; ATTARDI, L.D. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. **Nat Rev Cancer**, 2014; 14(5): 359-370.
19. STAMBOLIC, V. *et al.* Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. **Cell**, 1998; 95(1): 29-39.
20. BLUMENTHAL, G.M., DENNIS, P.A. PTEN hamartoma tumor syndromes. **Eur J Hum Genet**, 2008; 16: 1289-1300.
21. BUBIEN, V. *et al.* High cumulative risks of cancer in patients with PTEN hamartoma tumour syndrome. **J Med Genet**, 2013; 50: 255-263.
22. TAN, M-H *et al.* Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. **Human Cancer Biology**, 2012; 18(2): 400-407.
23. VAN ROY, F.; BERX, G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. **Cell Mol Life Sci**, 2008; 65(23): 3756-3788.
24. KAURAH, P *et al.* Founder and recurrent *CDH1* mutations in families with Hereditary Diffuse Gastric Cancer. **JAMA**, 2007; 297(21): 2360-2372.
25. HANSFORD, S. *et al.* Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome *CDH1* Mutations and Beyond. **JAMA**, 2015; 1(1): 23-32.
26. MCGARRITY, T.J.; AMOS, C.I.; BAKER M.J. **Peutz-Jeghers Syndrome**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1266/?report=reader>>. Acesso em: 15 jan. 2017.
27. COBAIN E.F., MILLIRON K.J., MERAJVER S.D. Updates on breast cancer genetics: Clinical implications of detecting syndromes of inherited increased susceptibility to breast cancer. **Semin Oncol**, 2016; 43(5): 528-535.

28. ANTONIOU, A.C. *et al.* Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2. **N Engl J Med**, 2014; 371(6): 497-506.
29. SLAVIN, T.P. *et al.* The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. **NPJ Breast Cancer**, 2017; 3(22): 1-10
30. NESIC, K. *et al.* Targeting DNA repair: the genome as a potential biomarker. **J. Pathol.**, 2018; 244(5): 586 - 597.
31. PARK, J-Y.; ZHANG, F.; ANDREASSEN, P.R. PALB2: The hub of a network of tumor suppressors involved in DNA damage responses. **Biochem Biophys Acta**, 2014; 1846: 263-275.
32. XIA, B. *et al.* Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. **Nature genetics**, 2007; 39: 159-161.
33. JONES, S. *et al.* Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. **Science**, 2009; 324(5927): 217.
34. YURGELUN, M.B. *et al.* Germline cancer susceptibility gene variants, somatic second hits and survival outcomes in patients with resected pancreatic cancer. **Genet Med.**, 2019; 21(1): 213-223.
35. SHINDO, K. *et al.* Deleterious germline mutations in patients with apparently sporadic pancreatic adenocarcinoma. **J Clin Oncol**, 2017; 35(30): 3382-3390.
36. SEHDEV, A. *et al.* Germline and somatic DNA damage repair gene mutations and overall survival in metastatic pancreatic adenocarcinoma patients treated with FOLFIRINOX. **Clin Cancer Res**, 2018; 24(24): 6204-6211.
37. CHAFFEE, K.G. *et al.* Prevalence of germline mutations in cancer genes among pancreatic cancer patients with a positive family history. **Genet Med**, 2018; 20(1): 119-127.
38. SUSSWEIN, L.R. *et al.* Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. **Genet Med**, 2016; 18(8): 823-832.
39. ADANK, M.A. *et al.* PALB2 analysis in BRCA2-like families. **Breast Cancer Res Treat**, 2011; 127(2): 357-362.
40. LU, C. *et al.* Patterns and functional implications of rare germline variants across 12 cancer types. **Nature Communications**, 2015; 6: 10086.

