

**Mariana Balie**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL MUTACIONAL E DE EXPRESSÃO GÊNICA EM TUMORES DE MAMA  
INVASIVOS EM ESTÁDIOS INICIAIS E TARDIOS.**

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

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Márcia Maria Chiquitelli  
Marques Silveira

Barretos, SP

2021

B153a Balie, Mariana.

“Avaliação do perfil mutacional e de expressão gênica em tumores de mama invasivos em estádios iniciais e tardios”. / Mariana Balie. - Barretos, SP - 2021.

110 f. : il.

Orientadora: Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

1. Câncer de mama. 2. Diagnóstico precoce. 3. Estadiamento clínico.  
4. Expressão gênica. 5. Exoma. 6. Perfil molecular. I. Autor. II. Título.

CDD 616.994 49

#### **FICHA CATALOGRÁFICA**

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



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Mariana Balie

**“AVALIAÇÃO DO PERFIL MUTACIONAL E DE EXPRESSÃO GÊNICA EM TUMORES DE MAMA INVASIVOS EM ESTÁDIOS INICIAIS E TARDIOS.”**

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

Data da aprovação: 27/09/2021

Banca Examinadora:

Dra. Dirce Maria Carraro

Instituição: A.C.Camargo Cancer Center

Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior

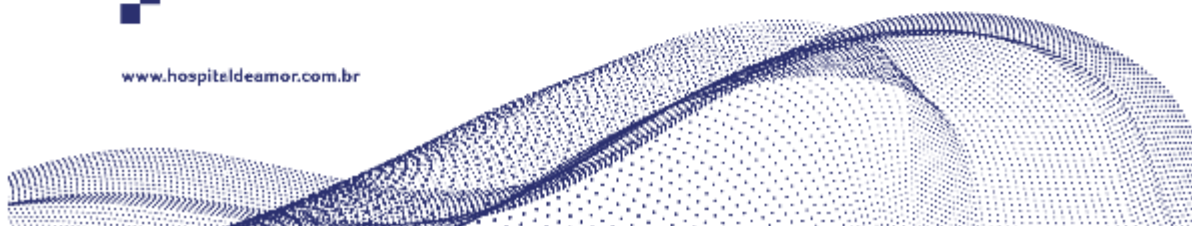
Instituição: Ribeirão Preto da USP

Dra. Marcia Maria Marques Silveira

Orientador

Dra. Fabiana Vazquez

Presidente da Banca



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

Dedico este trabalho a todas as mulheres que estão enfrentando ou que já enfrentaram o câncer de mama.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, que mesmo o caminho sendo difícil com muitos desafios e obstáculos, nunca me deixou só.

À **Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira**, minha orientadora, que me acolheu e me orientou neste trabalho, tornando esse sonho possível. Expresso o meu profundo sentimento de admiração por sua dedicação e contribuição à pesquisa. Obrigada por sempre me atender todas as vezes em que fui até sua sala. Agradeço todo o apoio e respeito quando precisei afastar por um período. Por ter estendido a mão e me dado toda a força.

À **Dra. Adriane Feijó Evangelista**, pela dedicação, disponibilidade e competência na realização das análises de bioinformática deste projeto. Acho que não existem palavras suficientes que me permitam te agradecer da maneira que você merece. Você foi a minha luz quando tudo estava escuro. Obrigada por tantas vezes me incentivar e me amparar. Uma amiga que sempre fez o possível para amenizar minhas angústias e minha dor.

Ao **Dr. Rui Manuel Vieira Reis**, pelas considerações ao trabalho e por todos os incentivos e conselhos.

Aos membros da banca de defesa, **Dr. Geraldo Aleixo da Silva Passos Júnior e a Dra. Dirce Maria Carraro** por aceitarem o convite, dispondo de seu tempo e conhecimento para analisar essa dissertação, e também ao membro **da banca de qualificação, Dr. Vinicius Duval da Silva, que juntamente com a Dra. Dirce Maria Carraro**, contribuíram com sugestões cruciais para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Ao **Dr. Cristiano de Pádua Souza**, pelo conhecimento clínico que foi passado e por sua disposição e paciência em ajudar.

Ao **Dr. Henrique César Santejo Silveira**, por todas as dicas em pesquisa, e por ter me ouvido, compreendido as situações que me afetavam naquele momento e me ajudar com seus sábios conselhos.

***Ao Hospital de Amor de Barretos e ao Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM)***, pela estrutura de excelência para realizar este trabalho.

***Ao BIOBANCO***, pela qualidade do trabalho e fornecimento do material biológico utilizado.

***Aos Biologistas do CPOM, Letícia Braga, Karina Melo, Dr. Renato Oliveira e Me. André Lengert.*** Em especial à ***Dra. Ana Carolina Laus***, pela amizade, carinho e confiança durante esses anos no CPOM, por ter acreditado em mim e nas minhas capacidades. Por todo o estímulo em cada conversa e pelos conhecimentos científicos brilhantemente compartilhados.

***Ao grupo de pesquisa Genética Molecular do Câncer, Dra. Ana Carolina Neuber, Ana Julia Aguiar de Freitas, Beatriz Porto, Dra. Danielle Pessôa Pereira, Ma. Rhafaela Causin e Stephanie Calfa*** por todas as discussões construtivas em grupo e o convívio diário. Em especial, à ***Ma. Muriele Bertagna Varuzza e Dra. Tatiana Takahasi Komoto***, que apesar do pouco tempo e mesmo depois com a distância, sempre estiveram presentes tornando a etapa final deste estudo mais leve.

***As participantes do estudo*** pelo consentimento do uso de suas amostras, contribuindo para esta pesquisa.

***Ao apoio financeiro do Ministério Público do Trabalho (MPT)***, pelo auxílio na infraestrutura do CPOM.

***Ao Instituto de Ensino e Pesquisa (IEP)***, especialmente a secretária ***Julia Hamanaca*** e ao gerente ***Marcelo Menezes***, por toda a ajuda com burocracias e pela amizade.

***A Biblioteca do Hospital de Amor de Barretos***, em especial, ***Martins e Milene***, por todo o suporte e atenção durante o mestrado.

***Ao Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística (NEB)***, pelos cursos oferecidos e ajuda nas dúvidas de bioestatística.

***Aos pesquisadores e professores do IEP***, pela transmissão de seus conhecimentos e contribuírem para o meu aprendizado.

***As meninas da secretaria da pós-graduação, Cíntia Perin, Mariana Evangelista, Dely Assis, Vittoria Cruz, Carla Elefante, Alice Balieiro e Carolina Jorgetto***, pelo carinho e paciência em me atender e sempre ajudar com eficiência.

***As amigas no CPOM, Aline Larissa, Adhara Lima, Bárbara Borella, Eduardo Cabral, Luani Godoy, Yasmin Guimarães, Felipe Garcia, Izabela Faria, Paola Gonçalves, Janaína Galvão, Kericy Pereira, Lazaro Novaes, Laís Machado, Lucas Perina, Marcela Nunes, Marcela Lordelo, Maria Fernanda Gonçalves, Mariana Bisarro, Murilo Bonatelli, Renan Teixeira, Luiza Veiga, Patrick da Silva, Tauana Dias***, com quem compartilhei momentos de alegrias, angústias e dúvidas. Feliz pela amizade que cultivamos ao longo destes anos.

***Aos amigos***, que fiz ao longo desta pesquisa e se tornaram especiais para vida toda. Com muito carinho, ***à Ma. Isabela Maria Campanelli dos Santos***, minha amiga e vizinha de bancada, que esteve presente em todos os momentos e sempre vibrando comigo cada conquista. Obrigada por oferecer um ombro amigo quando preciso. É bom saber que tenho você comigo, sempre! ***À Ma. Isabella Gomes***, por ser uma grande amiga em todos os momentos que estivemos juntas nesta caminhada. Dividimos sonhos e dificuldades juntas. ***À Dra. Ana Carolina Neuber***, pela nossa amizade sincera. Obrigada por cada conselho e pela parceria. Seja sempre como você é, cheia de luz. ***Ao José Guilherme Datorre***, pelo companheirismo diário no laboratório e pela amizade linda que construímos. ***À Jessica Peixoto e Ma. Priscila Grecca Pedrão***, pelos momentos de alegria e cumplicidade.

E por fim, ***à minha família***, por todo o sacrifício feito para que eu tivesse uma boa educação e ***aos meus amigos***, que mesmo longe sempre me apoiaram e compreenderam minhas ausências.



*“O êxito da vida não se mede pelo caminho que você conquistou,  
mas sim pelas dificuldades que superou no caminho.”*

***Abraham Lincoln***

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	
<b>1.1</b>	<b>Câncer de mama: carcinogênese, epidemiologia e fatores de risco</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Classificação histológica e molecular</b>	<b>3</b>
<b>1.3</b>	<b>Classificação por estadiamento clínico</b>	<b>3</b>
<b>1.4</b>	<b>Biomarcadores e câncer de mama</b>	<b>6</b>
<b>1.5</b>	<b>Alterações genético-moleculares associadas ao câncer de mama</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>12</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>12</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
<b>4.1</b>	<b>Delineamento do estudo</b>	<b>13</b>
<b>4.2</b>	<b>Delineamento experimental</b>	<b>13</b>
<b>4.3</b>	<b>Aspectos éticos</b>	<b>14</b>
<b>4.4</b>	<b>População do estudo</b>	<b>14</b>
<b>4.5</b>	<b>Levantamento dos dados clínico-patológicos</b>	<b>15</b>
<b>4.6</b>	<b>Processamento das amostras no Biobanco do HCB</b>	<b>15</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise do perfil mutacional (exoma completo)</b>	<b>16</b>
<b>4.8</b>	<b>Análise dos dados do perfil mutacional (exoma completo)</b>	<b>17</b>
<b>4.9</b>	<b>Análise do perfil de expressão gênica</b>	<b>17</b>
<b>4.10</b>	<b>Análise dos dados de expressão gênica</b>	<b>18</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	
<b>5.1</b>	<b>Características clínico-patológicas</b>	<b>20</b>
<b>5.2</b>	<b>Perfil mutacional e sua correlação com o estadiamento clínico</b>	<b>21</b>
<b>5.3</b>	<b>Associação do perfil de expressão gênica com o estadiamento clínico</b>	<b>23</b>

<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>25</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>31</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>32</b>
	<b>ANEXOS</b>	
	<b>Anexo A – Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa</b>	<b>41</b>
	<b>Anexo B – Lista de genes do painel <i>Breast Cancer 360</i><sup>®</sup> da <i>NanoString Technologies</i></b>	<b>52</b>
	<b>APÊNDICES</b>	
	<b>Apêndice 1- Casos do estudo</b>	<b>73</b>
	<b>Apêndice 2 - Quantificação do RNA total obtido a partir de tecido tumoral para avaliação do perfil molecular pela tecnologia <i>NanoString</i>.</b>	<b>77</b>
	<b>Apêndice 3 – Tabela de variantes</b>	<b>80</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – *The hallmarks of cancer.* 1
- Figura 2** – Classificação do câncer de mama com base na estratificação molecular, classificação relativa, necessidade de terapia e prognóstico. A expressão do hormônio BC reflete uma proporção inversa ao grau do tumor e à proliferação celular. O subtipo A luminal exibe um melhor prognóstico com uma resposta positiva à terapia endócrina. Em contraste, o TNBC não apresenta expressão hormonal, tumor de maior estadiamento e grau nuclear com intensa atividade mitótica e mau prognóstico. RE, receptor de estrogênio; HER2, receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano; PR, receptor de progesterona e TNBC, câncer de mama triplo negativo. 7
- Figura 3** – Oncoplot dos 16 genes (linhas) de maior frequência mutacional entre os exomas completos das pacientes deste estudo. 22
- Figura 4** – Genes diferencialmente expressos em pacientes com câncer de mama nos estadiamentos clínicos I, II e IIIa. 24

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 –</b>	Fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama.	2
<b>Tabela 2 –</b>	Estadiamento clínico por meio do TNM das pacientes com câncer de mama.	4
<b>Tabela 3 –</b>	Classificação TNM.	5
<b>Tabela 4 –</b>	Características clínico-patológicas dos casos do estudo.	20

## LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AKT1	<i>AKT Serine/Threonine Kinase 1</i>
AKT3	<i>AKT serine/threonine kinase 3</i>
ALDH1A1	<i>Aldehyde dehydrogenase 1 family member A1</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer type 1</i>
BRCA2	<i>Breast Cancer type 2</i>
CA-15-3	<i>Carcinoma Antigen 15-3</i>
CCNA2	<i>Cyclin A2</i>
CCNB1	<i>Cyclin B1</i>
CDH1	<i>Cadherin 1</i>
CDK1	<i>Cyclin Dependent Kinase 1</i>
CEA	<i>Carcinoembryonic antigen</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CGI	<i>Cancer Genome Interpreter</i>
CM	Câncer de mama
CNS	Conselho Nacional de Saúde
CNVs	<i>Copy number variation</i>
COL27A1	<i>Collagen type XXVII alpha 1 chain</i>
CPOM	Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular
DLGAP5	<i>DLG associated protein 5</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERBB2	<i>Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FOVs	<i>Fields of Views</i>
FOXA1	<i>Forkhead box A1</i>
GATA3	<i>GATA Binding Protein 3</i>
HAB	Hospital de Amor de Barretos
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
HER2	<i>Human epidermal growth receptor 2</i>

IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ki67	Antígeno marcador de proliferação celular
LFN	Linfonodos
MAP3K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>
MKI67	<i>Marker of proliferation Ki-67</i>
MLL3	<i>Mixed-lineage leukemia protein 3</i>
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	<i>Tumor Protein 53</i>
PAM50	<i>Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay</i>
PARP4	<i>poly(ADP-ribose) polymerase family member 4</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha</i>
POLQ	<i>DNA polymerase theta</i>
PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Holog</i>
RCC	<i>Reporter Code Count</i>
RE ou ER	Receptor de estrógeno
REDCap	<i>Research Electronic Data Capture</i>
RELN	<i>Reelin gene</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RP ou PR	Receptor de progesterona
SNVs	<i>Single nucleotide variation</i>
SP	São Paulo
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TNBC	Câncer de mama triplo negativo
TNM	Tamanho tumoral (T), comprometimento nodal (N) e metástase (M)
TP53	Proteína de tumor

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
=	Igual
<	Menor que
ng	Nanograma
μl	Microlitros
°	Graus
C	Celsius



## RESUMO

BALIE M. *Avaliação do perfil mutacional e de expressão gênica em tumores de mama invasivos em estádios iniciais e tardios. Dissertação (Mestrado)*. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2021.

**JUSTIFICATIVA:** O câncer de mama é uma doença genética bastante heterogênea e a neoplasia mais frequente entre as mulheres no Brasil e no mundo. No Brasil a adesão as estratégias de rastreamento efetivas para o diagnóstico precoce desta neoplasia ainda é um desafio. Desta maneira, existe uma necessidade eminente de se melhor avaliar o perfil mutacional e de expressão gênica de pacientes com câncer de mama tanto em estádios iniciais quanto avançados, uma vez que o início do câncer de mama é caracterizado tanto por alterações genéticas como epigenéticas e que a carga cumulativa destas alterações ainda não está bem compreendida. Sendo assim a identificação destas alterações moleculares associado ao início e progressão do câncer de mama podem auxiliar na elucidação dos mecanismos genético moleculares que regem esta neoplasia. **OBJETIVO:** Identificar o perfil mutacional e de expressão gênica de tumores de mama nos estádios I, II e IIIa e associar com as características anatomopatológicas. **MATERIAIS E MÉTODOS:** Foram selecionadas 82 pacientes com câncer de mama nos diferentes subtipos moleculares em estadiamentos I, II e IIIa. Para o perfil mutacional o DNA do tecido tumoral primário criopreservados foi obtido utilizando o *Kit QIASymphony DNA Mini (Qiagen)* e o DNA do *buffy coat* utilizando o *Kit QIASymphony DNA Midi (Qiagen)*. Para o perfil de expressão gênica o RNA total das amostras de tecido tumoral congelados foi obtido com o *Kit QIASymphony RNA mini Kit (Qiagen)*. Utilizou-se a plataforma automatizada *QIASymphony (Qiagen)* seguindo as instruções do fabricante. A qualidade do material genético (DNA e RNA) foi avaliado pelo *Qubit (Thermo Scientific)* para posterior realização do sequenciamento do exoma completo pela plataforma *Illumina HiSeq 2500™ System* e avaliação da expressão gênica na plataforma da *NanoString® Technologies* utilizando o painel *nCounter Breast Cancer 360® (776 genes)*. As análises estatísticas do perfil de expressão gênica foram realizadas no programa *R* e do perfil mutacional do exoma as alterações somáticas foram identificadas pela ferramenta *MuTect2*. **RESULTADOS:** Os genes *PIK3CA* (44%) e *TP53* (33%) foram os mais frequentemente mutados em nossa coorte. No entanto as alterações somáticas não evidenciaram nenhum padrão

associado ao estadiamento. Identificamos no perfil de expressão gênica, agrupamentos de genes específicos no câncer de mama: 29 genes reprimidos em parte das pacientes do estadiamento II e na maioria das pacientes do estadiamento IIIa; 20 genes induzidos em parte das pacientes dos estadiamentos II e IIIa. **CONCLUSÃO:** Pacientes com câncer de mama em estádios iniciais e avançados apresentam alterações mutacionais somáticas com alguns genes *drivers* frequentemente alterados e assinaturas de expressão gênica características associadas ao estadiamento clínico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Câncer de mama; Diagnóstico Precoce; Estadiamento clínico; Expressão gênica; Exoma; Perfil molecular.

## ABSTRACT

BALIE M. *Mutational and gene expression profile evaluation in invasive breast tumors in early and late stages. Dissertation (Master's degree)*. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2021.

**BACKGROUND:** Breast cancer is a very heterogeneous genetic disease and the most frequent neoplasm among women in Brazil and in the world. In Brazil, adherence to effective screening strategies for early diagnosis of this neoplasm is still a challenge. Thus, there is an imminent need to better assess the mutational and gene expression profile of breast cancer patients in early and advanced stages since the onset of breast cancer is characterized by both genetic and epigenetic alterations and the cumulative burden of these alterations is still not well understood. Therefore, the identification of these molecular changes associated with the onset and progression of breast cancer can help to elucidate the molecular genetic mechanisms that govern this neoplasm. **AIM:** To identify the mutational and gene expression profile of breast tumors in stages I, II and IIIa and associate it with the anatomopathological characteristics. **MATERIALS AND METHODS:** 82 patients with breast cancer in different molecular subtypes in stages I, II and IIIa were selected. For the mutational profile, the cryopreserved primary tumor tissue DNA was obtained using the *QIASymphony DNA Mini Kit (Qiagen)* and the buffy coat DNA using the *QIASymphony DNA Midi Kit (Qiagen)*. For gene expression profiling, total RNA from frozen tumor tissue samples was obtained with the *QIASymphony RNA mini Kit (Qiagen)*. The automated platform *QIASymphony (Qiagen)* was used following the manufacturer's instructions. The quality of the genetic material (DNA and RNA) was evaluated by *Qubit (Thermo Scientific)* for further sequencing of the complete exome using the *Illumina HiSeq 2500™ System* platform and evaluation of gene expression on the *NanoString® Technologies* platform using the *nCounter Breast Cancer panel 360® (776 genes)*. The statistical analyzes of the gene expression profile were performed in the *R* program and the exome mutational profile, the somatic alterations were identified by the *MuTect2* tool. **RESULTS:** The genes PIK3CA (44%) and TP53 (33%) were the most frequently mutated in our cohort. However, somatic changes did not show any pattern associated with staging. We identified in the gene expression profile, clusters of specific genes in breast cancer: 29 genes repressed in part of stage II patients and in most stage IIIa patients; 20 genes induced in part of stage II and IIIa patients. **CONCLUSION:** Patients with breast cancer at early

and advanced stages have somatic mutational alterations with some frequently altered driver genes and characteristic gene expression signatures associated with clinical staging.

**KEYWORDS:** Breast cancer; Early diagnosis; Clinical staging; Gene expression; Exome; Molecular profile.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer de mama: carcinogênese, epidemiologia e fatores de risco

O câncer de mama (CM) se desenvolve a partir de alterações genético-moleculares nas células do tecido mamário não sendo considerado como uma única doença, dado ao seu alto padrão de heterogeneidade clínica e molecular<sup>1</sup>. Durante a carcinogênese da mama, células normais progridem para um estado neoplásico a partir de uma série de alterações genéticas, instabilidade genômica e uma sucessão de características denominadas por Hanahan e Weinberg por “*Hallmarks of Câncer*”<sup>2,3</sup>. (Figura 1)



Fonte: Adaptado de Hanahan, D., & Weinberg, R. A<sup>2,3</sup>.

Figura 1 – The hallmarks of cancer.

O câncer de mama é a neoplasia mais prevalente entre as mulheres no mundo, excluindo-se o câncer de pele não melanoma. A Organização Mundial da Saúde (OMS), por meio do GLOBOCAN, estimou 2.3 milhões de novos casos e mais de 684 mil mortes por câncer de mama para 2020<sup>4</sup>. No Brasil, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA),

o número de casos novos de câncer de mama foram estimados 66.280 em 2020, sendo a principal causa de morte pelas mulheres<sup>5</sup>.

Atualmente, a mamografia é o exame padrão para o rastreamento do câncer de mama, no entanto, a sua sensibilidade é alta apenas em mulheres acima dos 50 anos<sup>6</sup>. Nas mulheres mais jovens, a sensibilidade deste método é menor, particularmente quando os exames são realizados anualmente ou quando se tem história familiar, que possivelmente acarreta um crescimento mais acelerado do tumor<sup>7, 8</sup>. Sabidamente o CM quando diagnosticado em estádios iniciais, apresenta melhor prognóstico e elevada taxa de cura. O diagnóstico precoce é, portanto, a principal estratégia para aumentar a chance de cura.

De modo geral, os fatores de riscos para o câncer de mama podem ser divididos em dois grupos: extrínsecos e intrínsecos. O primeiro grupo é representado por fatores previsíveis e condicionados pelo estilo de vida, dieta ou até mesmo intervenção médica de longo prazo, como o uso de anticoncepcionais e terapia para reposição hormonal. Em contrapartida, para o segundo grupo são características inerentes a idade, sexo, fatores reprodutivos e história familiar de câncer<sup>9</sup>. A tabela 1 representa os principais fatores de risco para o desenvolvimento do cancer de mama<sup>10</sup>.

**Tabela 1** – Fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama.

<b>Fatores ambientais e comportamentais</b>	<b>Fatores da história reprodutiva e hormonal</b>	<b>Fatores genéticos e hereditários</b>
Obesidade e sobrepeso após a menopausa.	Primeira menstruação antes de 12 anos.	História familiar de câncer de ovário.
Inatividade física.	Não ter tido filhos.	Casos de câncer de mama na família, principalmente antes dos 50 anos.
Consumo de bebida alcoólica.	Primeira gravidez após os 30 anos.	História familiar de câncer de mama em homens.
Exposição frequente a radiações ionizantes para tratamento (radioterapia) ou exames diagnósticos (tomografia, raios-x, mamografia etc.).	Parar de menstruar (menopausa) após os 55 anos.	Alteração genética, especialmente nos genes BRCA1 e BRCA2.
Tabagismo – há evidências sugestivas de aumento de risco.	Uso de contraceptivos hormonais (estrógeno-progesterona).	
	Ter feito reposição hormonal pós-menopausa, principalmente por mais de cinco anos.	

## 1.2 Classificação histológica e molecular

O câncer de mama pode ser, em geral, categorizado em carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo, baseado em sua histologia. O carcinoma *in situ* pode ser dividido em lobular e ductal e representa cerca de 15% a 30% dos casos novos de câncer diagnosticados<sup>11, 12</sup>.

Por outro lado, o tipo invasivo abrange um grupo heterogêneo de tumores, sendo os tipos mais frequentes: ductal invasivo (75% de todas as lesões) e lobular invasivo (15% de todas as lesões), existindo ainda outros tipos menos frequentes (10%)<sup>13</sup>.

O câncer de mama é uma doença amplamente estudada na comunidade médica e científica por sua heterogeneidade tumoral<sup>14</sup>. A classificação histológica do câncer de mama, bem como a avaliação de sua extensão anatômica proposta pelo sistema de estadiamento TNM, por muitos anos foi a única ferramenta disponível para estratificação de risco do paciente<sup>15</sup>. Pouco depois, outras características biológicas relevantes foram incluídas na estratificação prognóstica, como o *status* dos receptores esteroides hormonais de estrogênio (RE) e progesterona (RP) e da superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (*human epidermal growth factor receptor-type 2*; HER2). A inclusão da avaliação destes biomarcadores na prática clínica por meio de técnicas de imunohistoquímica, foi determinante para o direcionamento do manejo clínico mais adequado para cada paciente, uma vez que este poderia se beneficiar com a hormonioterapia e/ou terapias alvo dependendo da ausência ou presença destes biomarcadores<sup>16</sup>. No entanto, estes fatores prognósticos baseados em variáveis histopatológicas tradicionais, não refletiam, ao menos completamente, a elevada heterogeneidade dos tumores de mama que possuíam substancial variabilidade no comportamento clínico, mesmo entre pacientes com variáveis prognósticas similares<sup>17</sup>.

## 1.3 Classificação por estadiamento clínico

Além disso, também é feita uma classificação dos tumores de mama de acordo com seu estadiamento clínico, baseado na avaliação do tamanho do tumor (T), comprometimento nodal (N) e metástase (M), a conhecida classificação TNM<sup>18-20</sup> (Tabela 2 e 3).

**Tabela 2** – Estadiamento clínico por meio do TNM das pacientes com câncer de mama.

Estadiamento	TNM
Estadio 0	TisN0M0
Estadio IA	T1*N0M0
Estadio IB	T0N1miM0 T1*N1miM0
Estadio IIA	T0N1M0 T1N1M0 T2N0M0
Estadio IIB	T2N1M0 T3N0M0
Estadio IIIA	T0N2M0 T1*N2M0 T2N2M0 T3N1M0 T3N2M0
Estadio IIIB	T4N0M0 T4N1M0 T4N2M0
Estadio IIIC	AnyT N3M0
Estadio IV	AnyT AnyN M1

**Fonte:** Adaptado de AJCC 8th Edition Staging for Breast Cancer<sup>21</sup>; \*T1 inclui T1mi



**Tabela 3** - Classificação TNM.

TNM	INTERPRETAÇÃO
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor com até 2 cm. em sua maior dimensão
T1mi	Carcinoma microinvasor (até 1 mm)
T2	Tumor com mais de 2 e até 5 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 5 cm. em sua maior dimensão
T4	Qualquer T com extensão para pele ou parede torácica
N0	Ausência de metástase
N1	Linfonodo(s) homolateral(is) móvel(is) comprometido(s)
N2	Metástase para linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is), fixos uns aos outros ou fixos a estruturas vizinhas ou metástase clinicamente aparente somente para linfonodo(s) da cadeia mamária interna homolateral
N3	Metástase para linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem comprometimento do(s) linfonodo(s) axilar(es), ou para linfonodo(s) da mamária interna homolateral clinicamente aparente na presença de evidência clínica de metástase para linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is), ou metástase para linfonodo(s) supraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem comprometimento do(s) linfonodo(s) axilar(es) ou da mamária interna
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância (incluindo LFN supraclaviculares)

**Fonte:** Adaptado de AJCC 8th Edition Staging for Breast Cancer<sup>21</sup>;

De acordo com a *American Cancer Society*<sup>18</sup>, a categoria T fornece informações sobre aspectos do tumor primário, como seu tamanho, quão profundamente se desenvolveu no órgão em que se originou e o quanto invadiu os tecidos adjacentes. O TX significa que o tumor não pode ser avaliado; T0 que não existe evidência de tumor primário (não pode ser encontrado). Já o Tis, as células neoplásicas estão se desenvolvendo apenas na camada mais superficial do tecido, sem invadir tecidos mais profundos (podendo ser designado de câncer *in situ*). Os números que aparecem após o T (como T1, T2, T3 e T4) descrevem o tamanho do tumor e/ou a disseminação da doença nas proximidades. Quanto mais alto o número atribuído ao T, maior o tumor e/ou mais disseminado nos tecidos próximos se encontra.

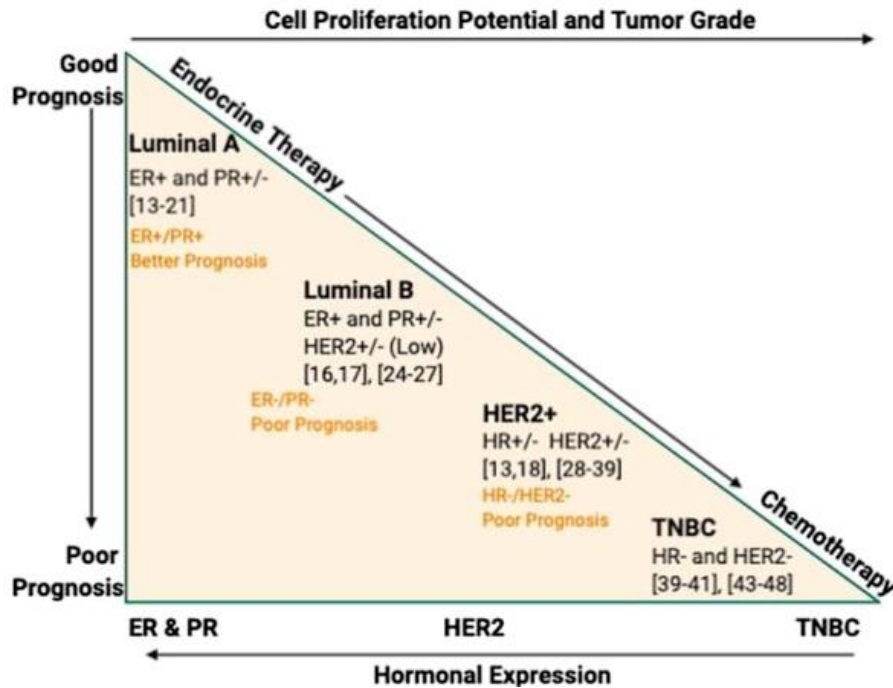
Já a categoria N, descreve se o câncer disseminou para os linfonodos próximos, onde o NX significa que os linfonodos não podem ser avaliados; N0 que os linfonodos vizinhos não apresentam câncer. Os números que aparecem após o N (N1, N2 e N3) descrevem o tamanho, localização e/ou o número de linfonodos com a doença. Quanto mais alto o número atribuído a N, mais o câncer está disseminado para os linfonodos.

E por fim, para a categoria M, descreve se o câncer disseminou (metástases) para locais distantes do corpo, onde M0 significa que nenhuma disseminação foi encontrada e M1 que o câncer disseminou para tecidos e órgãos distantes (metástases à distância são encontradas)<sup>18</sup>.

O câncer de mama é uma doença extremamente heterogênea, sendo que as características clínico-patológicas são determinantes para as escolhas terapêuticas<sup>22, 23</sup>. Historicamente, o tratamento e prognóstico do CM têm sido guiados pelo estadiamento (tamanho do tumor, presença de linfonodos regionais e metástases), grau histológico e pela expressão de marcadores obtidos por imunohistoquímica (IHQ) tais como receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e *human epidermal growth receptor 2* (HER2).

#### **1.4 Biomarcadores e câncer de mama**

Durante muito tempo biomarcadores moleculares tem sido associados a potenciais subtipos do câncer de mama baseando-se na instabilidade genômica<sup>24</sup> e alterações citogenéticas<sup>25</sup> dentre outros. No entanto, a patologia moderna na identificação de biomarcadores baseada em “*high-throughput screening*”, forneceu um melhor conhecimento sobre a heterogeneidade molecular do câncer de mama. Ela se baseia na identificação de biomarcadores baseados na expressão do receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e do receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2), que classifica o câncer de mama em cinco subtipos denominados luminal A e B, HER2 superexpresso e triplo negativo ou *basal-like* e *normal like* (Figura 2). Esta estratificação auxilia tanto no prognóstico quanto na decisão terapêutica<sup>16</sup>.



Fonte: Adaptado de Zubair, Wang & Ali.<sup>16</sup>

Figura 2 – Classificação do câncer de mama com base na estratificação molecular, classificação relativa, necessidade de terapia e prognóstico. A expressão do hormônio BC reflete uma proporção inversa ao grau do tumor e à proliferação celular. O subtipo A luminal exibe um melhor prognóstico com uma resposta positiva à terapia endócrina. Em contraste, o TNBC não apresenta expressão hormonal, tumor de maior estadiamento e grau nuclear com intensa atividade mitótica e mau prognóstico. RE, receptor de estrogênio; HER2, receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano; PR, receptor de progesterona e TNBC, câncer de mama triplo negativo.

De acordo com o *National Cancer Institute* (NCI/NIH, Bethesda, MD, EUA), biomarcadores são definidos como moléculas biológicas encontradas no sangue, outros fluidos corpóreos ou tecidos, indicando um processo normal ou anormal, ou uma condição ou doença. No câncer, eles podem ser divididos em três principais categorias: (1) biomarcadores de diagnóstico, utilizados para diagnóstico diferencial; (2), biomarcadores prognósticos, que podem distinguir tumores com desfecho favorável daqueles com desfecho desfavorável; e (3) biomarcadores preditivos, que podem prever resposta ao tratamento para um paciente em particular.

Os marcadores séricos como o CA-15-3 ou CEA são utilizados para monitorar a resposta à terapia em pacientes com câncer de mama. Porém, estes marcadores apresentam baixa especificidade, uma vez que podem apresentar níveis alterados em indivíduos com outras patologias que não o câncer e sua sensibilidade é satisfatória apenas para os casos mais avançados da doença<sup>26</sup>. Marcadores imunohistoquímicos de resposta a terapia com RE, RP e HER2 já são bem estabelecidos, enquanto que o Ki67 está relacionado ao prognóstico<sup>27, 28</sup>.

Dois ensaios baseados em análises de expressão gênica estão disponíveis comercialmente para prognóstico e determinação do risco de metástase em pacientes com câncer de mama em estadiamento clínico II, o *ONCOTYPE DX*<sup>29</sup> e o *MammaPrint*<sup>30</sup>.

O *ONCOTYPE DX* é um ensaio que avalia a expressão de 21 genes específicos dos quais 16 são relacionados ao câncer de mama. Atualmente é muito utilizado tanto para determinação de prognóstico bem como para identificar pacientes que não se beneficiariam com a terapia neoadjuvante<sup>29, 31</sup>. O *MammaPrint* também é um ensaio baseado no perfil de expressão de 70 genes candidatos a marcadores de risco para o desenvolvimento de metástase a distância<sup>30</sup>.

Outros testes como *PAM50*, *Breast Cancer Index* e *EndoPredict* tem sido bastante utilizados para prever o desenvolvimento de recorrência e seleção de pacientes direcionados a terapia hormonal<sup>32</sup>. Os subtipos intrínsecos identificados por Perou e colaboradores, baseou-se na assinatura de expressão gênica de 50 genes por meio da tecnologia de *microarrays*, formalmente conhecido como *PAM50 (Prosigna Breast Cancer Prognostic Gene Signature Assay)*, que é um teste genético que tem sido bastante utilizado para tomada de decisões terapêuticas<sup>33, 34</sup>.

As alterações moleculares precedem sintomas clínicos, desta forma, diversas lesões deixam de ser diagnosticadas até que tenham atingido um estágio avançado, quando o dano é irreversível e as chances de cura são mínimas. Assim a busca por biomarcadores de diagnóstico precoce para o câncer de mama é extremamente necessária.

No entanto até o momento, não existe nenhum biomarcador ou teste genético capaz de refletir o status molecular do início do câncer de mama.

### 1.5 Alterações genético-moleculares associadas ao câncer de mama

Algumas mutações somáticas já estão bem descritas associadas ao desenvolvimento do câncer de mama, tais como PIK3CA, PTEN, AKT1, TP53, GATA3, CDH1<sup>35, 36</sup>. De acordo com o estudo realizado pelo consorcio internacional *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), que integra vários dados genômicos tais como: alterações no número de cópias (CNVs - *copy number variations*), metilação no DNA, sequenciamento do exoma, expressão gênica, dentre outros), foi identificado que mutações somáticas em apenas três genes (TP53, PI3KCA e GATA3) estavam presentes em cerca de mais de 10% dos tumores de mama. No entanto, foram identificadas várias mutações associadas aos subtipos moleculares e o aumento de novas mutações específicas nos genes GATA3, PI3KCA e MAP3K1 associadas ao subtipo Luminal A<sup>35</sup>.

O tipo de mutação mais frequentemente identificada no gene TP53 (*Tumor Protein 53*) são do tipo *missense*, impedindo a atividade da proteína p53 e sua ligação ao DNA, sendo a alteração mais frequente nos tumores do tipo triplo negativo (TN)<sup>37</sup>. Mutações no gene PTEN (*Phosphatase and Tensin Holog*) estão associadas ao desenvolvimento de vários tumores de mama do tipo esporádico e está associado principalmente a instabilidade genômica e proliferação celular. Além disso, embora as mutações neste gene sejam menos proeminente, sua frequência de perda é de aproximadamente 30% a 40% nos tumores de mama e cerca de 25% presente nos tumores do subtipo HER2<sup>+</sup><sup>38</sup>.

Estudos mostram que deve haver, também, uma relação entre a frequência de mutações em genes específicos relacionados ao estadiamento clínico das pacientes. Um estudo identificou uma frequência em mutações no gene PIK3CA para todos os estadios. Por outro lado, mutações no gene TP53 eram as mais frequentes em pacientes com estadio IV (46,7%), seguido por mutações no PIK3CA (33,3%). Mutações nos genes GATA3 e MLL3 (20%, 13,3% respectivamente), foram as menos frequentes neste estadio<sup>39</sup>.

Em relação a expressão gênica e de acordo com os dados do TCGA, os tumores do subtipo triplo negativo, apresentam uma assinatura gênica bastante heterogênea, provavelmente pelo fato deste subtipo abrigar grupos distintos, tais como: *basal-like* e *basal não-like*<sup>35</sup>.

Recentemente identificou-se ainda, que alterações no padrão de expressão gênica dos genes associados a ciclina, como CDK1, CCNA2 e CCNB1, envolvidos na regulação do ciclo celular, estavam mais associados a estadios mais avançados do câncer de mama.<sup>40</sup>

Devido a importância na conduta clínica, muitos estudos estão sendo direcionados com o intuito de identificar alterações genéticas (perfil mutacional e de expressão gênica) relacionadas ao início e progressão do câncer de mama, como também, o impacto destas alterações na carcinogênese da mama, afim de obter um melhor entendimento das bases genético-moleculares que regem esta neoplasia, visando contribuir tanto com o diagnóstico quanto o tratamento<sup>39, 41-43</sup>. Entretanto, são escassos os estudos associando o perfil mutacional e/ou perfil de expressão gênica com os estadiamentos clínicos iniciais e avançados de pacientes com câncer de mama.

## 2 JUSTIFICATIVA

Considerando que:

1. O câncer de mama é uma doença genética bastante heterogênea e a neoplasia mais frequente entre as mulheres em todo o mundo;
2. No Brasil, esta neoplasia é a mais frequente tanto em termos de incidência quanto de mortalidade;
3. Há ainda, uma escassez de estratégias eficientes de rastreio em países em desenvolvimento como o Brasil, que dificulta o diagnóstico precoce impactando nas taxas de morbidade e mortalidade pela doença, como também, a diminuição das chances de cura pelos tratamentos convencionais;
4. A avaliação de alterações moleculares presentes em lesões, reside no fato de que estas alterações são altamente específicas de células tumorais/precursoras de tumor, enquanto que as alterações genéticas germinativas associadas ao risco de desenvolvimento destas lesões, podem ser detectadas em diferentes tipos celulares, mesmo antes do surgimento de lesões.

Este trabalho justifica-se por ser pioneiro na identificação de alterações genéticas em um grupo expressivo de mulheres brasileiras com câncer de mama tanto em estádios iniciais quanto avançados. Concebemos ainda que a possibilidade da identificação de biomarcadores genéticos, baseados tanto no perfil mutacional quanto o de expressão gênica em um mesmo grupo de pacientes com câncer de mama, que possam auxiliar na identificação de lesões precursoras ou cânceres em estádios iniciais é uma estratégia promissora.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Caracterizar o perfil molecular envolvendo mutações somáticas e expressão dos principais genes envolvidos com a carcinogênese da mama e correlacionar com as informações anatomopatológicas dos tumores de mama do Hospital de Amor de Barretos.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- 1.** Avaliar o perfil mutacional somático das amostras com câncer de mama em estágio I, II e IIIa, por meio do sequenciamento de nova geração do exoma;
- 2.** Realizar o perfil de expressão gênica utilizando o painel *nCounter Breast Cancer 360* (776 genes) em tumores de mama com estágios I, II e IIIa, por meio da tecnologia *NanoString*;
- 3.** Tentar correlacionar o perfil mutacional somático dos casos de câncer de mama em estágio I, II e IIIa com o perfil de expressão gênica.

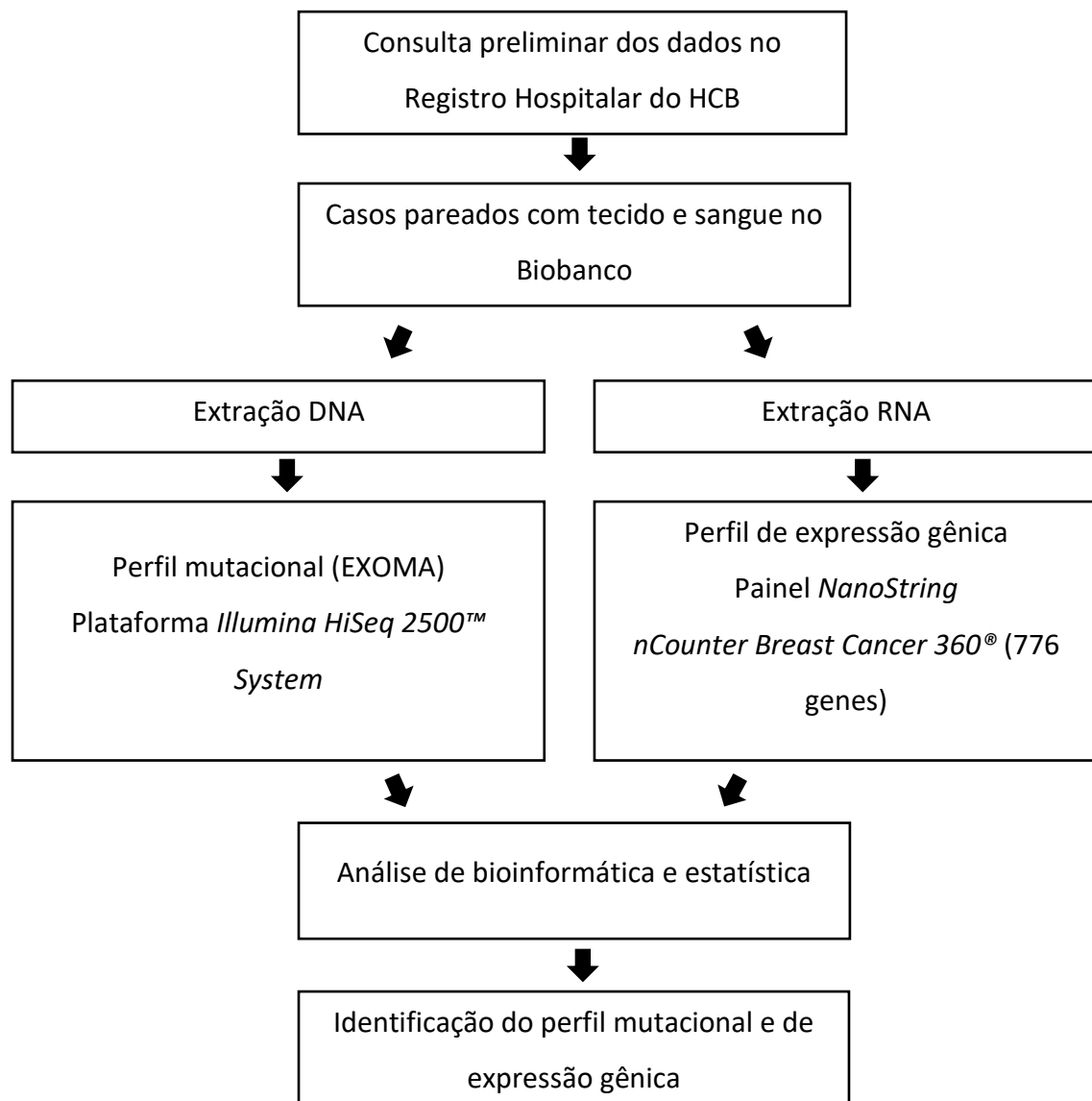


## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo observacional retrospectivo.

### 4.2 Delineamento experimental



### **4.3 Aspectos éticos**

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos/Fundação Pio XII (CEP processo: 1212/2016). O presente estudo obedeceu aos critérios éticos em conformidade com a resolução CNS 466/12.

O estudo apresenta riscos mínimos por utilizar coleta retrospectiva de material biológico e dados de prontuários, sendo o principal risco para os participantes a quebra acidental de sigilo, o que os pesquisadores vão procurar minimizar utilizando cuidadosamente medidas de segurança quanto à confidencialidade, privacidade e armazenamento de dados.

O estudo é considerado de baixo risco para o paciente por não envolver procedimentos invasivos e por se tratar de um estudo retrospectivo. A análise molecular foi realizada retrospectivamente a partir do tecido tumoral e sangue das pacientes armazenados sob criopreservação junto ao Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos<sup>44</sup>.

### **4.4 População do estudo**

O estudo foi desenvolvido no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos (Barretos, SP), onde foram incluídas 82 pacientes, sendo amostras por conveniência.

#### *a) Critérios de inclusão*

Como casos, foram incluídas pacientes com carcinoma de mama dos subtipos moleculares luminal A, luminal B, luminal B HER2+, HER2+ e Triplo Negativo com estadiamentos I, II e IIIa acompanhadas no Hospital de Amor de Barretos e que tinham a disponibilidade tecido tumoral criopreservado e sangue pareados da mesma paciente disponíveis no Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos<sup>44</sup>.

Em relação aos estadiamentos, os estádios I e II foram considerados como iniciais e o estágio IIIa como avançado.

b) *Crítérios de exclusão*

Material genético (DNA e RNA) de baixa qualidade e porcentagem tumoral <60% e necrose acima de 20%.

#### **4.5 Levantamento dos dados clínico-patológicos**

Após a consulta preliminar a fim de avaliar a existência de potenciais casos no Registro Hospitalar do Hospital de Amor de Barretos, foram encontrados 105 potenciais casos de câncer de mama. Estes passaram pelos critérios de inclusão e exclusão, verificados pelo sistema online do hospital *SISONCO* sua disponibilidade bem como se estas amostras estavam pareadas (tecido tumoral e sangue) e assim armazenados na plataforma de coleta e gerenciamento de dados de pesquisas *REDCap* (*Research Electronic Data Capture - Vanderbilt University*).

O número amostral para o estudo foi por conveniência. Para as análises do perfil de expressão gênica e para o perfil mutacional foram selecionadas, 82 pacientes nos estadiamentos clínicos I, II e IIIa dos subtipos moleculares luminal A, luminal B com superexpressão de HER2+, HER2+ e triplo negativo.

As análises estatísticas e dados clínico-patológicos foram trabalhados no programa *IBM-SPSS Statistic®* (*version 20.0, SPSS Inc.*).

#### **4.6 Processamento das amostras no Biobanco do HCB**

##### **Extração de DNA e RNA**

As amostras de tecido tumoral com porcentagem de células tumorais acima de 60% e abaixo de 20% de necrose foram avaliadas e consideradas para o estudo após avaliação por um patologista experiente da nossa instituição. A extração de DNA do tecido tumoral criopreservadas foi realizada utilizando o *Kit QIASymphony DNA Mini* (*Qiagen*) e a extração de DNA do *buffy coat* pelo *Kit QIASymphony DNA Midi* (*Qiagen*) utilizando a plataforma automatizada *QIASymphony* (*Qiagen*), seguindo as instruções do fabricante. A qualidade das amostras foi realizada utilizando o equipamento *Nanodrop* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*) e *Qubit® Fluorometric Quantitation* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA*).

O RNA total do tecido tumoral foi obtido por meio do Kit *QIASymphony RNA Kit* (Qiagen), utilizando a plataforma automatizada *QIASymphony* (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante. A qualidade das amostras foi realizada utilizando o equipamento *Nanodrop* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e *Qubit® Fluorometric Quantitation* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

#### **4.7 Análise do perfil mutacional (exoma completo)**

O perfil mutacional do exoma foi realizado em amostras pareadas de sangue e tecido tumoral. O sequenciamento foi realizado na plataforma *Illumina HiSeq 2500™ System*, pela empresa de biotecnologia Mendelics (São Paulo).

O sequenciamento englobou toda a região codificadora do genoma, com cobertura média para cada amostra tumoral de aproximadamente 75x, com mínimo de aproximadamente 70x (cobertura vertical), em um padrão observado ao longo de mais de 90% de todas as regiões analisadas (cobertura horizontal).

O fluxo de trabalho desse método conta com quatro etapas básicas: (1) *Preparação da biblioteca* onde é realizada a fragmentação aleatória do DNA ou amostras de cDNA seguido pela ligação de adaptadores em suas extremidades. Os fragmentos ligados aos adaptadores são amplificados por PCR e purificados em gel. (2) *Geração de clusters*: a biblioteca é incorporada à superfície *flow cell*, coberta com oligonucleotídeos complementares aos adaptadores da biblioteca. Cada fragmento é amplificado em *clusters* clonais por meio da amplificação de ponte. Após a geração dos *clusters*, os modelos estão prontos para o sequenciamento. (3) *Sequenciamento*: reagentes de sequenciamento, incluindo nucleotídeos marcados com fluorescência, são adicionados e a primeira base é incorporada. A *flow cell* é detectada pelo equipamento, gerando uma imagem digital e a emissão de cada *cluster* é registrada. O comprimento de onda e a intensidade de emissão são usados para identificar a base. Este ciclo é repetido 'n' vezes para criar um comprimento de leitura de 'n' bases. (4) *Análise de dados*: as leituras de sequência recém-identificadas são alinhadas a um genoma de referência. Após o alinhamento, muitas variações podem ser encontradas na análise, como a identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) ou inserções e deleções, contagem de leitura para métodos de RNA, análises filogenéticas ou metagenômicas, e muito mais<sup>45</sup>.

#### 4.8 Análises dos dados do perfil mutacional (exoma completo)

Para a análise de bioinformática, foi realizado o controle de qualidade por meio da ferramenta *fastqc*. O alinhamento com genoma de referência na versão *GRCh37* utilizando o alinhador *BWA MEM*. Posteriormente, foram avaliadas as alterações somáticas (por meio do pareamento normal-tumor) utilizando a ferramenta *MuTect2* (<http://www.broadinstitute.org/cancer/cga/mutect>) para identificação de SNVs, inserções e deleções. As mutações identificadas foram anotadas utilizando a ferramenta *AnnoVar* e filtros aplicados a partir das bases de dados populacionais tais como *GnomAD*, *1000 genomas* e *ABraOM*.

A identificação de potenciais genes “*drivers*” foi realizada utilizando a base de dados do *Cancer Genome Interpreter (CGI)* (<http://www.cancergenomeinterpreter.org>). Variantes de nucleotídeo único de *drivers* são identificadas por *boostDM*, um método baseado em aprendizado automático empregado na mutagênese de saturação *in silico* de genes de câncer, ou - se nenhum modelo estiver disponível para um gene de câncer no tipo de tumor de interesse - por *OncodriveMut*. Os *indels* de *drivers* são identificados por *OncodriveMut*.

As análises de bioinformática foram realizadas por bioinformata especialista do Hospital de Amor de Barretos.

#### 4.9 Análise do perfil de expressão gênica

Para o perfil de expressão gênica, foi utilizado o painel *nCounter Breast Cancer 360*<sup>®</sup> (776 genes) da *NanoString*<sup>®</sup> *Technologies*. Este painel conta com a avaliação de 776 genes específicos envolvidos em processos e vias de sinalização celular no câncer de mama associados ao tumor, a resposta imune e o microambiente que afetam a metástase tumoral. A escolha deste painel baseou-se no fato de que a análise da expressão gênica de diferentes vias de sinalização permite identificar alterações no câncer de mama.

O *NanoString* (*NanoString Technologies*, Seattle, WA, EUA) é um dispositivo automatizado que requer pouco tempo dispensando às atividades de bancada e pode processar até 12 amostras distintas simultaneamente. De acordo com o painel escolhido, pode-se avaliar a expressão gênica de dezenas e até centenas de genes de interesse bem como rearranjos/translocações e CNVs pela tecnologia *nCounter*<sup>®</sup> (*NanoString Technologies*, Seattle, WA, EUA). Este sistema captura e conta um código baseado em combinações de 4

cores (*color-code*), correspondendo cada combinação a um gene distinto. Esta técnica é extremamente sensível, sendo comparável à PCR em tempo real e mais sensível que o método de microarranjos, sem necessitar de reações enzimáticas e amplificação. Além disso, esta técnica é capaz de detectar fragmentos pequenos provenientes de amostras com alto grau de degradação (amostras derivadas de tecido parafinado, por exemplo) e não necessita validação por outro método. Com um *input* amostral de 100ng de RNA total é possível avaliar a expressão de centenas de genes de interesse.

Para a etapa de hibridização, é adicionado para cada molécula de RNA duas sondas, uma de captura e outra repórter, e assim, hibridizadas por 21 horas a 65°C. O cartucho onde serão fixadas essas moléculas de RNA para posteriormente fazer a leitura e contagem, que é revestido a sua superfície por estreptavidina, na extremidade 3' da sonda de captura há uma molécula de biotina e, portanto, fixa as moléculas neste cartucho por meio da ligação biotina-estreptavidina. Já a sonda repórter, tem um código de cores chamado de *barcodes* em sua extremidade, em que cada sequência de cores corresponde a um gene específico.

Após essa etapa, acontece a etapa de pós-hibridização em que é realizado no equipamento *nCounter Prep Station*, que é responsável pela ligação das *beads* magnéticas ao complexo sonda/alvo. As sondas que não tiveram nenhuma interação, são removidas por meio da lavagem baseada em *beads*, purificação magnética. Por fim, os complexos são eluídos, imobilizados e alinhado na superfície do cartucho.

Em outro equipamento, no *nCounter Digital Analyzer*, é realizada a coleta de dados, em que é feito a contagem de cada *barcode* correspondente a uma molécula específica de um gene. Para essa contagem, é considerado uma sensibilidade padrão (*Standart*) de (280 FOVs- Fields of View). Esses dados foram captados pelo programa *nSolverAnalysis Software v2.6*<sup>®</sup> (*NanoString Technologies*, Seattle, WA, EUA e tabulados em formato RCC (*Reporter Code Count*). Por fim, foram normalizados e analisados pelo programa estatístico-matemático *R (R-project v3.2.1; The R Foundation*, Viena, Áustria).

#### **4.10 Análise dos dados de expressão gênica**

Após os dados serem importados, foi realizado o processamento no programa estatístico-matemático *R (R-project v3.2.1; The R Foundation*, Viena, Austria) por meio de *scripts* customizados conforme Markowitz et al., 2016<sup>46</sup>: Inicialmente, os arquivos em formato

*RCC* foram importados simultaneamente utilizando a função *read.markup.RCC* do pacote *NanoStringNorm* que permite a importação simultânea de todos os arquivos e realiza a conversão dos mesmos em uma matriz de expressão de dados brutos, a qual foi transformada em *log2*.

Em seguida, foi estabelecido um *cutoff*, que foi calculado pela média aritmética dos valores de controles negativos mais duas vezes o desvio padrão. Após definir um *cutoff* para cada análise, foi aplicado um método de filtro, que consiste em retirar das análises aqueles RNAs cujos dados de expressão estejam inferiores ao *cutoff* em, pelo menos, 80% das amostras analisadas o qual foi realizado utilizando a função *subset* em *R*. Por fim, foram selecionados genes com *lowCV* como *housekeepings*.

As análises estatísticas foram realizadas considerando a distribuição normal das amostras. Foi realizada a estatística F utilizando o pacote *limma* com correção para FDR (*False Discovery Rate*) utilizando o pacote *multtest* do *Bioconductor*. Análises de *Fold-change* foram realizadas para identificar RNAs diferencialmente expressos. Todas as imagens resultantes dessa análise foram geradas a partir dos pacotes *ggplot2* e *ComplexHeatmaps* (*Bioconductor*<sup>47</sup>).

As análises de bioinformática foram realizadas por bioinformata especialista do Hospital de Amor de Barretos.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características clínico-patológicas

Dos 105 potenciais casos para o estudo, 23 foram excluídos por não apresentarem percentagem tumoral suficiente seguindo os critérios de exclusão (n= 6) e pela não disponibilidade de material pareado (tecido tumoral e sangue) no Biobanco (n= 17). Dentre os 82 casos restantes, a média de idade das pacientes foi de 54.4 anos e sua maioria com subtipo molecular luminal B (37.8%). Em relação as outras características avaliadas, houve um predomínio no estadiamento II (58.5%), tamanho tumoral entre 2 e 5 centímetros de diâmetro (48.8%), sem comprometimento linfonodal (58.5%) e tipo histológico ductal (86.6%) (Tabela 4).

**Tabela 4** – Características clínico-patológicas dos casos do estudo

Características clínico-patológicas		Total (n=82)
Média da idade (em anos)		54.4
Subtipo molecular	Luminal A	26 (31.7%)
	Luminal B	31 (37.8%)
	Luminal B HER2+	12 (14.7%)
	Triplo negativo	11 (13.4%)
	HER2+	2 (2.4%)
Estadiamento clínico	I	25 (30.5%)
	II	48 (58.5%)
	IIIa	9 (11%)
Tamanho tumoral	T1	35 (42.7%)
	T2	40 (48.8%)
	T3	7 (8.5%)
Comprometimento linfonodal	N0	48 (58.5%)
	N1	25 (30.5%)
	N2	9 (11%)
Tipo histológico	Ductal	71 (86.6%)
	Lobular	11 (13.4%)

T= tamanho tumoral; N= acometimento linfonodal.



## 5.2 Perfil mutacional e sua correlação com o estadiamento clínico

O sequenciamento completo do exoma pela plataforma *Illumina HiSeq 2500™System* foi realizado em todos os casos do estudo (n=82) para avaliação do perfil mutacional tumoral. A cobertura média no sequenciamento foi de 75x.

Encontramos 127 variantes em regiões codificadoras (104 mutações *missense*, 14 mutações *nonsense*, 9 *splice site*). As mutações em regiões codificadoras distribuíram-se em 16 genes.

Os genes com frequência mutacional acima de 4% estão demonstrados na Figura 3. São eles: *PIK3CA* (44%), *TP53* (33%), *PARP4* (7%), *MKI67* (6%), *BRCA2* (5%), *DLGAP5* (5%), *ERBB2* (5%), *FOXA1* (5%), *PTEN* (5%), *AKT3* (4%), *ALDH1A1* (4%), *BRCA1* (4%), *CDH1* (4%), *COL27A1* (4%), *POLQ* (4%) e *RELN* (4%).

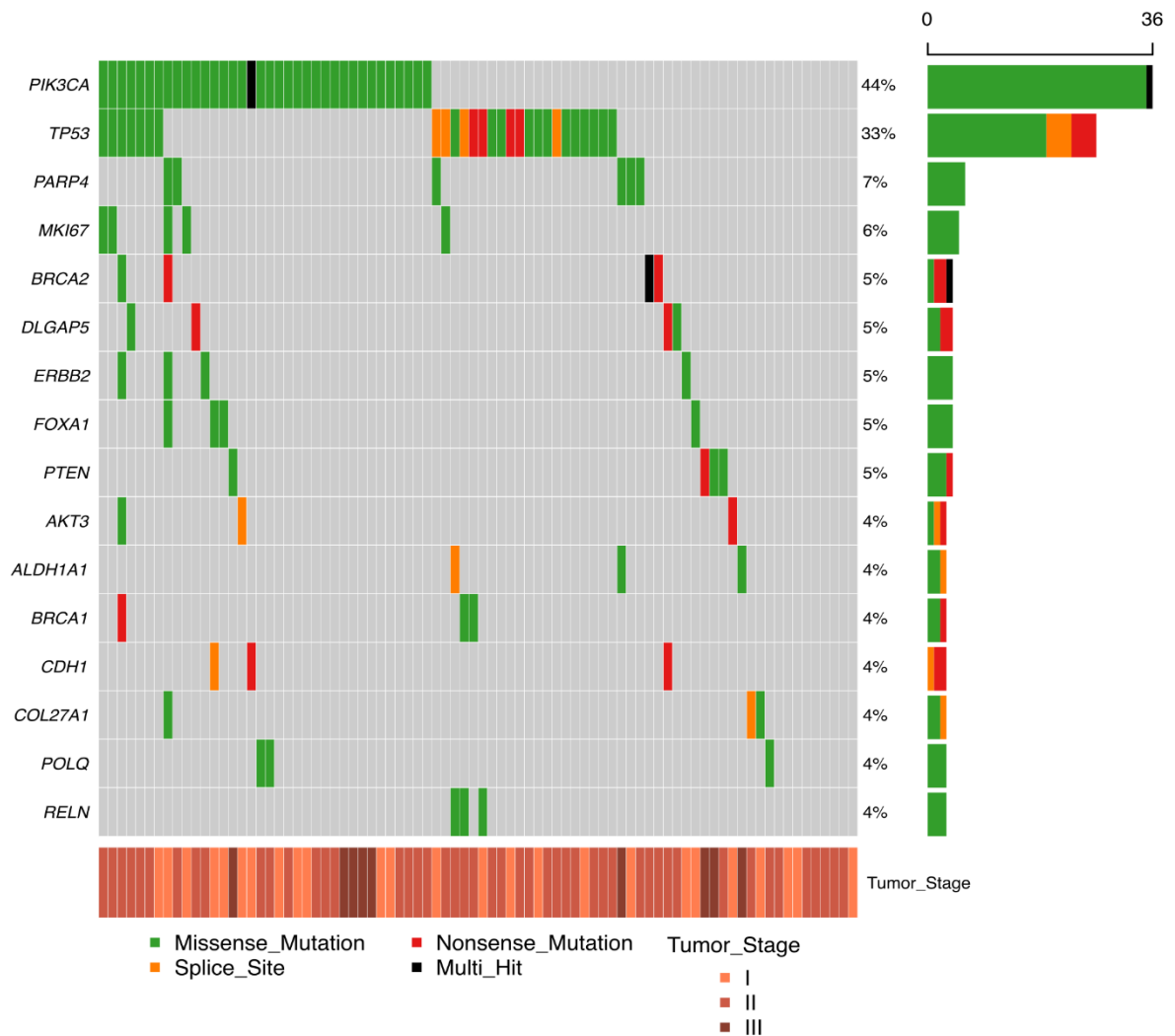


Figura 3 – Oncoplot dos 16 genes (linhas) de maior frequência mutacional entre os exomas completos das pacientes (colunas) deste estudo.

Quadrados coloridos indicam genes mutados e quadrado cinza indicam genes não mutados. Cada cor representa um tipo diferente de mutação: mutação *missense* (verde), mutação *nonsense* (vermelho), mutação *splice site* (laranja) e *multi-hit* (preto). Os estadios estão representados pela barra de gradiente de cores abaixo do Oncoplot.

### 5.3 Associação do perfil de expressão gênica com o estadiamento clínico

Foi comparado a expressão gênica entre os estadiamentos I, II e IIIa. Dentre os 776 genes avaliados pelo painel *Breast Cancer 360*<sup>®</sup> da *NanoString Technologies*, cerca de 49 genes apresentaram-se como diferencialmente expressos com significância estatística ( $p < 0,05$  e 1,5 de *fold-change*). Foi possível identificar dois grupos (*clusters*): um *cluster* de 29 genes (NOTCH3, FLT3, BCL2, DNAJC12, FGF10, HSPA2, ERBB4, TFF3, CHAD, CACNA1D, IFT140, FZD8, GPC4, CEACAM5, CEACAM6, OCLN, ST6GALNAC2, JUN, BTG2, FOS, PLA2G2A, ACVR1C, EREG, AREG, CDKN1C, PDK4, RELN, NGFR e SCARA5) cuja expressão é mais evidenciada em pacientes do estadio I e em parte das pacientes do estadio II; e outro *cluster* de 20 genes (FUT3, HOXB13, WNT10A, RASGRF1, FOXP3, MFNG, PIK3CG, BMP2, TLX1, APOE, NOD2, CXCL10, FAM83D, CDKN3, ANLN, FOXM1, DLGAP5, PRC1, KIF14 e SERPINH1) cuja expressão é mais evidenciada em parte das pacientes do estadio II e no estadio IIIa. (Figura 4).

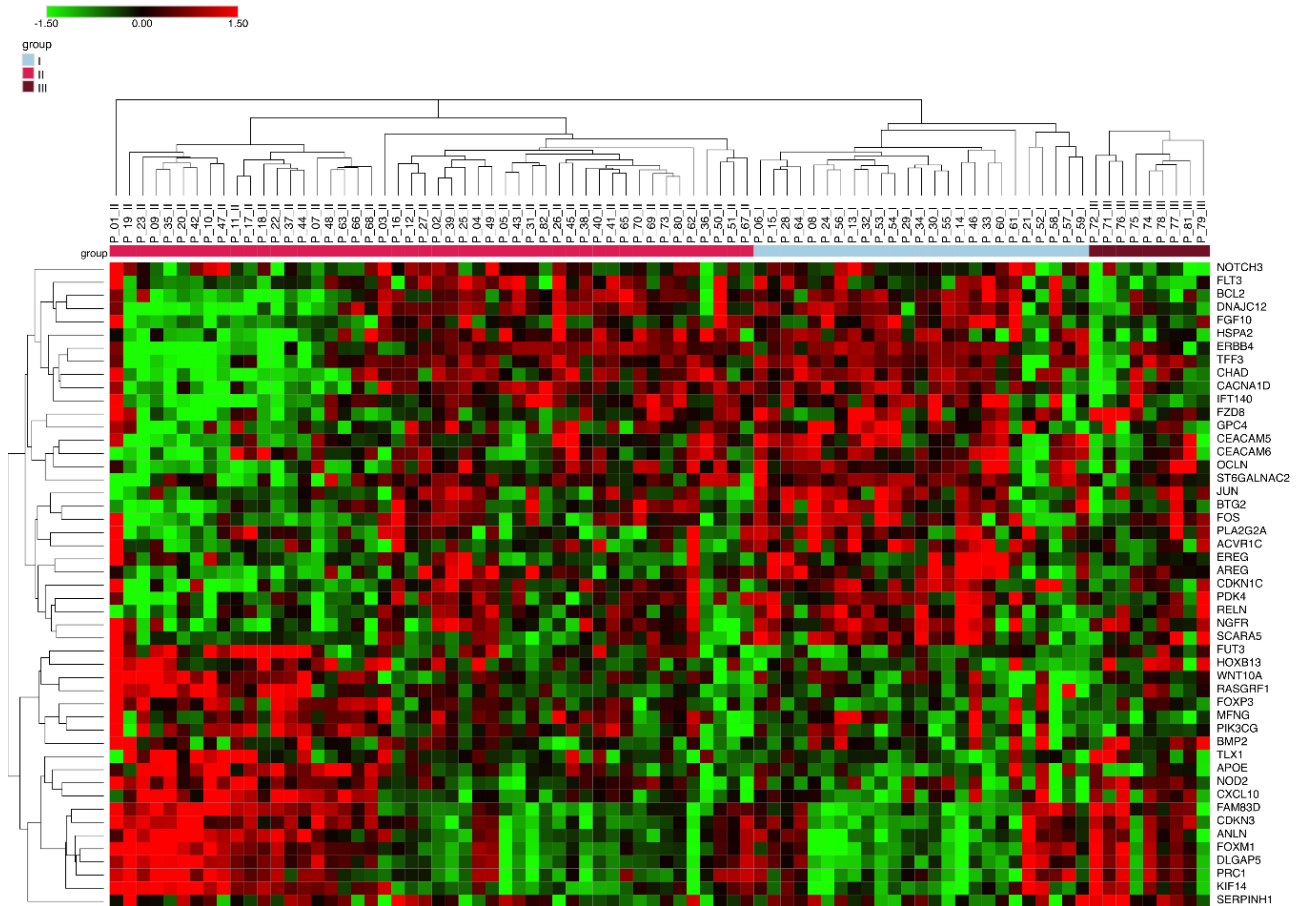


Figura 4 – Genes diferencialmente expressos em pacientes com câncer de mama nos estadiamentos clínicos I, II e IIIa.

As colunas representam as pacientes e as linhas os genes identificados. Na barra de cores acima do *heatmap*, estão representados os estadiamentos: estadiamento I (azul), estadiamento II (rosa) e estadiamento III (marrom).

## 6 DISCUSSÃO

Embora a caracterização molecular do câncer de mama seja alvo de muitos estudos, muitas questões ainda permanecem obscuras, principalmente em decorrência da heterogeneidade desse tipo tumoral<sup>35, 48</sup>. A identificação dos perfis mutacionais e de padrões de expressão gênica têm sido associados com diversas manifestações clínicas e com o prognóstico do carcinoma mamário<sup>49</sup>. No entanto, ainda se faz necessário compreender com maior profundidade perfis genético-moleculares por meio de análises da presença de mutações somáticas e a alteração no padrão da expressão de genes correspondentes aos estádios mais iniciais da doença<sup>50, 51</sup>. A presente casuística compreendeu 82 pacientes com câncer de mama em estadiamentos I, II e IIIa para avaliação concomitante de mutações somáticas do exoma e expressão de RNAm por meio de um painel gênico direcionado para essa doença.

A avaliação do perfil mutacional somático das pacientes analisados permitiu a identificação de diversos genes que podem ser classificados como *drivers* e *passengers*, ou seja genes cujas mutações podem estar associadas ao crescimento tumoral ao conferir uma vantagem seletiva, ou os que não promovem a iniciação ou progressão tumoral de forma direta<sup>52, 53</sup>. Estima-se que o número médio de alterações *drivers* é de dois, podendo variar de um a cinco de acordo com o tipo tumoral<sup>54, 55</sup>. Dentro desse contexto, na série analisada, dois genes *drivers* se destacam, PIK3CA e TP53, com frequência de 44% e 33%, respectivamente. Além disso, apenas 7 pacientes apresentaram mutação em ambos os genes, evidenciando um padrão conhecido como exclusividade mútua. Em geral, genes que apresentam mutações mutuamente exclusivas e estão envolvidos no mesmo processo biológico<sup>56</sup>. Recentemente tem sido descrito padrões com alterações em processos biológicos similares que tendem a ser redundantes, ou seja, uma alteração já é suficiente para causar a desregulação do processo, e a presença de mais de uma mutação nesse contexto pode acarretar em morte celular<sup>56</sup>. Dessa forma, a identificação de eventos mutuamente exclusivos pode permitir a identificação de novas interações funcionais, o *cross-talk* de vias relacionadas ao câncer e potenciais alvos terapêuticos<sup>57</sup>.

Dentre os genes *drivers* mais frequentemente alterados, o gene PIK3CA (*phosphatidylinositol -4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) apresenta 86.190 pares de bases dispostos em 21 exons, codifica uma subunidade regulatória de 85 kDa e a isoforma alfa da subunidade catalítica (p110a) da classe IA da quinase PI3K<sup>58</sup>. Em termos

funcionais, as quinases PI3K atuam no processo de fosforilação da porção 3'-OH do anel de inositol de fosfoinositídeos, o que culmina na ativação de processos celulares como a proliferação e sobrevivência celular cuja desregulação está associado com o desenvolvimento de diversos tipos tumorais<sup>58</sup>. Considerando a estrutura proteica, os domínios PI3K-ABD e PI3K-RBD interagem com o domínio quinase PI3K/PI4K. Outras funções, como o recrutamento para a membrana plasmática é executado pelo domínio C2 PI3Ktype. Já as interações de função inibitória ocorrem por interações com a proteína PIK3R1, são executados pelos domínios C2 PI3K-type, PI3K helical, e PI3K/PI4K quinase com regiões específicas da proteína PIK3R1 (<https://www.uniprot.org/uniprot/P42336>). As mutações *hotspots* mais frequentes nesse gene ocorrem no domínio PI3K helical (mutações E545K and E542K) e no domínio PI3K quinase (mutação H1047R). Essas alterações acarretam a ativação constitutiva de p110a com transformação oncogênica em câncer de mama<sup>59, 60</sup>. Considerando que as mutações em PIK3CA são indicativas de ganho de função, nesse estudo a indução da expressão desse gene foi observada em alguns casos.

A frequência de mutações somáticas do gene PIK3CA encontrada foi maior do que a previamente reportada. Um trabalho recente envolvendo 560 tumores de mama encontrou apenas 30% de alteração desse gene, em comparação com 44% dos casos desse trabalho<sup>61</sup>. Dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) mostram uma frequência similar, de apenas 36%<sup>35</sup>. Apesar do tamanho da presente casuística ser de fato uma limitação, evidências mostram que a frequência desse tipo tumoral é maior em tumores do subtipo tumoral luminal, em concordância com a nossa casuística, composta por pacientes em estadios iniciais e em sua maioria dos subtipos luminal A, luminal B e luminal B HER+<sup>62</sup>. Assim, dentre os tumores de mama luminais do TCGA, encontram-se 45% de mutações somáticas em PIK3CA, de forma similar com os achados do ensaio clínico randomizado BOLERO-2 (47.6%) e de um estudo independente com 50% de alteração desse gene<sup>35, 63, 64</sup>. Em paralelo, esse gene também foi reportado com maior número de alterações em subtipo histológico ductal, também em maioria nos nossos casos<sup>65</sup>. Um outro aspecto de relevância nesse cenário é o impacto da ancestralidade genética<sup>66</sup>. Considerando a ampla miscigenação da população brasileira, espera-se algumas diferenças em relação à frequência de alguns genes<sup>67</sup>. É conhecida a menor incidência de tumores hormônio-dependentes em mulheres afro-americanas, assim como na população chinesa<sup>64, 68</sup>. Além disso, estudos experimentais em animais *knock-in* para PIK3CA mostram diminuição da via mTORC1 e aumento da expressão de genes relacionados com a

via do receptor de estrógeno, evidenciando que mutações desse gene poderiam estar relacionados a processos oncogênicos via sinalização do receptor de estrógeno<sup>62, 69</sup>. Finalmente, as mutações somáticas de PIK3CA têm sido associadas a um melhor desfecho clínico, o que corrobora com a evidência de maior frequência em subtipo molecular luminal e estadios iniciais, conforme encontrado nesse trabalho.

Outro gene frequentemente alterado na série estudada é o TP53 (*tumor protein p53*) que localiza-se no cromossomo 17p13.1 com 19.069 pares de bases dispostos em 12 exons, codifica um fator de transcrição com papel supressor tumoral que é ativado por fatores de estresse celular tais como dano do DNA<sup>70</sup>. Os genes *downstream* modulados pelo TP53 estão envolvidos no ciclo celular, apoptose, entre outros<sup>70</sup>. Esse gene trata-se de um *driver* em vários tipos tumorais, sendo considerado o mais frequentemente alterado no câncer, incluindo o carcinoma mamário<sup>35, 71</sup>. A maioria das mutações com potencial patogênico afeta as interações TP53-DNA, em sua maioria *missenses* que resultam em uma proteína estável e não truncada, ao contrário da maioria dos supressores tumorais<sup>72</sup>. Assim, algumas mutações estão associadas com a perda e outras com ganho de função, com diferentes consequências funcionais. A proteína possui diversas regiões de interação, oligomerização e de ativação transcricional com vários domínios proteicos associados. As regiões que apresentam alterações estruturais em decorrência das mutações são o domínio central que resultam na perda da atividade de ligação ao DNA (exons 5-8)<sup>72, 73</sup>. No presente trabalho foram encontradas alterações ao longo de todo gene, afetando diferentes porções da estrutura proteica.

O gene TP53 é frequentemente reportado com mutado em aproximadamente 30-40% dos casos de câncer de mama, em concordância com os nossos achados<sup>74, 75</sup>. De forma comparativa, os dados do TCGA mostram uma alteração de 37% e o estudo de Nik-Zainal e colaboradores com 560 amostras de câncer de mama mostrou uma frequência de 41%<sup>35, 61</sup>. No entanto, evidências apontam frequências diferentes em decorrência de diversos fatores associados com a heterogeneidade do câncer de mama, com a etnia e com o tipo de alteração<sup>74, 75</sup>. Um estudo comparativo entre a coorte do *Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium* (METABRIC, frequência de 34,4%), e da coorte do *Guangdong Provincial People's Hospital* (GDPH, frequência de 51.3%) mostrou que a taxa das alterações de TP53 na população chinesa da GDPH é maior<sup>71</sup>. Além disso, a coorte GDPH possui um maior número de pacientes em estadios III e IV<sup>71</sup>. É importante observar que a

coorte METABRIC apresenta apenas 6.4% de casos em estadios avançados, uma casuística relativamente parecida com a avaliada no presente estudo<sup>71</sup>. Em relação ao tipo de alteração e o seu efeito, acredita-se que a ocorrência de *hotspots* em um determinado gene *driver* ocorra por meio de vantagem seletiva que é altamente mutável de acordo com o contexto ou fatores ambientais associados<sup>76</sup>. Dessa forma, uma frequência maior de alterações não necessariamente significa uma relevância para caracterização ou tratamento de um tipo tumoral<sup>53</sup>. Finalmente, é importante considerar que os subtipos triplo negativos e pacientes HER2+ apresentam uma maior frequência de alterações em TP53 podendo chegar a até aproximadamente 80% nos subtipos *basal-like*, minoria em nossos casos<sup>35, 77</sup>. Ainda nesse contexto, os dados do TCGA mostram que alterações desse gene em tumores *basal-like* eram em sua maioria patogênicas dos tipos *nonsense* e *frameshift* em contraste com mutações *missenses* em tumores luminais, também em concordância com nossos achados<sup>35</sup>.

A segunda parte do estudo consistiu em uma avaliação paralela do perfil de expressão gênica, com o intuito de comparar os três estadios analisados em um painel de genes específicos de câncer de mama. Este painel contém 776 genes reunidos em assinaturas envolvidas com câncer de mama, separados principalmente em genes do processo carcinogênico e da resposta imunológica (<https://www.nanostring.com/products/ncounterassays-panels/oncology/breast-cancer-360/>). As pacientes dos grupos com estadiamentos I e II apresentaram perfis de expressão gênica mais semelhantes em relação ao estadio IIIa, que se apresentou como um grupo (cluster) separado. Tal separação é esperada, considerando-se que o estadiamento II é reportado na literatura como um subgrupo de grande heterogeneidade<sup>78</sup>. Além disso, apesar do baixo número de pacientes do estadiamento IIIa, este cluster apresentou um perfil bem específico, permitindo a separação de pacientes do estadiamento II com um possível indicativo de potencial invasivo.

Em relação aos achados associados aos agrupamentos gênicos, um primeiro grupo de 29 genes apresentaram-se reprimidos em parte das pacientes com estadiamento II e na maioria dos casos IIIa. Dentre os genes alterados destaca-se um gene do processo de apoptose, o BCL2. A família de proteínas BCL2 é amplamente conhecida como reguladora da morte celular por apoptose via interações proteína-proteína<sup>79</sup>. A proteína BCL2 é uma proteína anti-apoptótica que promove a sobrevivência celular<sup>80</sup>. No câncer de mama, a expressão de BCL2 inibe a morte celular e tem sido relacionada a um prognóstico favorável. A



repressão desses genes em tumores de estadios II e IIIa pode parecer contraditória nesse contexto. No entanto, embora a proteína BCL2 esteja associada com a apoptose, ela também pode atuar em um processo antiproliferativo por meio de vias independentes de regulação distinta<sup>81</sup>. Além disso, a expressão de mRNA nem sempre correlaciona com a expressão da proteína. Alguns estudos mostram regulação transcricional de BCL2 pelo receptor de estrógeno e que tumores BCL-2 positivos tendem a ser de menor grau, o que corrobora com os nossos achados<sup>82, 83</sup>. A repressão de BCL2 também foi encontrada em metástases de um subgrupo de tumores Luminal A<sup>81</sup>.

Do agrupamento de 20 genes que estavam induzidos em parte das pacientes de estadios II e em IIIa, destacam-se os pertencentes ao processo de angiogênese (SERPINH1) e sinalização de citocinas e quimiocinas (CXCL10 e FOXP3). Dentre esses genes, o SERPINH1 localiza-se no cromossomo 11q13.5, uma das regiões amplificadas com mais frequência em diversos cânceres, e codifica uma proteína chaperona, HSP47, associada com o dobramento e secreção de proteínas do colágeno<sup>84, 85</sup>. O gene SERPINH1 foi reportado com expressão alterada em câncer de mama, regulando a expressão de uma rede de genes da matriz extracelular<sup>86</sup>. Um estudo recente associou a expressão de SERPINH1 com a metástase no carcinoma mamário, associado com a deposição de colágeno e o recrutamento e interação de plaquetas com células tumorais, aumentando a chance de colonização de outros sítios<sup>87</sup>. Tais achados corroboram com a evidência de um fenótipo invasivo dos pacientes com expressão desse gene.

Dos genes da sinalização de citocinas e quimiocinas induzidos em estadios II e IIIa, o CXCL10 codifica uma proteína que pertence à subfamília das quimiocinas CXC, uma das principais famílias de quimiocinas em humanos<sup>88</sup>. O gene CXCL10 é expresso em uma variedade de tipos celulares em resposta ao interferon-grama, incluindo monócitos, células endoteliais, fibroblastos, entre outros<sup>89</sup>. É conhecida pelo papel pró-inflamatório e proliferativo mediado pela ligação ao receptor CXCR3<sup>90</sup>. A expressão dessa quimiocina em células tumorais de mama foi associada com a proliferação celular, regulação da ação angiostática, progressão tumoral e metástase por meio do *cross-talk* com diversas vias de sinalização intracelular, tais como PI3K e NF-κB<sup>91, 92</sup>. Além disso, a expressão de CXCL10 está relacionada ao tamanho tumoral, podendo ser regulada por estrógeno, com indução associada a um pior prognóstico e à resistência ao tamoxifeno<sup>88</sup>.

Outro gene da sinalização de citocinas e quimiocinas, o FOXP3 é conhecido com um marcador de células imunes T regulatórias (*Tregs*)<sup>93</sup>. No entanto, esse gene tem sido recentemente relatado com um gene supressor tumoral no câncer de mama por estudos *in vitro* e *in vivo*<sup>94</sup>. Dessa forma, FOXP3 é um fator de transcrição que pode regular a expressão de diversos genes, exercendo uma função antitumoral e de inibição da metástase em tumores de mama<sup>95</sup>. No entanto, por se tratar de um grande regulador do sistema imune, a ativação de um processo depende dos genes *downstream* regulados. Um outro fator importante é a grande discrepância observada entre a expressão de mRNA e proteína de FOXP3, cuja modulação deste deve ocorrer em nível pós-transcricional<sup>96</sup>. Dessa forma, a indução desse gene em estádios II e IIIa deve ser vista considerando o papel transcricional regulatório desse gene.

Finalmente, diversos genes participando de outros processos foram identificados, incluindo adesão e migração, reparo do DNA, transição epitélio-mesênquima, desregulação transcricional e vias MAPK, NOTCH, PI3K, TGF-beta e WNT. Mais estudos são necessários para entender o papel da correção desses genes e do *cross-talk* entre as potenciais vias no contexto do câncer de mama inicial. De forma geral, embora as alterações mutacionais somáticas não evidenciem um padrão associado com o estadiamento em câncer de mama, os perfis de expressão gênica mostram agrupamentos específicos de genes com papel conhecido nesse tipo tumoral que podem atuar na caracterização e em uma compreensão mais aprofundada do carcinoma mamário em estágio precoce.

## 7 CONCLUSÕES

- O presente estudo avaliou o perfil mutacional somático de 82 mulheres com câncer de mama utilizando a plataforma *Illumina HiSeq 2500™ System* para o sequenciamento completo do exoma. Dentre as alterações encontradas nos diversos genes *drivers* e *passengers*, dois genes *drivers* se destacaram: PIK3CA e TP53 (44 e 33% respectivamente).

- Com o uso do painel gênico da tecnologia *NanoString® Technologies* para avaliação do perfil de expressão gênica foi possível identificar dois grupos de genes associados ao estadiamento clínico. Um grupo de 29 genes apresentaram-se reprimidos em parte das pacientes do estadiamento II e na maioria do estadiamento IIIa; e outro grupo de 20 genes apresentaram-se induzidos em parte dos estadiamentos II e em IIIa.

- Por ser um painel de genes específicos no câncer de mama, os perfis de expressão gênica encontrados podem atuar numa caracterização para estadios precoces da doença, já que os casos com grupos associados aos estadiamentos I e II apresentaram-se mais próximos que os do IIIa. Mesmo o número de pacientes com estadiamento IIIa (n=9) sendo baixo, este apresenta uma assinatura de expressão gênica que permitiu a separação das pacientes com estadiamento II, indicando a possibilidade de potencial invasivo.

- Contudo, o número de genes (776) avaliados no perfil mutacional e de expressão gênica e o nosso número amostral (n=82), limitou o número de genes com alta frequência mutacional.

- Estudos associando alterações genéticas do perfil mutacional e/ou perfil de expressão gênica com os estadiamentos clínicos são escassos. Portanto, se faz necessário mais estudos na área, já que essas alterações possuem um grande impacto na conduta clínica.

## REFERÊNCIAS

1. Michailidou K, Hall P, Gonzalez-Neira A, Ghoussaini M, Dennis J, Milne RL, et al. *Large-scale genotyping identifies 41 new loci associated with breast cancer risk*. . **Nature genetics**. 2013; 45(4), 353–361e3612.
2. Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer*. **Cell**. 2000;100(1), 57–70.
3. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**. 2011;144(5):646-74.
4. *Câncer Today*. [Internet] Lyon, France: IARC; 2020 [cited 2020 jan 10];Available from: <http://gco.iarc.fr/today/home>.
5. *Estimativa 2020*. [Internet] Rio de Janeiro INCA – Instituto Nacional de Câncer; 2020 [cited 2020 jan 10];Available from: <http://inca.gov.br/estimativa>.
6. Jia D, Chen C, Chen C, Chen F, Zhang N, Yan Z, et al. *Breast Cancer Case Identification Based on Deep Learning and Bioinformatics Analysis*. **Frontiers in genetics**. 2021;12, 628136.
7. Kerlikowske K. *Screening mammography in women less than age 50 years*. . **Current opinion in obstetrics & gynecology**. 2012;24(1), 38–43.
8. Gennaro G, Hill ML, Bezzon E, Caumo F. *Quantitative Breast Density in Contrast-Enhanced Mammography*. . **Journal of clinical medicine**. 2021;10(15), 3309.
9. Coughlin SS. *Epidemiology of Breast Cancer in Women*. **Advances in experimental medicine and biology**. 2019;1152, 9–29.
10. *Tipos de Câncer - Câncer de Mama*. [Internet]: INCA - Instituto Nacional de Câncer; 2021 [cited 18 jul 2021];Available from: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>.
11. Siziopikou KP. *Ductal carcinoma in situ of the breast: current concepts and future directions*. **Archives of pathology & laboratory medicine**. 2013;137(4), 462–466.
12. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. *Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers*. **Cancer biology & therapy**. 2010;10(10), 955–960.
13. Li CI, Uribe DJ, Daling JR. *Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer*. . **British journal of cancer**. 2005;93(9), 1046–1052.
14. Anderson WF, Rosenberg PS, Prat A, Perou CM, Sherman ME. *How many etiological subtypes of breast cancer: two, three, four, or more?* **Journal of the National Cancer Institute**. 2014;106(8), dju165.

15. Hortobagyi GN, Edge SB, Giuliano A. *New and Important Changes in the TNM Staging System for Breast Cancer*. **American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology** 2018;Annual Meeting, 38, 457–467.
16. Zubair M, Wang S, Ali N. *Advanced Approaches to Breast Cancer Classification and Diagnosis*. . **Frontiers in pharmacology**. 2021;11, 632079.
17. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. *Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade*. **Breast cancer research : BCR**. 2010;12(4), 207.
18. *American Cancer Society - Cancer Staging*. [Internet] 2020 [cited 2020 Oct 10];Available from: <https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/staging.html>.
19. *TNM Classification of Malignant Tumors - The Union for International Cancer Control (UICC)*. [Internet] [cited 2021 mar 05];Available from: <https://www.uicc.org/>.
20. Cserni G, Chmielik E, Cserni B, Tot T. *The new TNM-based staging of breast cancer*. **Virchows Archiv** 2018;472(5):697-703.
21. *AJCC - American Joint Committee on Cancer*. [Internet] 2020 [cited 2020 Oct 10];Available from: <https://cancerstaging.org/Pages/default.aspx>.
22. Filho GB. *Bogliolo - Patologia*. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**; 2011.
23. Frasson A, et al. *Doenças da Mama: Guia prático baseado em evidências*. . **São Paulo: Editora Atheneu**; 2011.
24. Kronenwett U, Ploner A, Zetterberg A, al e. *Genomic Instability and Prognosis in Breast Carcinomas*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2006;15(9):1630–1635.
25. Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, al. e. *Cytogenetic Alterations and Cytokeratin Expression Patterns in Breast Cancer: Integrating a New Model of Breast Differentiation into Cytogenetic Pathways of Breast Carcinogenesis*. **Lab Invest**. 2002;82, 1525–1533.
26. Ruibal A, Aguiar P, Del Río MC, Padín-Iruegas ME, Arias JI, Herranz M. *CA15. 3 Serum Concentrations in Older Women with Infiltrating Ductal Carcinomas of the Breast*. **International journal of molecular sciences**. 2014;15(11):19870-6.
27. Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, Molina R, Nicolini A, Senkus E, et al. *Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM)*. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**. 2017;75, 284–298.
28. *American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer*. **Journal of oncology practice**. 2007;3(6), 336–339.

29. Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer*. **New England Journal of Medicine**. 2004;351(27):2817-26.
30. Retèl VP, Bueno-de-Mesquita JM, Hummel MJM, van de Vijver MJ, Douma KFL, Karsenberg K, et al. *Constructive Technology Assessment (CTA) as a tool in coverage with evidence development: the case of the 70-gene prognosis signature for breast cancer diagnostics*. **International journal of technology assessment in health care**. 2009;25(1):73-83.
31. Tsai ML, Lillemoe TJ, Finkelstein MJ, Money JE, Susnik B, Grimm E, et al. *Utility of Oncotype DX risk assessment in patients with invasive lobular carcinoma*. **Clinical breast cancer**. 2016;16(1):45-50.
32. Knauer M, Filipits M, Dubsy P. *Late recurrences in early breast cancer: for whom and how long is endocrine therapy beneficial?* **Breast Care**. 2014;9(2):97-.
33. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. *Molecular portraits of human breast tumours*. **Nature**. 2000;406(6797), 747–752.
34. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. . **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2001;98(19):10869-74.
35. CancerGenomeAtlasNetwork. *Comprehensive molecular portraits of human breast tumours*. **Nature**. 2012;490(7418):61-70.
36. Boyault S, Drouet Y, Navarro C, Bachelot T, Lasset C, et al. *Mutational characterization of individual breast tumors: TP53 and PI3K pathway genes are frequently and distinctively mutated in different subtypes*. **Breast Cancer Res Treat**. 2011;132(1):29-39.
37. Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, et al. *The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers*. . **Nature**. 2012;486(7403), 395–399.
38. Veeraraghavan J, De Angelis C, Reis-Filho JS, Pascual T, Prat A, Rimawi MF, et al. *De-escalation of treatment in HER2-positive breast cancer: Determinants of response and mechanisms of resistance*. **Breast**. 2017;34 Suppl 1(Suppl 1), S19–S26.
39. Li X. *Dynamic changes of driver genes' mutations across clinical stages in nine cancer types*. . **Cancer Med**. 2016;(7):1556-65. .
40. Xing Z, Wang X, Liu J, Zhang M, Feng K, Wang X. *Expression and prognostic value of CDK1, CCNA2, and CCNB1 gene clusters in human breast cancer*. **J Int Med Res**. 2021;49(4):300060520980647.

41. Zhang W, Wang SL. *A Novel Method for Identifying the Potential Cancer Driver Genes Based on Molecular Data Integration*. **Biochem Genet**. 2020;58(1):16-39.
42. Pi C, Xu CR, Zhang MF, Peng XX, Wei XW, Gao X, et al. *EGFR mutations in early-stage and advanced-stage lung adenocarcinoma: Analysis based on large-scale data from China*. **Thorac Cancer**. 2018;9(7):814-819.
43. Galvez C, Jacob S, Finkelman BS, Zhao J, Tegtmeyer K, Chae YK, et al. *The role of EGFR mutations in predicting recurrence in early and locally advanced lung adenocarcinoma following definitive therapy*. **Oncotarget**. 2020;11: 1953-1960.
44. Neuber AC, Tostes CH, Ribeiro AG, Marczyński GT, Komoto TT, Rogeri CD, et al. *The biobank of barretos cancer hospital: 14 years of experience in cancer research*. **Cell and tissue banking**. 2021.
45. Illumina. *Introduction to NGS*. [Internet] 2021 [cited 2021 mar 02]; Available from: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html>.
46. Markowitz J, Abrams Z, Jacob NK, Zhang X, Hassani JN, Latchana N, et al. *MicroRNA profiling of patient plasma for clinical trials using bioinformatics and biostatistical approaches*. **OncoTargets Ther**. 2016;9: 5931–41.
47. *Bioconductor - Home*. [Internet] [cited 2020 jun 04]; Available from: <https://bioconductor.org/>
48. Li A, Keck JM, Parmar S, Patterson J, Labrie M, Creason A, et al. *Characterizing advanced breast cancer heterogeneity and treatment resistance through serial biopsies and comprehensive analytics*. **NPJ precision oncology**. 2021;5(1):28.
49. Rakha EA, Pareja FG. *New Advances in Molecular Breast Cancer Pathology*. **Semin Cancer Biol**. 2021;72:102-13.
50. Gouri A, Benarba B, Dekaken A, Aoures H, Benharkat S. *Prediction of Late Recurrence and Distant Metastasis in Early-stage Breast Cancer: Overview of Current and Emerging Biomarkers*. **Curr Drug Targets**. 2020;21(10):1008-25.
51. Markopoulos C, Hyams DM, Gomez HL, Harries M, Nakamura S, Traina T, et al. *Multigene assays in early breast cancer: Insights from recent phase 3 studies*. **Eur J Surg Oncol**. 2020;46(4 Pt A):656-66.
52. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. *The cancer genome*. **Nature**. 2009;458(7239):719-24.
53. Kumar S, Warrell J, Li S, McGillivray PD, Meyerson W, Salichos L, et al. *Passenger Mutations in More Than 2,500 Cancer Genomes: Overall Molecular Functional Impact and Consequences*. **Cell**. 2020;180(5):915-27.e16.

54. Iranzo J, Martincorena I, Koonin EV. *Cancer-mutation network and the number and specificity of driver mutations*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2018;115(26):E6010-e9.
55. Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium. ICGC/TCGA. *Pan-cancer analysis of whole genomes*. **Nature**. 2020;578(7793):82-93.
56. Szczurek E, Beerenwinkel N. *Modeling mutual exclusivity of cancer mutations*. **PLoS Comput Biol**. 2014;10(3):e1003503.
57. Zhang H, Deng Y, Zhang Y, Ping Y, Zhao H, Pang L, et al. *Cooperative genomic alteration network reveals molecular classification across 12 major cancer types*. **Nucleic Acids Res**. 2017;45(2):567-82.
58. Ligresti G, Militello L, Steelman LS, Cavallaro A, Basile F, Nicoletti F, et al. *PIK3CA mutations in human solid tumors: role in sensitivity to various therapeutic approaches*. **Cell Cycle**. 2009;8(9):1352-8.
59. Liu S, Knapp S, Ahmed AA. *The structural basis of PI3K cancer mutations: from mechanism to therapy*. **Cancer Res**. 2014;74(3):641-6.
60. Martínez-Sáez O, Chic N, Pascual T, Adamo B, Vidal M, González-Farré B, et al. *Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer*. **Breast Cancer Res**. 2020;22(1):45.
61. Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, Ramakrishna M, Glodzik D, Zou X, et al. *Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences*. **Nature**. 2016;534(7605):47-54.
62. Tikoo A, Roh V, Montgomery KG, Ivetac I, Waring P, Pelzer R, et al. *Physiological levels of Pik3ca(H1047R) mutation in the mouse mammary gland results in ductal hyperplasia and formation of ER $\alpha$ -positive tumors*. **PLoS One**. 2012;7(5):e36924.
63. Hortobagyi GN, Chen D, Piccart M, Rugo HS, Burris HA, Pritchard KI, et al. *Correlative Analysis of Genetic Alterations and Everolimus Benefit in Hormone Receptor-Positive, Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative Advanced Breast Cancer: Results From BOLERO-2*. **J Clin Oncol**. 2016;34(5):419-26.
64. Chen L, Yang L, Yao L, Kuang XY, Zuo WJ, Li S, et al. *Characterization of PIK3CA and PIK3R1 somatic mutations in Chinese breast cancer patients*. **Nat Commun**. 2018;9(1):1357.
65. Miron A, Varadi M, Carrasco D, Li H, Luongo L, Kim HJ, et al. *PIK3CA mutations in in situ and invasive breast carcinomas*. **Cancer Res**. 2010;70(14):5674-8.
66. Shiovitz S, Korde LA. *Genetics of breast cancer: a topic in evolution*. **Ann Oncol**. 2015;26(7):1291-9.



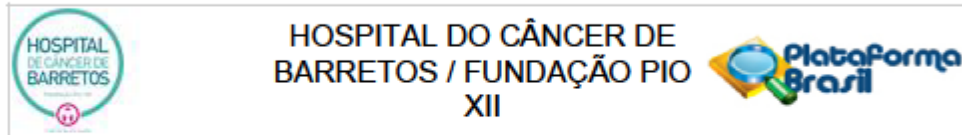
67. Souza AM, Resende SS, Sousa TN, Brito CFA. *A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population*. **Genetics and Molecular Biology**. 2019;42, 495–508.
68. Chlebowski RT, Chen Z, Anderson GL, Rohan T, Aragaki A, Lane D, et al. *Ethnicity and breast cancer: factors influencing differences in incidence and outcome*. **J Natl Cancer Inst**. 2005;97(6):439-48.
69. Loi S, Haibe-Kains B, Majjaj S, Lallemand F, Durbecq V, Larsimont D, et al. *PIK3CA mutations associated with gene signature of low mTORC1 signaling and better outcomes in estrogen receptor-positive breast cancer*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2010;107(22):10208-13.
70. Kasthuber ER, Lowe SW. *Putting p53 in Context*. **Cell**. 2017;170(6):1062-78.
71. Li X, Chen X, Wen L, Wang Y, Chen B, Xue Y, et al. *Impact of TP53 mutations in breast cancer: Clinicopathological features and prognosis* *Impact of TP53 mutations in breast CA*. **Thorac Cancer**. 2020;11(7):1861-8.
72. Olivier M, Langerød A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, et al. *The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer*. **Clin Cancer Res**. 2006;12(4):1157-67.
73. Huszno J, Grzybowska E. *TP53 mutations and SNPs as prognostic and predictive factors in patients with breast cancer*. **Oncol Lett**. 2018;16(1):34-40.
74. Lefebvre C, Bachelot T, Filleron T, Pedrero M, Campone M, Soria JC, et al. *Mutational Profile of Metastatic Breast Cancers: A Retrospective Analysis*. **PLoS Med**. 2016;13(12):e1002201.
75. Pereira B, Chin SF, Rueda OM, Vollan HK, Provenzano E, Bardwell HA, et al. *The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes*. **Nat Commun**. 2016;7:11479.
76. Zhang M, Lee AV, Rosen JM. *The Cellular Origin and Evolution of Breast Cancer*. **Cold Spring Harb Perspect Med**. 2017;7(3).
77. Liu H, Murphy CJ, Karreth FA, Emdal KB, White FM, Elemento O, et al. *Identifying and Targeting Sporadic Oncogenic Genetic Aberrations in Mouse Models of Triple-Negative Breast Cancer*. **Cancer Discov**. 2018;8(3):354-69.
78. Turashvili G, Brogi E. *Tumor Heterogeneity in Breast Cancer*. **Front Med (Lausanne)**. 2017;4:227.
79. Sborgi L, Barrera-Vilarmau S, Obregon P, de Alba E. *Characterization of a Novel Interaction between Bcl-2 Members Diva and Harakiri*. **PloS one**. 2010;5:e15575.
80. Zinkel S, Gross A, Yang E. *BCL2 family in DNA damage and cell cycle control*. **Cell Death Differ**. 2006;13(8):1351-9.

81. Subhawong AP, Nassar H, Halushka MK, Illei PB, Vang R, Argani P. *Heterogeneity of Bcl-2 expression in metastatic breast carcinoma*. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.** 2010;23(8):1089-96.
82. Joensuu H, Pylkkänen L, Toikkanen S. *Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer*. **Am J Pathol.** 1994;145(5):1191-8.
83. Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, et al. *The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients*. **J Natl Cancer Inst.** 1994;86(7):499-504.
84. Huang X, Gollin SM, Raja S, Godfrey TE. *High-resolution mapping of the 11q13 amplicon and identification of a gene, TAOS1, that is amplified and overexpressed in oral cancer cells*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2002;99(17):11369-74.
85. Duarte BDP, Bonatto D. *The heat shock protein 47 as a potential biomarker and a therapeutic agent in cancer research*. **J Cancer Res Clin Oncol.** 2018;144(12):2319-28.
86. Zhu J, Xiong G, Fu H, Evers BM, Zhou BP, Xu R. *Chaperone Hsp47 Drives Malignant Growth and Invasion by Modulating an ECM Gene Network*. **Cancer Res.** 2015;75(8):1580-91.
87. Xiong G, Chen J, Zhang G, Wang S, Kawasaki K, Zhu J, et al. *Hsp47 promotes cancer metastasis by enhancing collagen-dependent cancer cell-platelet interaction*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2020;117(7):3748-58.
88. Wu X, Sun A, Yu W, Hong C, Liu Z. *CXCL10 mediates breast cancer tamoxifen resistance and promotes estrogen-dependent and independent proliferation*. **Molecular and cellular endocrinology.** 2020;512:110866.
89. Lo BK, Yu M, Zloty D, Cowan B, Shapiro J, McElwee KJ. *CXCR3/ligands are significantly involved in the tumorigenesis of basal cell carcinomas*. **Am J Pathol.** 2010;176(5):2435-46.
90. Dai S, Liu F, Qin Z, Zhang J, Chen J, Ding WX, et al. *Kupffer cells promote T-cell hepatitis by producing CXCL10 and limiting liver sinusoidal endothelial cell permeability*. **Theranostics.** 2020;10(16):7163-77.
91. Liu M, Guo S, Stiles JK. *The emerging role of CXCL10 in cancer (Review)*. **Oncol Lett.** 2011;2(4):583-9.
92. Jin WJ, Kim B, Kim D, Park Choo H-Y, Kim H-H, Ha H, et al. *NF- $\kappa$ B signaling regulates cell-autonomous regulation of CXCL10 in breast cancer 4T1 cells*. **Experimental & molecular medicine.** 2017;49(2):e295.
93. Qiu R, Zhou L, Ma Y, Zhou L, Liang T, Shi L, et al. *Regulatory T Cell Plasticity and Stability and Autoimmune Diseases*. **Clin Rev Allergy Immunol.** 2020;58(1):52-70.

94. Jia H, Qi H, Gong Z, Yang S, Ren J, Liu Y, et al. *The expression of FOXP3 and its role in human cancers*. **Biochim Biophys Acta Rev Cancer**. 2019;1871(1):170-8.
95. Liu C, Han J, Li X, Huang T, Gao Y, Wang B, et al. *FOXP3 Inhibits the Metastasis of Breast Cancer by Downregulating the Expression of MTA1*. **Front Oncol**. 2021;11:656190.
96. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, Malventano C, Triulzi T, Mènard S, et al. *FOXP3 expression and overall survival in breast cancer*. **J Clin Oncol**. 2009;27(11):1746-52.

## ANEXOS

## Anexo A - Carta de aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Perfil molecular do câncer de mama seguido de mamografia

**Pesquisador:** Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

**Versão:** 1

**CAAE:** 59248016.0.0000.5437

**Instituição Proponente:** Fundação Pio XII

**Patrocinador Principal:** Fundação Pio XII

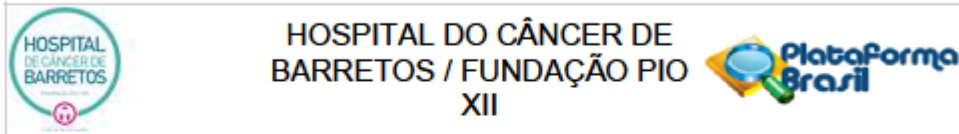
#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.739.743

#### Apresentação do Projeto:

**Resumo:** As neoplasias de mama são as principais causa de mortalidade por câncer entre mulheres. Sabe-se que quando detectado precocemente maiores são as chances de cura. Atualmente a mamografia é a ferramenta padrão para o rastreamento e detecção precoce do câncer de mama. No entanto além do desconforto que o exame ocasiona para a mulher, muitos resultados falsos negativos ainda são associados a este exame principalmente para os casos de estágio inicial da doença em mulheres jovens que apresentam um tecido mamário muito denso dificultando a visualização do tumor. Desta maneira biomarcadores minimamente invasivos que consigam identificar tumores de mama com alta acurácia, sensibilidade e especificidade são urgentemente necessários na detecção precoce do câncer de mama, com utilidade no diagnóstico atrelado ou não ao exame de mamografia. Considerando que o desenvolvimento e progressão é caracterizado tanto por alterações genéticas como epigenéticas e que a carga cumulativa destas alterações ainda não estão bem compreendidas este projeto prevê a determinação de assinaturas moleculares para este tipo de neoplasia por meio da avaliação de alterações em genes associados ao câncer e de miRNAs. Uma vez que tanto o DNA quanto os miRNAs representam uma promessa como nova classe de biomarcadores minimamente invasivos superando aqueles baseados em expressão genica pela sua estabilidade em diferentes fluidos corpóreos como plasma, nossa hipótese é que

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcanerbarretos.com.br



## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII

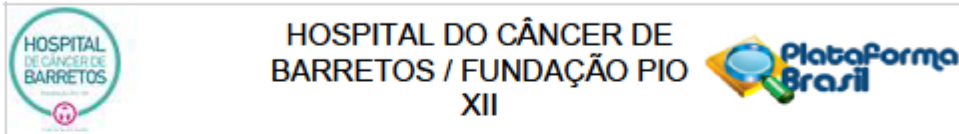
Continuação do Parecer: 1.739.743

existem pacientes com câncer de mama em estádios precoce apresentam tanto um padrão mutacional em determinados genes quanto de expressão de miRNAs específicos. Tais perfis estariam associados a estágios iniciais da doença e uma vez identificados poderão servir como biomarcadores minimamente invasivos bem como uma ferramenta adicional aos exames de mamografia na detecção precoce do câncer de mama. Considerando o exposto acima, nosso objetivo principal é identificar o perfil molecular das amostras tumorais e identificar alterações associadas a este tipo de tumor tanto em estágios iniciais como em estágios mais avançados e correlacionar estes perfis com os dados de mamografia e características clínicas dos pacientes. Além disso, pretendemos validar o perfil mutacional e de microRNAs em biopsia líquida dos pacientes. Os resultados deste projeto serão úteis para um melhor entendimento das bases genético moleculares do processo de início do câncer de mama bem como identificar novos biomarcadores minimamente invasivos de prevenção e rastreamento desta doença.

**Introdução:** Segundo tipo mais frequente no mundo, o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres, respondendo por 22% dos casos novos a cada ano. No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (1) o número de casos novos de câncer de mama esperados em 2016 será de 57.960 com um risco estimado de 57,96 casos a cada 100 mil mulheres sendo que, tanto para região Sul e Sudeste, ocorreu maior incidência entre as mulheres com um risco estimado de 71,19 casos novos por 100 mil. Os fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer de mama são muitos como: idade, fatores endócrinos/história reprodutiva, fatores comportamentais/ambientais e fatores genéticos/hereditários (2). A maioria dos casos de câncer de mama são esporádicos e apenas cerca de 15% apresenta algum tipo de relação familiar sendo que 5% exibem um padrão claro hereditário (3). O câncer de mama se desenvolve a partir de alterações genético-moleculares nas células do tecido mamário não sendo considerado como uma única doença, dado ao seu alto padrão de heterogeneidade clínica e molecular (4,5). Do ponto de vista molecular as neoplasias da mama podem ser classificadas em seis subtipos: tumores basais (basal like ou triplo negativo; luminal A, luminal B; Her2 superexpresso (Her2 overexpress), e o tipo normal-like, sendo mais recentemente descrito o claudin-low, sendo os dois últimos ainda alvo de intensa discussão (6). Quando diagnosticado em estágios precoce (lesões menores de 2cm) apresenta um prognóstico mais favorável e elevada taxa de cura. A detecção precoce por meio de biomarcadores moleculares e exames mamográficos podem cada vez auxiliar na identificação de lesões não malignas como o carcinoma in situ e as hiperplasias. Estas lesões são consideradas também fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama invasor (7). Desta forma

o

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br

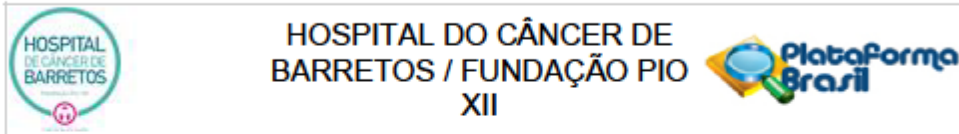


## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII

Continuação do Parecer: 1.739.743

diagnóstico precoce é a principal estratégia para aumentar a chance de cura pois tem como finalidade a identificação de lesões sugestivas de câncer. Nos dias de hoje a mamografia é o exame padrão para o rastreamento do câncer de mama, no entanto a sua sensibilidade é alta apenas em mulheres acima dos 50 anos. Nas mulheres mais jovens a sensibilidade é menor particularmente quando os exames são realizados anualmente ou quando se tem história familiar, que possivelmente acarreta em um crescimento muito rápido do tumor (8). Embora a mamografia seja uma ferramenta extremamente útil para a detecção precoce e consequentemente a redução das taxas de mortes por câncer de mama, este ainda não é um método definitivo para a detecção precoce desta neoplasia devido a sua limitada sensibilidade e especificidade (9). Nos últimos anos as pesquisas tem mudado o foco de biomarcadores apartir do RNA mensageiro (RNAm) para microRNAs (miRNAs) ou DNA circulante (DNAc) uma vez que são moléculas mais estáveis (podendo ser obtida a partir de diferentes tipos de amostras) e eficientes biomarcadores para o câncer de mama. Muitos estudos, inclusive alguns do nosso grupo (10,11), tem demonstrado que existe um padrão de expressão alterado de miRNAs tanto no tecido quanto no plasma e soro de pacientes com câncer de mama (12–14). Além disso muitos estudos tem mostrado miRNAs que apresentam um padrão de expressão alterado durante a progressão do câncer, indicando que eles podem servir como biomarcadores minimamente invasivos e ferramentas de rastreamento de maior custo beneficio podendo servir como uma nova ferramenta a ser utilizada conjuntamente com a mamografia para o diagnostico mais acurado do câncer de mama (10,15,16). Marcadores séricos como o CA-15-3 ou CEA são utilizados para monitorar a resposta a terapia em pacientes com câncer de mama. Porém apresentam baixa especificidade uma vez que podem apresentar níveis alterados em indivíduos com outras patologias que não o câncer e sua sensibilidade é boa apenas para os casos mais avançados da doença (17). Desta maneira a busca por marcadores moleculares minimamente invasivos e de alta sensibilidade e especificidade é fundamental. Neste panorama as análises moleculares em larga escala (nCounter, microarrays e sequenciamento de nova geração) estão contribuindo muito para a identificação de genes relacionados ao início e progressão do câncer de mama. O conhecimento do transcriptoma e de como os genes podem ser regulados é um ponto critico para a identificação de bons biomarcadores de predição e risco para o aparecimento de doenças como o câncer. Muitos trabalhos vem sendo realizado afim de se determinar qual das tecnologias atuais de screening é a ferramenta mais acurada para determinação de biomarcadores de diagnostico, prognostico ou resposta ao tratamento (18,19). Atualmente dois ensaios baseados em análises de expressão genica em larga escala por microarrays estão disponíveis comercialmente para determinação do risco de metástase em

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



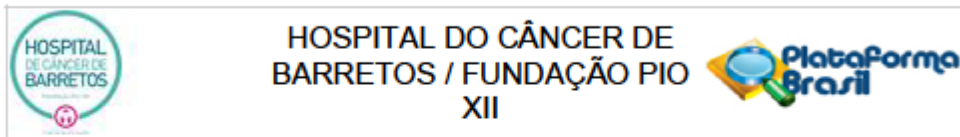
## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII

Continuação do Parecer: 1.739.743

pacientes com câncer de mama em estadiamento clínico II , o ONCOTYPE DX e o MammaPrint. O ONCOTYPE DX é um ensaio que avalia a expressão de 21 genes específicos dos quais 16 são relacionados ao câncer e que são atualmente muito utilizados tanto para determinação de prognóstico bem como identificar pacientes que não seria beneficiados com a terapia neoadjuvante (20,21). O MammaPrint por sua vez foi baseado no perfil de expressão genica de tumores de mama criopreservados também por microarrays. Neste ensaio é feita a avaliação da expressão de 70 genes candidatos a marcadores de risco para o desenvolvimento de metástase a distancia (22). Outros testes como PAM 50, PAM50 ROR, Breast Cancer Index, e EndoPredict tem sido bastante utilizados para prever o desenvolvimento de recorrência e seleção de pacientes direcionados a terapia hormonal (23). Além disso, o advento das novas tecnologias baseadas em sequenciamento de nova geração e genômica digital fornecem evidencias clinicas para o uso do DNA tumoral circulante como uma biopsia liquida para o diagnostico e monitoramento do cancer (24). Apesar dos esforços na busca de biomarcadores minimamente invasivos de detecção precoce para o câncer de mama, nenhum biomarcador ainda foi identificado com a acurácia e exatidão necessárias para tal classificação juntamente com o diagnostico por imagem por meio da mamografia. Sabidamente um biomarcador ideal deve ser altamente específico e sensível, com um elevado valor preditivo, o que pode ser detectado de uma forma rápida, simples, precisa e pouco dispendiosa (25). Dentro deste panorama estão os microRNAs (miRNAs), uma vez que vários estudos vem apontando estas moléculas como potenciais biomarcadores séricos de inicio e progressão do câncer de mama. Os miRNAs são pequenos RNAs (19 a 24 nucleotídeos) não codificadores de proteínas originados de RNAs precursores em grampo com cerca de 60 a 110 nucleotídeos envolvidos na regulação pós-transcricional de genes codificantes (26). Uma das principais vantagens do uso do miRNAs como biomarcadores circulantes a partir de amostras como sangue deve-se ao fato de serem muitos estáveis quando comparados com os RNA mensageiros (27,28). No entanto a origem e o valor preditivo destes miRNAs tem sido ainda pouco explorado. Nos últimos anos, estudos sobre a expressão de microRNAs, especialmente em larga escala, tem acrescentado uma revisão detalhada sobre como a expressão alterada de miRNAs está associada ao câncer de mama. Além disso, a possibilidade de detectar miRNAs circulantes no plasma de pacientes com câncer levantou a possibilidade de uso destas moléculas como novos biomarcadores de diagnóstico minimamente invasivos (29,30). Um estudo recente demonstrou que os níveis de expressão de miR-195 foi muito elevado em mulheres diagnosticadas com câncer de mama nos estádios I a IV do que em amostras de mulheres saudáveis da mesma faixa etária (31). Isto sugere que miRNAs circulantes podem ser detectados em estadios iniciais do câncer de mama

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br





## HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII

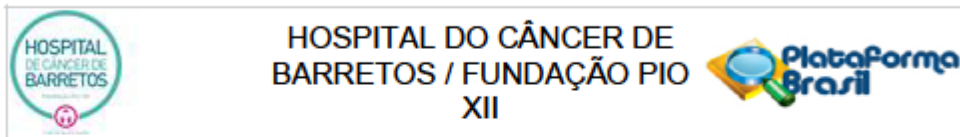
Continuação do Parecer: 1.739.743

(32). Wang e colaboradores também mostraram que miR-155 é superexpresso em amostras de tecido tumoral de mama e soro quando comparado com amostras normais (33). Além dos miRNAs, sabe-se que as células neoplásicas liberam DNA tumoral na circulação que abrigam mutações originadas no tumor original (34). Recentemente estudos tem mostrado que o screening de alterações genéticas em lesões precursoras de tumores usando DNA tumoral circulante foi altamente específico e sensível para o diagnóstico, prognóstico e resposta terapêutica das neoplasias (35–38). Considerando o exposto, acreditamos a identificação do perfil mutacional bem como dos em biopsia líquida de pacientes com câncer de mama em estádios mais iniciais seja uma oportunidade impar afim de melhorar o diagnóstico e prevenção do câncer de mama conciliando os achados moleculares com os resultados da mamografia baseado em imagens.

Hipótese: Considerando-se que: a) O câncer de mama ainda é um problema de saúde pública, apesar de todos os esforços do governo em tentar reduzir as taxas de incidência e mortalidade no país; b) A mamografia o exame utilizado na prevenção desta neoplasia no entanto é limitada como método isolado de rastreamento uma vez que a sensibilidade varia muito, pois depende de vários fatores tais como: tamanho e localização da lesão, densidade do tecido mamário, qualidade dos recursos técnicos e habilidade de interpretação do radiologista; c) Há espaço e necessidade para incorporação de testes moleculares para detecção precoce, tanto na esfera genética quanto epigenética. Faz-se necessário caracterizar o perfil de molecular do câncer de mama tanto em estádios mais iniciais do câncer de mama e sua associação como os dados de mamografia.

Metodologia Proposta: Tanto a extração de DNA quanto a de RNA será realizada de tecido tumoral de mama utilizando-se a plataforma automatizada QIASymphony com os Kits QIASymphony DNA mini Kit (Qiagen) e QIASymphony RNA mini Kit (Qiagen) respectivamente seguindo as instruções do fabricante. Somente amostras com excelente padrão de qualidade verificadas por Nanodrop e quantificados por Qubit® Fluorometric Quantitation (Life Technologies) serão utilizadas no sequenciamento de nova geração. O DNA das biópsias líquidas (plasma) será extraído com kit específico para extração de DNA circulante em amostras líquidas (QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit, Qiagen). Perfil Molecular Perfil mutacional – Exoma O perfil mutacional do genoma completo será realizado nas amostras classificadas como estágio I (n=20). Os resultados gerados pela investigação do genoma completo permitirão caracterizar o perfil mutacional das lesões iniciais de câncer de mama. O sequenciamento será realizado na plataforma Illumina HiSeq 2500™ System, pela empresa de biotecnologia Mendelics (São Paulo). Para a análise bioinformática, o serviço da

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.739.743

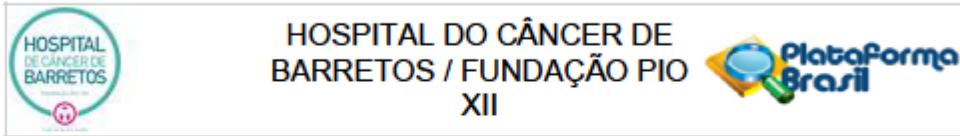
Mendelics irá fazer o pré-processamento dos dados (controle de qualidade e alinhamento) com genoma de referência hg19. Posteriormente, no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, será realizada a genotipagem e anotação das variantes encontradas, utilizando ferramentas de bioinformática GATK (do inglês, The Genome Analysis Toolkit) e bancos de dados de variantes tais como SNPeffect. Perfil mutacional – Painel\_OncoO perfil mutacional com o Painel\_Onco será realizado para as amostras de câncer de mama de estágios I (n=210), II (n=40) e III (n=40). Este painel engloba a investigação de alterações genéticas em 150 oncogenes e genes supressores tumorais, nomeadamente. Quando possível, será realizado o sequenciamento pareado de tecido tumoral e sangue periférico, para excluir as alterações germinativas e identificar as mutações somáticas presentes nas lesões. Nos casos que não existe amostra de sangue, iremos sequenciar somente tecido tumoral. Para a análise bioinformática, o serviço da Mendelics irá fazer o pré-processamento dos dados (controle de qualidade e alinhamento) com genoma de referência hg19. Posteriormente, no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, será realizada a genotipagem e anotação das variantes encontradas, utilizando ferramentas de bioinformática GATK (do inglês, The Genome Analysis Toolkit) e bancos de dados de variantes tais como SNPeffect. Perfil de expressão gênica e de miRNAsSerá realizado o perfil de expressão gênica e dos miRNAs para as amostras de câncer de mama de estágios I (n=10), II (n= 15) e III (n=15) utilizando os painéis nCounter® Elements, nCounter® PanCancer Pathways e o nCounter® miRNA Expression Assays (NanoString Technologies, Seattle, WA, EUA). Detecção de mutações somáticas e miRNAs em biópsia líquida por PCR digital. Após a identificação pelo exoma e pelo Painel\_Onco das mutações somáticas mais frequentes, sondas específicas serão construídas para detecção destas mutações somáticas nas amostras de DNA do plasma (biópsia líquida) dos pacientes da casuística em questão por meio da técnica de PCR Digital (dPCR) no QuantStudio™ 3D Digital PCR System.

**Critério de Inclusão:** Tratando-se desta uma amostra de conveniência, serão incluídos os pacientes com carcinoma de mama, com estadiamento inicial e avançado acompanhados no Hospital de Câncer de Barretos e que tenham disponibilidade de material parafinado e/ou tecido congelado do tumor bem como amostra do sangue do paciente

**Critério de Exclusão:** i. Amostras com material parafinado/congelado insuficiente para pesquisa. ii. Ausência da imagem da mamografia disponível.

**Metodologia de Análise de Dados:** Para a análise das sequências pareadas e identificação das

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.739.743

variações entre elas será utilizado o algoritmo VarScan, um método para detecção de variantes em dados de sequenciamento paralelo, o qual localiza variantes somáticas usando um método heurístico e teste estatístico baseado no número reads alinhados para cada alelo. As análises estatísticas serão realizadas com o programa R e o programa IBM SPSS Statistics® ambos para o sistema operacional Windows®. A correlação entre as frequências de alterações moleculares e as variáveis clínicas, histológicas, patológicas das pacientes será realizada com teste 2 ou teste exato de Fisher. O valor de significância adotado será de  $p < 0.05$ . Os heatmaps de expressão dos microRNAs serão gerados pelo programa R versão 3.2.1 (The R Foundation, Viena, Austria).

**Desfecho Primário:** Identificação de novos genes associados ao câncer de mama.

**Desfecho Secundário:** Implementação de nova ferramenta baseada em marcadores moleculares minimamente invasivos associados ao diagnóstico por imagem.

**Tamanho da Amostra no Brasil:** 100

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

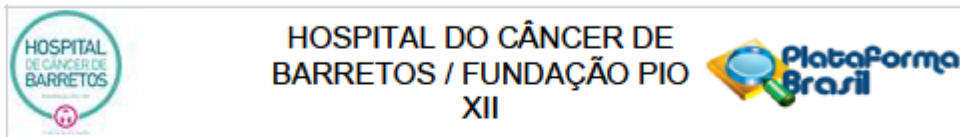
##### **GERAL**

Determinar o perfil mutacional, de expressão genica e microRNAs envolvidos com a carcinogênese humana e correlacionar com os dados de mamografia e as informações clinico-laboratoriais dos carcinomas mamários do Hospital de Câncer de Barretos.

##### **ESPECÍFICOS**

1. Realizar o perfil mutacional somático das amostras com câncer de mama em estágio inicial I (n=20) por exoma;
2. Realizar o perfil mutacional somático de 150 genes (Painel\_Onco) nas amostras de pacientes com câncer de mama em estágios II (n=40) e III (n=40);
3. Realizar o perfil de expressão gênica do painel PanCancer (770 genes) e de miRNAs (800 alvos) por NanoString em 100 casos de câncer de mama;
4. Levantamento sociodemográfico e clinicopatológico dos 100 casos a serem avaliados por meio da análise de prontuários;
5. Correlacionar os achados moleculares com os dados de imagem (mamografia) e os achados sociodemográficos e clinicopatológicos;

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.739.743

6. Detectar as mutações e microRNAs mais frequentes identificadas pelo Painel\_Onco e PCR arrays em biopsia líquida destes pacientes por PCR digital.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Trata-se de um estudo retrospectivo, que utilizará amostras biológicas coletadas previamente e estocadas no Departamento de Patologia ou Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos. O estudo também coletará informações clínicas e socio-demográficas dos prontuários médicos. Não envolve aconselhamento genético nem mudança de conduta clínica.

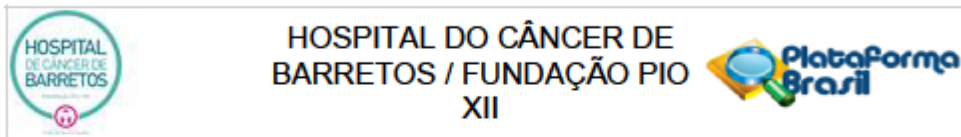
Como descrito no projeto e na PB, os principais riscos envolvidos são quebra accidental de sigilo e esgotamento da amostra biológica. No entanto, os pesquisadores se comprometem em minimizar e/ou evitar que isso aconteça.

Não há benefícios para os participantes do estudo.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

As neoplasias de mama são a principal causa de mortalidade por câncer entre mulheres. Sabe-se que quando detectado precocemente maiores são as chances de cura. Atualmente a mamografia é a ferramenta padrão para o rastreio e detecção precoce do câncer de mama. No entanto além do desconforto que o exame ocasiona para a mulher, muitos resultados falsos negativos ainda são associados a este exame principalmente para os casos de estágio inicial da doença em mulheres jovens que apresentam um tecido mamário muito denso dificultando a visualização do tumor. Desta maneira biomarcadores minimamente invasivos que consigam identificar tumores de mama com alta acurácia, sensibilidade e especificidade são urgentemente necessários na detecção precoce do câncer de mama, com utilidade no diagnóstico atrelado ou não ao exame de mamografia. Considerando que o desenvolvimento e progressão é caracterizado tanto por alterações genéticas como epigenéticas e que a carga cumulativa destas alterações ainda não estão bem compreendidas este projeto prevê a determinação de assinaturas moleculares para este tipo de neoplasia por meio da avaliação de alterações em genes associados ao câncer e de miRNAs. Uma vez que tanto o DNA quanto os miRNAs representam uma promessa como nova classe de biomarcadores minimamente invasivos superando aqueles baseados em expressão genica pela sua estabilidade em diferentes fluidos corpóreos como plasma, nossa hipótese é que

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.739.743

existem pacientes com câncer de mama em estádios precoce apresentam tanto um padrão mutacional em determinados genes quanto de expressão de miRNAs específicos. Tais perfis estariam associados a estágios iniciais da doença e uma vez identificados poderão servir como biomarcadores minimamente invasivos bem como uma ferramenta adicional aos exames de mamografia na detecção precoce do câncer de mama. Considerando o exposto acima, nosso objetivo principal é identificar o perfil molecular das amostras tumorais e identificar alterações associadas a este tipo de tumor tanto em estágios iniciais como em estágios mais avançados e correlacionar estes perfis com os dados de mamografia e características clínicas dos pacientes. Além disso, pretendemos validar o perfil mutacional e de microRNAs em biopsia líquida dos pacientes. Os resultados deste projeto serão úteis para um melhor entendimento das bases genéticas moleculares do processo de início do câncer de mama bem como identificar novos biomarcadores minimamente invasivos de prevenção e rastreamento desta doença.

Trata-se de um estudo de alta relevância, há embasamento científico, os objetivos estão claros e a metodologia de acordo com o proposto. É um estudo retrospectivo observacional. Os pesquisadores solicitam dispensa de TCLE e considerando-se as informações acima, o relator concorda com a dispensa.

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

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

**Recomendações:**

1. No documento Cadastro de Pesquisa, a data de início é 01/09/2016. Recomenda-se adequação.

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

Sem óbices éticos.

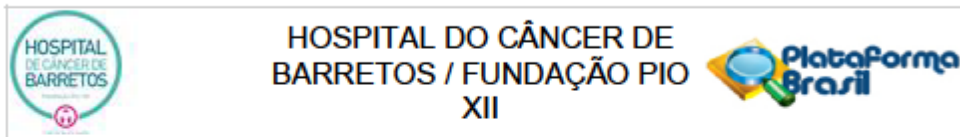
**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 22/03/2017.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de participantes deve ser temporariamente interrompida até a

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.739.743

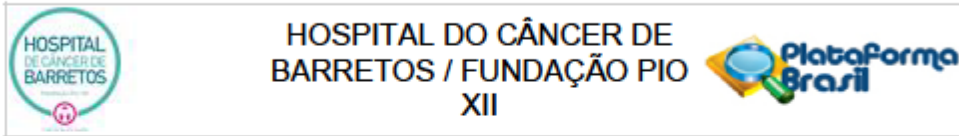
aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o BIOBANCO para início do processamento.
5. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
6. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 1212/2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_767077.pdf	29/08/2016 14:03:19		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_767077.pdf	29/08/2016 11:29:11		Aceito
Outros	dec_fonte_financiamento.pdf	29/08/2016 08:37:59	Larissa Cristina Ferreira	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_ROSTO.pdf	29/08/2016 08:02:23	Larissa Cristina Ferreira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_MAMA.docx	29/08/2016 07:33:42	Larissa Cristina Ferreira	Aceito
Outros	Mabin.pdf	19/08/2016 14:42:49	Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracaoderesponsabilidadedopesquisador.pdf	17/08/2016 17:49:10	Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracaodecienciaideestudo.pdf	17/08/2016 17:48:53	Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira	Aceito
Outros	CadastroprojetoNAP.pdf	17/08/2016 17:48:08	Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Relatoriobiobanco.pdf	17/08/2016 17:45:17	Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira	Aceito

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
 Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400  
 UF: SP Município: BARRETOS  
 Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 1.739.743

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BARRETOS, 22 de Setembro de 2016

---

**Assinado por:**  
**Daniel Onofre Vidal**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Antenor Duarte Vilela, 1331  
**Bairro:** Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400  
**UF:** SP **Município:** BARRETOS  
**Telefone:** (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br

**Anexo B** – Lista de genes do painel *Breast Cancer 360*<sup>®</sup> da NanoString Technologies.

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
ABCA8	NM_007168.2	<i>ATP 52inding cassette subfamily A member 8</i>
ACTR3B	NM_001040135.1	<i>ARP3 actin related protein 3 homolog B</i>
ACVR1B	NM_004302.4	<i>activin A receptor type 1B</i>
ACVR1C	NM_145259.2	<i>activin A receptor type 1C</i>
ACVRL1	NM_000020.1	<i>activin A receptor like type 1</i>
ADAM12	NM_003474.5	<i>ADAM metallopeptidase domain 12</i>
ADCY9	NM_001116.3	<i>adenylate cyclase 9</i>
ADD1	NM_001119.4	<i>adducin 1</i>
ADM	NM_001124.2	<i>adrenomedullin</i>
AGR2	NM_006408.3	<i>anterior gradient 2, protein disulphide isomerase family member</i>
AGT	NM_000029.3	<i>angiotensinogen</i>
AGTR1	NM_009585.3	<i>angiotensin II receptor type 1</i>
AKT3	NM_001206729.1	<i>AKT serine/threonine kinase 3</i>
ALDH1A1	NM_000689.4	<i>aldehyde dehydrogenase 1 family member A1</i>
ALDOA	NM_000034.3	<i>aldolase, fructose-bisphosphate A</i>
ANGPT1	NM_001199859.1	<i>angiopoietin 1</i>
ANLN	NM_018685.2	<i>anillin actin binding protein</i>
ANXA9	NM_003568.2	<i>annexin A9</i>
APH1B	NM_001145646.1	<i>aph-1 homolog B, gamma-secretase subunit</i>
APOD	NM_001647.3	<i>apolipoprotein D</i>
APOE	NM_000041.2	<i>apolipoprotein E</i>
AR	NM_000044.2	<i>androgen receptor</i>
AREG	NM_001657.3	<i>amphiregulin</i>
ARID1A	NM_006015.4	<i>AT-rich interaction domain 1A</i>
ARNT2	NM_014862.3	<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator 2</i>
ASPM	NM_018136.4	<i>abnormal spindle microtubule assembly</i>
ASPN	NM_017680.4	<i>asporin</i>
ATAD2	NM_014109.3	<i>ATPase family, AAA domain containing 2</i>
ATM	NM_000051.3	<i>ATM serine/threonine kinase</i>
ATP10B	NM_025153.2	<i>ATPase phospholipid transporting 10B (putative)</i>
AURKA	NM_003600.2	<i>aurora kinase A</i>
AURKB	NM_001256834.1	<i>aurora kinase B</i>
AXIN1	NM_181050.1	<i>axin 1</i>
AXIN2	NM_004655.3	<i>axin 2</i>
B3GNT3	NM_014256.3	<i>UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylglucosaminyltransferase 3</i>
BAD	NM_004322.3	<i>BCL2 associated agonist of cell death</i>
BAG1	NM_004323.3	<i>BCL2 associated athanogene 1</i>
BAIAP2L1	NM_018842.4	<i>BAI1 associated protein 2 like 1</i>
BAIAP3	NM_001286464.1	<i>BAI1 associated protein 3</i>

Continua na próxima página.



**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel Breast Cancer 360® da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
BAMBI	NM_012342.2	<i>BMP and activin membrane bound inhibitor</i>
BAX	NM_004324.3	<i>BCL2 associated X, apoptosis regulator</i>
BBC3	NM_014417.4	<i>BCL2 binding component 3</i>
BBOX1	NM_003986.2	<i>gamma-butyrobetaine hydroxylase 1</i>
BCAS1	NM_003657.3	<i>breast carcinoma amplified sequence 1</i>
BCL11A	NM_018014.3	<i>B-cell CLL/lymphoma 11A</i>
BCL2	NM_000633.2	<i>BCL2, apoptosis regulator</i>
BCL2A1	NM_004049.2	<i>BCL2 related protein A1</i>
BCL2L1	NM_001191.3	<i>BCL2 like 1</i>
BCL6B	NM_181844.3	<i>B-cell CLL/lymphoma 6B</i>
BDNF	NM_170734.3	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BIRC5	NM_001168.2	<i>baculoviral IAP repeat containing 5</i>
BLM	NM_000057.3	<i>Bloom syndrome RecQ like helicase</i>
BLVRA	NM_000712.3	<i>biliverdin reductase A</i>
BMP2	NM_001200.3	<i>bone morphogenetic protein 2</i>
BMP4	NM_001202.5	<i>bone morphogenetic protein 4</i>
BMP5	NM_021073.2	<i>bone morphogenetic protein 5</i>
BMP6	NM_001718.4	<i>bone morphogenetic protein 6</i>
BMP7	NM_001719.1	<i>bone morphogenetic protein 7</i>
BMP8A	NM_181809.3	<i>bone morphogenetic protein 8a</i>
BMPR1A	NM_004329.2	<i>bone morphogenetic protein receptor type 1A</i>
BMPR1B	NM_001203.2	<i>bone morphogenetic protein receptor type 1B</i>
BMPR2	NM_001204.6	<i>bone morphogenetic protein receptor type 2</i>
BNC2	NM_017637.5	<i>basonuclin 2</i>
BNIP3	NM_004052.3	<i>BCL2 interacting protein 3</i>
BORCS7	NM_001136200.1	<i>BLOC-1 related complex subunit 7</i>
BRCA1	NM_007294.3	<i>BRCA1, DNA repair associated</i>
BRCA2	NM_000059.3	<i>BRCA2, DNA repair associated</i>
BTG2	NM_006763.2	<i>BTG anti-proliferation factor 2</i>
C5orf38	NM_001294337.1	<i>chromosome 5 open reading frame 38</i>
CA12	NM_001218.3	<i>carbonic anhydrase 12</i>
CACNA1D	NM_000720.3	<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha1 D</i>
CACNA1H	NM_001005407.1	<i>calcium voltage-gated channel subunit alpha1 H</i>
CACNA2D1	NM_000722.2	<i>calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 1</i>
CACNA2D3	NM_018398.2	<i>calcium voltage-gated channel auxiliary subunit alpha2delta 3</i>
CACNG1	NM_000727.3	<i>calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 1</i>
CACNG4	NM_014405.2	<i>calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 4</i>
CACNG6	NM_031897.2	<i>calcium voltage-gated channel auxiliary subunit gamma 6</i>
CALML5	NM_017422.4	<i>calmodulin like 5</i>
CAMK2B	NM_001220.3	<i>calcium/calmodulin dependent protein kinase II beta</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel Breast Cancer 360® da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
CAV1	NM_001753.4	<i>caveolin 1</i>
CBLC	NM_001130852.1	<i>Cbl proto-oncogene C</i>
CCL2	NM_002982.3	<i>C-C motif chemokine ligand 2</i>
CCL21	NM_002989.2	<i>C-C motif chemokine ligand 21</i>
CCL3L1	NM_021006.5	<i>C-C motif chemokine ligand 3 like 1</i>
CCL4	NM_002984.2	<i>C-C motif chemokine ligand 4</i>
CCL5	NM_002985.2	<i>C-C motif chemokine ligand 5</i>
CCL7	NM_006273.3	<i>C-C motif chemokine ligand 7</i>
CCL8	NM_005623.2	<i>C-C motif chemokine ligand 8</i>
CCNA1	NM_001111045.1	<i>cyclin A1</i>
CCNA2	NM_001237.4	<i>cyclin A2</i>
CCNB1	NM_031966.2	<i>cyclin B1</i>
CCND1	NM_053056.2	<i>cyclin D1</i>
CCND2	NM_001759.2	<i>cyclin D2</i>
CCNE1	NM_001238.1	<i>cyclin E1</i>
CCNE2	NM_057749.2	<i>cyclin E2</i>
CCR1	NM_001295.2	<i>C-C motif chemokine receptor 1</i>
CCR2	NM_001123041.2	<i>C-C motif chemokine receptor 2</i>
CCR5	NM_000579.3	<i>C-C motif chemokine receptor 5 (gene/pseudogene)</i>
CD163	NM_203416.2	<i>CD163 molecule</i>
CD19	NM_001770.4	<i>CD19 molecule</i>
CD1E	NM_030893.3	<i>CD1e molecule</i>
CD24	NM_013230.2	<i>CD24 molecule</i>
CD27	NM_001242.4	<i>CD27 molecule</i>
CD274	NM_014143.3	<i>CD274 molecule</i>
CD276	NM_001024736.1	<i>CD276 molecule</i>
CD34	NM_001025109.1	<i>CD34 molecule</i>
CD36	NM_001001548.2	<i>CD36 molecule</i>
CD44	NM_001001392.1	<i>CD44 molecule (Indian blood group)</i>
CD68	NM_001251.2	<i>CD68 molecule</i>
CD84	NM_001184879.1	<i>CD84 molecule</i>
CD8A	NM_001768.6	<i>CD8a molecule</i>
CD8B	NM_172213.2	<i>CD8b molecule</i>
CDC14A	NM_001319210.1	<i>cell division cycle 14A</i>
CDC14B	NM_001077181.2	<i>cell division cycle 14B</i>
CDC20	NM_001255.1	<i>cell division cycle 20</i>
CDC25A	NM_001789.2	<i>cell division cycle 25A</i>
CDC25B	XR_937181.1	<i>cell division cycle 25B</i>
CDC25C	NM_001790.4	<i>cell division cycle 25C</i>
CDC6	NM_001254.3	<i>cell division cycle 6</i>
CDC7	NM_003503.3	<i>cell division cycle 7</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel *Breast Cancer 360*<sup>®</sup> da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
CDCA5	NM_080668.3	<i>cell division cycle associated 5</i>
CDCA7L	NM_001127370.2	<i>cell division cycle associated 7 like</i>
CDCA8	NM_018101.3	<i>cell division cycle associated 8</i>
CDH1	NM_004360.3	<i>cadherin 1</i>
CDH2	NM_001792.3	<i>cadherin 2</i>
CDH3	NM_001793.3	<i>cadherin 3</i>
CDH5	NM_001795.3	<i>cadherin 5</i>
CDK1	NM_001786.4	<i>cyclin dependent kinase 1</i>
CDK4	NM_000075.3	<i>cyclin dependent kinase 4</i>
CDK6	NM_001145306.1	<i>cyclin dependent kinase 6</i>
CDKN1A	NM_000389.2	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
CDKN1B	NM_004064.3	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1B</i>
CDKN1C	NM_000076.2	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 1C</i>
CDKN2A	NM_000077.4	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
CDKN2B	NM_004936.3	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2B</i>
CDKN2C	NM_078626.2	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2C</i>
CDKN2D	NM_001800.3	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 2D</i>
CDKN3	NM_005192.3	<i>cyclin dependent kinase inhibitor 3</i>
CEACAM5	NM_004363.4	<i>carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 5</i>
CEACAM6	NM_002483.6	<i>carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule 6</i>
CENPF	NM_016343.3	<i>centromere protein F</i>
CEP55	NM_018131.3	<i>centrosomal protein 55</i>
CETN2	NM_004344.1	<i>centrin 2</i>
CFD	NM_001317335.1	<i>complement factor D</i>
CHAD	NM_001267.2	<i>chondroadherin</i>
CHEK2	NM_001005735.1	<i>checkpoint kinase 2</i>
CHI3L1	NM_001276.2	<i>chitinase 3 like 1</i>
CHIT1	NM_003465.2	<i>chitinase 1</i>
CHRNA5	NM_000745.3	<i>cholinergic receptor nicotinic alpha 5 subunit</i>
CKB	NM_001823.4	<i>creatine kinase B</i>
CKMT1A	NM_001015001.1	<i>creatine kinase, mitochondrial 1A</i>
CKS1B	NM_001826.2	<i>CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B</i>
CLDN1	NM_021101.3	<i>claudin 1</i>
CLDN3	NM_001306.3	<i>claudin 3</i>
CLDN4	NM_001305.4	<i>claudin 4</i>
CLDN7	NM_001185022.1	<i>claudin 7</i>
CLEC14A	NM_175060.1	<i>C-type lectin domain containing 14A</i>
CLEC5A	NM_013252.2	<i>C-type lectin domain containing 5A</i>
CMKLR1	NM_004072.2	<i>chemerin chemokine-like receptor 1</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel *Breast Cancer 360*<sup>®</sup> da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
CNTFR	NM_147164.2	<i>ciliary neurotrophic factor receptor</i>
COL11A1	NM_001854.3	<i>collagen type XI alpha 1 chain</i>
COL27A1	NM_032888.3	<i>collagen type XXVII alpha 1 chain</i>
COL2A1	NM_001844.4	<i>collagen type II alpha 1 chain</i>
COL4A6	NM_001287758.1	<i>collagen type IV alpha 6 chain</i>
COL6A3	NM_004369.3	<i>collagen type VI alpha 3 chain</i>
COL7A1	NM_000094.3	<i>collagen type VII alpha 1 chain</i>
COL9A3	XM_011528545.1	<i>collagen type IX alpha 3 chain</i>
COLEC12	NM_130386.2	<i>collectin subfamily member 12</i>
COMP	NM_000095.2	<i>cartilage oligomeric matrix protein</i>
CPA3	NM_001870.2	<i>carboxypeptidase A3</i>
CREBBP	NM_001079846.1	<i>CREB binding protein</i>
CRYAB	NM_001885.2	<i>crystallin alpha B</i>
CSF3R	NM_000760.3	<i>colony stimulating factor 3 receptor</i>
CTSW	NM_001335.3	<i>cathepsin W</i>
CXADR	NM_001207063.1	<i>CXADR, Ig-like cell adhesion molecule</i>
CXCL10	NM_001565.3	<i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i>
CXCL12	NM_199168.3	<i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i>
CXCL13	NM_006419.2	<i>C-X-C motif chemokine ligand 13</i>
CXCL5	NM_002994.4	<i>C-X-C motif chemokine ligand 5</i>
CXCL8	NM_000584.3	<i>C-X-C motif chemokine ligand 8</i>
CXCL9	NM_002416.2	<i>C-X-C motif chemokine ligand 9</i>
CXCR6	NM_006564.1	<i>C-X-C motif chemokine receptor 6</i>
CXorf36	NM_024689.2	<i>chromosome X open reading frame 36</i>
CXXC5	NM_016463.5	<i>CXXC finger protein 5</i>
CYBB	NM_000397.3	<i>cytochrome b-245 beta chain</i>
CYP4F3	NM_000896.2	<i>cytochrome P450 family 4 subfamily F member 3</i>
DCN	NM_001920.3	<i>decorin</i>
DDB2	NM_000107.2	<i>damage specific DNA binding protein 2</i>
DDR2	NM_006182.2	<i>discoidin domain receptor tyrosine kinase 2</i>
DDX39A	NM_005804.3	<i>DExD-box helicase 39A</i>
DEPDC1	NM_001114120.2	<i>DEP domain containing 1</i>
DHRS2	NM_182908.4	<i>dehydrogenase/reductase 2</i>
DKK1	NM_012242.2	<i>dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 1</i>
DKK2	NM_014421.2	<i>dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 2</i>
DLGAP5	NM_014750.4	<i>DLG associated protein 5</i>
DLL1	NM_005618.3	<i>delta like canonical Notch ligand 1</i>
DLL3	NM_203486.2	<i>delta like canonical Notch ligand 3</i>
DLL4	NM_019074.2	<i>delta like canonical Notch ligand 4</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel Breast Cancer 360® da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
DNAJC12	NM_021800.2	<i>DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C12</i>
DPT	NM_001937.4	<i>dermatopontin</i>
DSC2	NM_024422.3	<i>desmocollin 2</i>
DTX1	NM_004416.2	<i>deltex E3 ubiquitin ligase 1</i>
DTX3	NM_178502.3	<i>deltex E3 ubiquitin ligase 3</i>
DTX4	NM_015177.1	<i>deltex E3 ubiquitin ligase 4</i>
DUSP4	NM_057158.3	<i>dual specificity phosphatase 4</i>
DUSP6	NM_022652.2	<i>dual specificity phosphatase 6</i>
E2F1	NM_005225.2	<i>E2F transcription factor 1</i>
E2F5	NM_001083588.1	<i>E2F transcription factor 5</i>
ECM2	NM_001197295.1	<i>extracellular matrix protein 2</i>
EDN1	NM_001955.2	<i>endothelin 1</i>
EDNRB	NM_000115.3	<i>endothelin receptor type B</i>
EFNA3	NM_004952.4	<i>ephrin A3</i>
EFNA5	NM_001962.2	<i>ephrin A5</i>
EGF	NM_001178130.2	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	NM_005228.3	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGLN2	NM_053046.3	<i>egl-9 family hypoxia inducible factor 2</i>
EGLN3	NM_001308103.1	<i>egl-9 family hypoxia inducible factor 3</i>
EIF2AK3	NM_001313915.1	<i>eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3</i>
EIF3B	NM_003751.3	<i>eukaryotic translation initiation factor 3 subunit B</i>
EIF4E2	NM_004846.3	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E family member 2</i>
EIF4EBP1	NM_004095.3	<i>eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1</i>
ELF3	NM_004433.4	<i>E74 like ETS transcription factor 3</i>
ELK3	NM_001303511.1	<i>ELK3, ETS transcription factor</i>
ELOVL2	NM_017770.3	<i>ELOVL fatty acid elongase 2</i>
EMCN	NM_001159694.1	<i>endomucin</i>
ENO1	NM_001428.3	<i>enolase 1</i>
ENPP2	NM_001040092.2	<i>ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2</i>
EP300	NM_001429.3	<i>E1A binding protein p300</i>
EPAS1	NM_001430.4	<i>endothelial PAS domain protein 1</i>
ERBB2	NM_004448.2	<i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
ERBB4	NM_001042599.1	<i>erb-b2 receptor tyrosine kinase 4</i>
ERCC1	NM_001983.3	<i>ERCC excision repair 1, endonuclease non-catalytic subunit</i>
EREG	NM_001432.2	<i>epiregulin</i>
ESPL1	NM_012291.4	<i>extra spindle pole bodies like 1, separase</i>
ESR1	NM_000125.2	<i>estrogen receptor 1</i>
ETV4	NM_001079675.1	<i>ETS variant 4</i>
ETV7	NM_001207035.1	<i>ETS variant 7</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel Breast Cancer 360® da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
EXO1	NM_006027.3	<i>exonuclease 1</i>
EYA1	NM_172059.2	<i>EYA transcriptional coactivator and phosphatase 1</i>
EYA2	NM_005244.4	<i>EYA transcriptional coactivator and phosphatase 2</i>
EYA4	NM_001301012.1	<i>EYA transcriptional coactivator and phosphatase 4</i>
F3	NM_001993.4	<i>coagulation factor III, tissue factor</i>
FAM124B	NM_001122779.1	<i>family with sequence similarity 124 member B</i>
FAM198B	NM_001031700.2	<i>family with sequence similarity 198 member B</i>
FAM214A	NM_019600.3	<i>family with sequence similarity 214 member A</i>
FAM83D	NM_030919.2	<i>family with sequence similarity 83 member D</i>
FANCF	NM_022725.2	<i>Fanconi anemia complementation group F</i>
FAP	NM_004460.2	<i>fibroblast activation protein alpha</i>
FBN1	NM_000138.3	<i>fibrillin 1</i>
FGF1	NM_033137.1	<i>fibroblast growth factor 1</i>
FGF10	NM_004465.1	<i>fibroblast growth factor 10</i>
FGF12	NM_004113.5	<i>fibroblast growth factor 12</i>
FGF13	NM_001139498.1	<i>fibroblast growth factor 13</i>
FGF18	NM_003862.2	<i>fibroblast growth factor 18</i>
FGF2	NM_002006.4	<i>fibroblast growth factor 2</i>
FGF7	NM_002009.3	<i>fibroblast growth factor 7</i>
FGF9	NM_002010.2	<i>fibroblast growth factor 9</i>
FGFR2	NR_073009.1	<i>fibroblast growth factor receptor 2</i>
FGFR3	NM_022965.2	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
FGFR4	NM_002011.3	<i>fibroblast growth factor receptor 4</i>
FGL2	NM_006682.2	<i>fibrinogen like 2</i>
FHL1	NM_001449.4	<i>four and a half LIM domains 1</i>
FLI1	NM_001167681.2	<i>Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor</i>
FLNC	NM_001458.4	<i>filamin C</i>
FLRT3	NM_013281.2	<i>fibronectin leucine rich transmembrane protein 3</i>
FLT3	NM_004119.2	<i>fms related tyrosine kinase 3</i>
FNBP1	NM_015033.2	<i>formin binding protein 1</i>
FOS	NM_005252.3	<i>Fos proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i>
FOSL1	NM_005438.3	<i>FOS like 1, AP-1 transcription factor subunit</i>
FOXA1	NM_004496.2	<i>forkhead box A1</i>
FOXC1	NM_001453.1	<i>forkhead box C1</i>
FOXC2	NM_005251.2	<i>forkhead box C2</i>
FOXM1	NM_202002.1	<i>forkhead box M1</i>
FOXP3	NM_014009.3	<i>forkhead box P3</i>
FREM2	NM_207361.5	<i>FRAS1 related extracellular matrix protein 2</i>
FST	NM_006350.2	<i>follistatin</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel Breast Cancer 360® da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
FSTL1	NM_007085.4	<i>follistatin like 1</i>
FSTL3	NM_005860.2	<i>follistatin like 3</i>
FUT3	NM_000149.3	<i>fucosyltransferase 3 (Lewis blood group)</i>
FXD3	NM_001136007.1	<i>FXD domain containing ion transport regulator 3</i>
FZD10	NM_007197.3	<i>frizzled class receptor 10</i>
FZD7	NM_003507.1	<i>frizzled class receptor 7</i>
FZD8	NM_031866.1	<i>frizzled class receptor 8</i>
FZD9	NM_003508.2	<i>frizzled class receptor 9</i>
GABRP	NM_001291985.1	<i>gamma-aminobutyric acid type A receptor pi subunit</i>
GADD45A	NM_001199741.1	<i>growth arrest and DNA damage inducible alpha</i>
GADD45B	NM_015675.3	<i>growth arrest and DNA damage inducible beta</i>
GADD45G	NM_006705.3	<i>growth arrest and DNA damage inducible gamma</i>
GAS1	NM_002048.2	<i>growth arrest specific 1</i>
GATA3	NM_001002295.1	<i>GATA binding protein 3</i>
GATA4	NM_002052.3	<i>GATA binding protein 4</i>
GDF15	NM_004864.2	<i>growth differentiation factor 15</i>
GDF5	NM_000557.4	<i>growth differentiation factor 5</i>
GGH	NM_003878.2	<i>gamma-glutamyl hydrolase</i>
GHR	NM_000163.2	<i>growth hormone receptor</i>
GJB2	NM_004004.5	<i>gap junction protein beta 2</i>
GLI3	NM_000168.5	<i>GLI family zinc finger 3</i>
GNG4	NM_001098721.1	<i>G protein subunit gamma 4</i>
GNLY	NM_012483.3	<i>granulysin</i>
GPC4	NM_001448.2	<i>glypican 4</i>
GPR160	NM_014373.1	<i>G protein-coupled receptor 160</i>
GPX3	NM_002084.3	<i>glutathione peroxidase 3</i>
GRB2	NM_002086.4	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
GRB7	NM_005310.2	<i>growth factor receptor bound protein 7</i>
GREM1	NM_013372.6	<i>gremlin 1, DAN family BMP antagonist</i>
GRIA3	NM_000828.4	<i>glutamate ionotropic receptor AMPA type subunit 3</i>
GRIN1	NM_000832.5	<i>glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 1</i>
GRIN2A	NM_000833.3	<i>glutamate ionotropic receptor NMDA type subunit 2A</i>
GSK3B	NM_001146156.1	<i>glycogen synthase kinase 3 beta</i>
GTF2H2	NM_001515.2	<i>general transcription factor IIH subunit 2</i>
GZMA	NM_006144.3	<i>granzyme A</i>
GZMB	NM_004131.4	<i>granzyme B</i>
GZMH	NM_033423.3	<i>granzyme H</i>
GZMM	NM_005317.2	<i>granzyme M</i>
HAPLN1	NM_001884.3	<i>hyaluronan and proteoglycan link protein 1</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel Breast Cancer 360® da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
HAS1	NM_001523.3	<i>hyaluronan synthase 1</i>
HBB	NM_000518.4	<i>hemoglobin subunit beta</i>
HDAC1	NM_004964.2	<i>histone deacetylase 1</i>
HDAC10	NM_032019.5	<i>histone deacetylase 10</i>
HDAC11	NM_001330636.1	<i>histone deacetylase 11</i>
HDAC2	NM_001527.3	<i>histone deacetylase 2</i>
HDAC5	NM_001015053.1	<i>histone deacetylase 5</i>
HDAC6	NM_001321225.1	<i>histone deacetylase 6</i>
HDC	NM_002112.3	<i>histidine decarboxylase</i>
HEG1	NM_020733.1	<i>heart development protein with EGF like domains 1</i>
HELLS	NM_001289067.1	<i>helicase, lymphoid specific</i>
HEMK1	NM_001317851.1	<i>HemK methyltransferase family member 1</i>
HES1	NM_005524.2	<i>hes family bHLH transcription factor 1</i>
HGF	NM_000601.5	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIF1A	NM_181054.2	<i>hypoxia inducible factor 1 alpha subunit</i>
HIST1H1C	NM_005319.3	<i>histone cluster 1 H1 family member c</i>
HIST1H2BH	NM_003524.2	<i>histone cluster 1 H2B family member h</i>
HIST1H3H	NM_003536.2	<i>histone cluster 1 H3 family member h</i>
HIST3H2BB	NM_175055.2	<i>histone cluster 3 H2B family member b</i>
HK2	NM_000189.4	<i>hexokinase 2</i>
HLA-A	NM_002116.7	<i>H1 histone family member 0</i>
HLA-B	NM_005514.6	<i>major histocompatibility complex, class I, B</i>
HLA-C	NM_002117.4	<i>major histocompatibility complex, class I, C</i>
HLA-DMA	NM_006120.3	<i>major histocompatibility complex, class II, DM alpha</i>
HLA-DMB	NM_002118.3	<i>major histocompatibility complex, class II, DM beta</i>
HLA-DOB	NM_002120.3	<i>major histocompatibility complex, class II, DO beta</i>
HLA-DPA1	NM_033554.2	<i>major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1</i>
HLA-DPB1	NM_002121.5	<i>major histocompatibility complex, class II, DP beta 1</i>
HLA-DQA1	NM_002122.3	<i>major histocompatibility complex, class II, DQ alpha 1</i>
HLA-DQB1	NM_002123.3	<i>major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1</i>
HLA-DRA	NM_019111.3	<i>major histocompatibility complex, class II, DR alpha</i>
HLA-DRB1	NM_002124.3	<i>major histocompatibility complex, class II, DR beta 1</i>
HLA-E	NM_005516.5	<i>major histocompatibility complex, class I, E</i>
HMGA1	NM_145902.2	<i>high mobility group AT-hook 1</i>
HNF1A	NM_000545.6	<i>HNF1 homeobox A</i>
HOXA5	NM_019102.2	<i>homeobox A5</i>
HOXA7	NM_006896.3	<i>homeobox A7</i>
HOXA9	NM_152739.3	<i>homeobox A9</i>
HOXB13	NM_006361.5	<i>homeobox B13</i>

Continua na próxima página.



**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel Breast Cancer 360® da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
HOXB3	NM_001330322.1	<i>homeobox B3</i>
HSPA2	NM_021979.3	<i>heat shock protein family A (Hsp70) member 2</i>
IBSP	NM_004967.3	<i>integrin binding sialoprotein</i>
ICAM1	NM_000201.2	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
ID1	NM_002165.2	<i>inhibitor of DNA binding 1, HLH protein</i>
ID2	NM_002166.4	<i>inhibitor of DNA binding 2</i>
ID4	NM_001546.3	<i>inhibitor of DNA binding 4, HLH protein</i>
IDO1	NM_002164.5	<i>indoleamine 2,3-dioxygenase 1</i>
IFT140	NM_014714.3	<i>intraflagellar transport 140</i>
IGF1	NM_000618.3	<i>insulin like growth factor 1</i>
IGF1R	NM_000875.3	<i>insulin like growth factor 1 receptor</i>
IKZF3	NM_183232.2	<i>IKAROS family zinc finger 3</i>
IL10RA	NM_001558.2	<i>interleukin 10 receptor subunit alpha</i>
IL11RA	NM_147162.1	<i>interleukin 11 receptor subunit alpha</i>
IL12RB2	NM_001319233.1	<i>interleukin 12 receptor subunit beta 2</i>
IL13RA1	NM_001560.2	<i>interleukin 13 receptor subunit alpha 1</i>
IL1B	NM_000576.2	<i>interleukin 1 beta</i>
IL1R2	NR_048564.1	<i>interleukin 1 receptor type 2</i>
IL1RN	NM_000577.3	<i>interleukin 1 receptor antagonist</i>
IL20RA	NM_001278722.1	<i>interleukin 20 receptor subunit alpha</i>
IL20RB	NM_144717.2	<i>interleukin 20 receptor subunit beta</i>
IL22RA2	NM_052962.2	<i>interleukin 22 receptor subunit alpha 2</i>
IL24	NM_001185158.1	<i>interleukin 24</i>
IL2RA	NM_000417.2	<i>interleukin 2 receptor subunit alpha</i>
IL2RB	NM_000878.2	<i>interleukin 2 receptor subunit beta</i>
IL3RA	NM_002183.2	<i>interleukin 3 receptor subunit alpha</i>
IL4R	NM_000418.3	<i>interleukin 4 receptor</i>
IL6	NM_000600.3	<i>interleukin 6</i>
IL6R	NM_000565.3	<i>interleukin 6 receptor</i>
IL7R	NM_002185.3	<i>interleukin 7 receptor</i>
INHBA	NM_002192.2	<i>inhibin beta A subunit</i>
INHBB	NM_002193.3	<i>inhibin beta B subunit</i>
IRF6	NM_001206696.1	<i>interferon regulatory factor 6</i>
IRX1	NM_024337.3	<i>iroquois homeobox 1</i>
ISG15	NM_005101.3	<i>ISG15 ubiquitin-like modifier</i>
ISM1	NM_080826.1	<i>isthmin 1</i>
ITGA6	NM_001316306.1	<i>integrin subunit alpha 6</i>
ITGAV	NM_001144999.2	<i>integrin subunit alpha V</i>
ITGB1	NM_002211.3	<i>integrin subunit beta 1</i>
ITGB3	NM_000212.2	<i>integrin subunit beta 3</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel Breast Cancer 360® da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
ITGB6	NM_000888.4	<i>integrin subunit beta 6</i>
ITPR1	NM_001099952.2	<i>inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1</i>
JAG1	NM_000214.2	<i>jagged 1</i>
JAG2	NM_002226.4	<i>jagged 2</i>
JAK1	NM_002227.1	<i>Janus kinase 1</i>
JAK2	NM_004972.2	<i>Janus kinase 2</i>
JAK3	NM_000215.2	<i>Janus kinase 3</i>
JAM2	NM_001270407.1	<i>junctional adhesion molecule 2</i>
JCAD	NM_020848.3	<i>junctional cadherin 5 associated</i>
JUN	NM_002228.3	<i>Jun proto-oncogene, AP-1 transcription factor subunit</i>
KAT2B	NM_003884.4	<i>lysine acetyltransferase 2B</i>
KCNB1	NM_004975.3	<i>potassium voltage-gated channel subfamily B member 1</i>
KDR	NM_002253.2	<i>kinase insert domain receptor</i>
KIAA0040	NM_014656.1	<i>KIAA0040</i>
KIF11	NM_004523.3	<i>kinesin family member 11</i>
KIF14	NM_001305792.1	<i>kinesin family member 14</i>
KIF23	NM_138555.1	<i>kinesin family member 23</i>
KIF2C	NM_006845.2	<i>kinesin family member 2C</i>
KIFC1	NM_002263.3	<i>kinesin family member C1</i>
KIT	NM_000222.2	<i>KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase</i>
KLRK1	NM_007360.3	<i>killer cell lectin like receptor K1</i>
KRT14	NM_000526.3	<i>keratin 14</i>
KRT17	NM_000422.1	<i>keratin 17</i>
KRT5	NM_000424.2	<i>keratin 5</i>
KRT6B	NM_005555.3	<i>keratin 6B</i>
KRT7	NM_005556.3	<i>keratin 7</i>
LAD1	NM_005558.3	<i>ladinin 1</i>
LAG3	NM_002286.5	<i>lymphocyte activating 3</i>
LAMA3	NM_198129.1	<i>laminin subunit alpha 3</i>
LAMB3	NM_000228.2	<i>laminin subunit beta 3</i>
LAMC2	NM_005562.2	<i>laminin subunit gamma 2</i>
LEF1	NM_001130713.1	<i>lymphoid enhancer binding factor 1</i>
LEFTY2	NM_003240.2	<i>left-right determination factor 2</i>
LEMD1	NM_001199052.1	<i>LEM domain containing 1</i>
LEP	NM_000230.2	<i>leptin</i>
LEPR	NM_001003679.3	<i>leptin receptor</i>
LFNG	NM_001040167.1	<i>LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase</i>
LIF	NM_002309.4	<i>LIF, interleukin 6 family cytokine</i>
LIFR	NM_001127671.1	<i>LIF receptor alpha</i>
LINC02381	NR_026656.1	<i>long intergenic non-protein coding RNA 2381</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel Breast Cancer 360® da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
LPL	NM_000237.2	<i>lipoprotein lipase</i>
LRP2	NM_004525.2	<i>LDL receptor related protein 2</i>
LRRC32	NM_005512.2	<i>leucine rich repeat containing 32</i>
LTB	NM_002341.1	<i>lymphotoxin beta</i>
LTBP1	NM_000627.3	<i>latent transforming growth factor beta binding protein 1</i>
MAD2L1	NM_002358.3	<i>mitotic arrest deficient 2 like 1</i>
MAF	NM_005360.4	<i>MAF bZIP transcription factor</i>
MAML2	NM_032427.1	<i>mastermind like transcriptional coactivator 2</i>
MAP2K4	NM_003010.3	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>
MAP3K12	NM_006301.3	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12</i>
MAPK1	NM_138957.2	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
MAPK10	NM_001318067.1	<i>mitogen-activated protein kinase 10</i>
MAPK3	NM_001040056.1	<i>mitogen-activated protein kinase 3</i>
MAPK8IP2	NM_012324.2	<i>mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2</i>
MAPT	NM_016835.3	<i>microtubule associated protein tau</i>
MARCO	NM_006770.3	<i>macrophage receptor with collagenous structure</i>
MCM2	NM_004526.3	<i>minichromosome maintenance complex component 2</i>
MCM3	NM_001270472.1	<i>minichromosome maintenance complex component 3</i>
MDM2	NM_006878.2	<i>MDM2 proto-oncogene</i>
MED1	NM_004774.3	<i>mediator complex subunit 1</i>
MELK	NM_014791.2	<i>maternal embryonic leucine zipper kinase</i>
MEOX2	NM_005924.4	<i>mesenchyme homeobox 2</i>
MET	NM_000245.2	<i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
MFNG	NM_002405.3	<i>MFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase</i>
MIA	NM_006533.1	<i>melanoma inhibitory activity</i>
MIS18A	NM_018944.2	<i>MIS18 kinetochore protein A</i>
MKI67	NM_002417.2	<i>marker of proliferation Ki-67</i>
MLH1	NM_000249.2	<i>mutL homolog 1</i>
MLLT3	NM_004529.2	<i>MLLT3, super elongation complex subunit</i>
MLPH	NM_024101.4	<i>melanophilin</i>
MME	NM_001354644.1	<i>membrane metalloendopeptidase</i>
MMP11	NM_005940.3	<i>matrix metallopeptidase 11</i>
MMP14	NM_004995.2	<i>matrix metallopeptidase 14</i>
MMP3	NM_002422.3	<i>matrix metallopeptidase 3</i>
MMP7	NM_002423.3	<i>matrix metallopeptidase 7</i>
MMP9	NM_004994.2	<i>matrix metallopeptidase 9</i>
MMRN2	NM_024756.2	<i>multimerin 2</i>
MRE11	NM_001330347.1	<i>MRE11 homolog, double strand break repair nuclease</i>
MS4A2	NM_000139.3	<i>membrane spanning 4-domains A2</i>
MSR1	NM_002445.3	<i>macrophage scavenger receptor 1</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel Breast Cancer 360® da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
MT1G	NM_005950.1	<i>metallothionein 1G</i>
MTOR	NM_004958.3	<i>mechanistic target of rapamycin kinase</i>
MUC1	NM_002456.5	<i>mucin 1, cell surface associated</i>
MUS81	NM_001350283.1	<i>MUS81 structure-specific endonuclease subunit</i>
MYBL2	NM_002466.2	<i>MYB proto-oncogene like 2</i>
MYC	NM_002467.3	<i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>
MYCN	NM_005378.4	<i>MYCN proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>
MYCT1	NM_025107.2	<i>MYC target 1</i>
NASP	NM_172164.1	<i>nuclear autoantigenic sperm protein</i>
NAT1	NM_000662.4	<i>N-acetyltransferase 1</i>
NCAM1	NM_000615.6	<i>neural cell adhesion molecule 1</i>
NCAPH2	NM_001185011.1	<i>non-SMC condensin II complex subunit H2</i>
NDC80	NM_006101.1	<i>NDC80, kinetochore complex component</i>
NDP	NM_000266.3	<i>NDP, norrin cystine knot growth factor</i>
NEIL1	NM_024608.2	<i>nei like DNA glycosylase 1</i>
NEIL2	NM_145043.2	<i>nei like DNA glycosylase 2</i>
NEIL3	NM_018248.2	<i>nei like DNA glycosylase 3</i>
NEO1	NM_002499.2	<i>neogenin 1</i>
NETO2	NM_001201477.1	<i>neuropilin and tolloid like 2</i>
NFATC1	NM_172388.2	<i>nuclear factor of activated T-cells 1</i>
NFKBIZ	NM_031419.2	<i>NFKB inhibitor zeta</i>
NGFR	NM_002507.3	<i>nerve growth factor receptor</i>
NKG7	NM_005601.3	<i>natural killer cell granule protein 7</i>
NOD2	NM_022162.1	<i>nucleotide binding oligomerization domain containing 2</i>
NOTCH1	NM_017617.3	<i>notch 1</i>
NOTCH2	NM_024408.3	<i>notch 2</i>
NOTCH3	NM_000435.2	<i>notch 3</i>
NPEPPS	NM_006310.3	<i>aminopeptidase puromycin sensitive</i>
NPR1	NM_000906.3	<i>natriuretic peptide receptor 1</i>
NR4A1	NM_002135.4	<i>nuclear receptor subfamily 4 group A member 1</i>
NR4A3	NM_173198.1	<i>nuclear receptor subfamily 4 group A member 3</i>
NRCAM	NM_001037132.2	<i>neuronal cell adhesion molecule</i>
NRXN1	NM_138735.2	<i>neurexin 1</i>
NRXN3	NM_004796.4	<i>neurexin 3</i>
NSD1	NM_022455.4	<i>nuclear receptor binding SET domain protein 1</i>
NSD3	NM_017778.2	<i>nuclear receptor binding SET domain protein 3</i>
NTRK2	NM_001018065.2	<i>neurotrophic receptor tyrosine kinase 2</i>
NUDT1	NM_198953.1	<i>nudix hydrolase 1</i>
NUF2	NM_145697.1	<i>NUF2, NDC80 kinetochore complex component</i>
NUMBL	NM_004756.3	<i>NUMB like, endocytic adaptor protein</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel *Breast Cancer 360*<sup>®</sup> da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
NUPR1	NM_012385.2	<i>nuclear protein 1, transcriptional regulator</i>
OAS3	NM_006187.3	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase 3</i>
OCLN	NM_001205254.1	<i>occludin</i>
OGN	NM_014057.3	<i>osteoglycin</i>
OLFML2B	NM_015441.1	<i>olfactomedin like 2B</i>
ORC6	NM_014321.2	<i>origin recognition complex subunit 6</i>
PALB2	NM_024675.3	<i>partner and localizer of BRCA2</i>
PALMD	NM_017734.4	<i>palmelphin</i>
PARP1	NM_001618.3	<i>poly(ADP-ribose) polymerase 1</i>
PARP2	NM_001042618.1	<i>poly(ADP-ribose) polymerase 2</i>
PARP4	NM_006437.3	<i>poly(ADP-ribose) polymerase family member 4</i>
PAX5	NM_016734.2	<i>paired box 5</i>
PAX8	NM_013953.3	<i>paired box 8</i>
PBX3	NM_006195.5	<i>PBX homeobox 3</i>
PCK1	NM_002591.3	<i>phosphoenolpyruvate carboxykinase 1</i>
PCNA	NM_182649.1	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PDCD1	NM_005018.1	<i>programmed cell death 1</i>
PDCD1LG2	NM_025239.3	<i>programmed cell death 1 ligand 2</i>
PDE9A	NM_001001567.1	<i>phosphodiesterase 9A</i>
PDGFB	NM_002608.2	<i>platelet derived growth factor subunit B</i>
PDGFRA	NM_006206.4	<i>platelet derived growth factor receptor alpha</i>
PDGFRB	NM_002609.3	<i>platelet derived growth factor receptor beta</i>
PDK4	NM_002612.3	<i>pyruvate dehydrogenase kinase 4</i>
PECAM1	NM_000442.4	<i>platelet and endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PFDN2	NM_012394.3	<i>prefoldin subunit 2</i>
PGK1	NM_000291.3	<i>phosphoglycerate kinase 1</i>
PGR	NM_000926.2	<i>progesterone receptor</i>
PHGDH	NM_006623.2	<i>phosphoglycerate dehydrogenase</i>
PIK3CA	NM_006218.2	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PIK3CD	NM_001350234.1	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta</i>
PIK3CG	NM_001282426.1	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma</i>
PIK3R1	NM_001242466.1	<i>phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1</i>
PIK3R2	NM_005027.3	<i>phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 2</i>
PIK3R3	NM_001114172.1	<i>phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3</i>
PIK3R5	NM_014308.3	<i>phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 5</i>
PIM1	NM_002648.2	<i>Pim-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
PIP	NM_002652.2	<i>prolactin induced protein</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel Breast Cancer 360® da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
PKMYT1	NM_001258450.1	<i>protein kinase, membrane associated tyrosine/threonine 1</i>
PLA1A	NM_015900.2	<i>phospholipase A1 member A</i>
PLA2G2A	NM_000300.2	<i>phospholipase A2 group IIA</i>
PLA2G3	NM_015715.3	<i>phospholipase A2 group III</i>
PLA2G4A	NM_024420.2	<i>phospholipase A2 group IVA</i>
PLA2G4F	NM_213600.2	<i>phospholipase A2 group IVF</i>
PLAT	NM_000931.2	<i>plasminogen activator, tissue type</i>
PLCB1	NM_015192.3	<i>phospholipase C beta 1</i>
PLCB4	NM_000933.3	<i>phospholipase C beta 4</i>
PLCE1	NM_001165979.2	<i>phospholipase C epsilon 1</i>
PLD1	NM_002662.4	<i>phospholipase D1</i>
PMS2	NM_000535.6	<i>