41. FEWINGS, e. *et al.* Germline pathogenic variants in PALB2 and other cancer-predisposing genes in families with hereditary diffuse gastric cancer without CDH1 mutation: a whole-exome sequencing study. **Lancet Gastroenterol Hepatol**, 2018; 3(7): 489-498.
42. HUANG, K.L. *et al.* Pathogenic germline variants in 10,389 adult cancers. **Cell**, 2018; 173(2): 355-370.
43. PILIÉ, P.G. *et al.* Germline genetic variants in men with prostate cancer and one or more additional cancers. **Cancer**, 2017; 123(20): 3925-3932.
44. RAHMAN, N. *et al.* PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. **Nature Genetics**, 2007; 39(2): 165-167
45. ALDUBAYAN, S.H. *et al.* Inherited DNA-Repair Defects in Colorectal Cancer. **Am J Hum Genet**, 2018; 102(3): 401-414.
46. NORQUIST, B.M. *et al.* Inherited mutations in women with ovarian carcinoma. **JAMA Oncology**, 2016; 2(4): 482-490.
47. BUYS, S.S. *et al.* A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. **Cancer**; 2017, 123(10): 1721-1730.
48. PRITZLAFF, M. *et al.* Male breast cancer in a multi-gene panel testing cohort: insights and unexpected results. **Breast Cancer Res Treat**; 2017, 161(3): 5775-586.
49. DUCY, M. *et al.* The tumor suppressor PALB2: inside out. **Trends Biochem Sci**, 2019; 1-15.
50. FOO, T.K. *et al.* Compromised BRCA1-PALB2 interaction is associated with breast cancer risk. **Oncogene**; 2017; 26(29): 4161-4170.
51. LEE, J.E.A. *et al.* Molecular analysis of PALB2 associated breast cancers. **J.Pahtol**; 2018.
52. KNUDSON JR., A.G. *et al.* Mutation and Cancer: Statistical study of retinoblastoma. **Proc Nat Acad Sci**; 1971, 68(4): 820-823
53. BUISSON, R. *et al.* Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. **Nat Struct Mol Biol**; 2010, 17(10): 1247-1254.
54. GOSH, S. *et al.* Hypersensitivities for acetaldehyde and other agents among cancer cells null for clinically relevant fanconi anemia genes. **Am J Pathol**; 2014, 184(1): 260-270.
55. ASHWORTH, A. A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. **J Clin Oncol**; 2008, 26(22): 3785-3790.

56. DALY, M.B. *et al.* NCCN Panel Members Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, *Version 1.2016*. **J Natl Compr Canc Netw**; 2016.
57. DALY, M.B. *et al.* NCCN Guidelines Updates: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, *Version 2.2019*. **J Natl Compr Canc Netw**; 2018.
58. TUNG, N. *et al.* Counselling framework for moderate-penetrance cancer-susceptibility mutations. **Nat Rev Clin Oncol**; 2016, 13(9): 581-588.
59. RICHARDS, S. *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genet Med**, 2015; 17(5): 405-424.
60. PLON, S.E. *et al.* Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. **Hum Mutat**, 2008; 29(11): 1282-1291.
61. DOMCHECK, S., WEBER, B.L. Genetic variants of uncertain significance: flies in the ointment. **Journal of Clinical Oncology**, 2008; 26(1): 16-17.
62. PLON, S.E. *et al.* Genetic testing and cancer risk management recommendations by physicians for at-risk relatives. **Genet Med**, 2011; 13(2): 148-154.
63. SPURDLE, A.B. *et al.* ENIGMA - evidence-based network for the interpretation of germline mutant alleles: an international initiative to evaluate risk and clinical significance associated with sequence variation in *BRCA1* and *BRCA2* genes. **Hum Mutat**, 2012; 33(1): 2-7.
64. PAUTY, J. *et al.*, Cancer-causing in the tumor suppressor PALB2 reveal a novel cancer mechanism using hidden nuclear export signal in the W40 repeat motif. **Nucleic Acids Res**, 2017; 45(5): 2644-2657.
65. VILLAROEL, M.C. *et al.* Personalizing cancer treatment in the age of global genomic analyses: PALB2 gene mutations and the response to DNA damaging agents in pancreatic cancer. **Molecular Cancer Therapy**, 2011; 10(1): 3-8.
66. SADOWSKI, C. E. BRCA1/2 missense mutations and the value of *in-silico* analyses. **Eur J Med Genet**, 2017; 60(11): 572 - 577.
67. MOTA, A. L. *et al.* Molecular characterization of breast cancer cell lines by clinical immunohistochemical markers. **Oncology Letters**, 2017; 13(6): 4708-4712.

68. DIRKS, W.G. *et al.* Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines. **ALTEX**, 2005; 22(2): 103-109.
69. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 1976; 72: 248-254.
70. ESTEP, J.A. *et al.* Immunoblot screening of CRISPR/ Cas9-mediated gene knockouts without selection. **BMC Molecular Biol**; 2016, 17(9): 1-7.
71. MAO, Y. *et al.* PARP inhibitor olaparib sensitizes cholangiocarcinoma cells to radiation. **Cancer Medicine**; 2018, 7(4): 1285-1296.
72. SELUANOV, A; MAO, Z; GORBUNOVA, V. Analysis of DNA double-strand break (DSB) repair in mammalian cells. **J Vis Exp**, 2010; 8(43): 1-6.
73. GUNN, A; STARK, J. M. I-SceI-based assays to examine distinct repair outcomes of mammalian chromosomal double strand breaks. **Methods Mol Biology**, 2012; 920: 379-391.
74. VRIEND, L.E.M., JASIN, M., KRAWCZYK, P.M. Assaying break and nick-induced homologous recombination in mammalian cells using the DR-GFP reporter and Cas9 nucleases. **Methods Enzymol**, 2014; 576: 175-191.
75. CECECER, G. *et al.* Association of PALB2 sequence variants with the risk of early-onset breast cancer in patients from Turkey. **Mol Biol Rep**, 2016; 43(11): 1273-1284.
76. BLANCO, A. *et al.* Analysis of PALB2 gene in BRCA1/BRCA2 negative spanish hereditary breast/ovarian cancer families with pancreatic cancer cases. **PLOS ONE**, 2013; 8(7): e67538.
77. WONG-BROWN, M.W. *et al.* Low prevalence of germline PALB2 mutations in Australian triple-negative breast cancer. **Int J Cancer**, 2014; 134(2): 301-305.
78. GUÉNARD, F. *et al.* Evaluation of the Contribution of the three breast cancer susceptibility genes CHEK2, STK11 and PALB2 in non-BRCA1/2 french canadian families with high risk of breast cancer. **Genetic testing and Molecular Biomarkers**, 2010; 14(4): 515-526.
79. NGUYEN-DUMONT, T. *et al.* Mutation screening of PALB2 in clinically ascertained families from the breast cancer family registry. **Breast Cancer Res Treat**, 2015; 149(2): 547-554.
80. CHEN, W. *et al.* Establishment of an miR-137-knockout cell model using CRISPR/Cas9 genome editing. **Oncol Lett**, 2018; 16(3): 4027-4032.

81. PROMEGA. **Technical Bulletin: pCI-neo Mammalian Expression Vector**. Disponível em:< <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/pci-neo-mammalian-expression-vector-protocol.pdf>>. Acesso em: 22 jan 2019.
82. SCHMIDT, E.V. *et al.* The cytomegalovirus enhancer: a pan-active control element in transgenic mice. **Mol Cell Biol**, 1990; 10(8): 4406-4411.
83. SINHADRI, S. *et al.* PALB2 connects BRCA1 and BRCA2 in the G2/M checkpoint response. **Oncogene**, 2018.
84. PARK, J.Y. *et al.* Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. **Oncogene**, 2014; 33(40): 4803-4812.
85. CATUCCI, I. *et al.* The PALB2 p.Leu939Trp mutation is not associated with breast cancer risk. **Breast Cancer Research**, 2016; 18(111): 1-2.
86. INGERSOLL, M.A. *et al.* Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. **Blood**, 2010; 115(3): e10-9
87. STEPANENKO, A.A.; HENRY, H.H. Transient and stable vector transfection: pitfalls, off-target effects, artifacts. **Mutation Research**, 2017; 773: 91-103.
88. DRAY, E. *et al.* Enhancement of RAD51 recombinase activity by the tumor suppressor PALB2. **Nat Struct Mol Biol**, 2010; 17: 1255-1259.
89. WINNIKE, J.H. *et al.* Stable isotope-resolved metabolomic differences between hormone-responsive and triple-negative breast cancer cell lines. **Int J Breast Cancer**, 2018; 30: 1-12.
90. TAYYARI, F. *et al.* Metabolic profiles of triple-negative and luminal A breast cancer subtypes in African-American identify key metabolic differences. **Oncotarget**, 2018; 9(14): 11677-11690.
91. RIAZ, N. *et al.* Pan-cancer analysis of bi-allelic alterations in homologous recombination DNA repair genes. **Nat Commun**, 2017; 8(857): 1-7.

## ANEXO 1



## Comitê de Ética em Pesquisa Parecer *Ad Referendum*

Para: Edenir Inêz Palmero

De: Daniel Onofre Vidal  
*Coordenador Adjunto do Comitê de Ética em Pesquisa*

Data: 23/03/2017

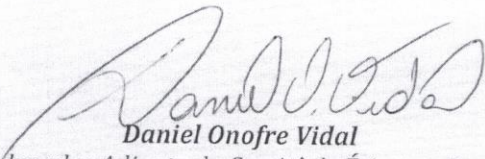
Projeto de pesquisa: 1360/2017

Prezado (a) Senhor (a),

Vimos, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos recebeu o estudo intitulado “Análises funcionais de variantes de significado clínico desconhecido do gene de predisposição ao câncer de mama PALB2. ”, o qual foi cadastrado sob o número 1360/2017.

Declaramos estar cientes da realização do projeto de pesquisa supracitado, e que por se tratar de pesquisa envolvendo apenas linhagens de células comerciais (cultura estabelecida), não há necessidade de apreciação/aprovação do CEP.

Atenciosamente,

  
**Daniel Onofre Vidal**  
*Coordenador Adjunto do Comitê de Ética em Pesquisa*  
*Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos*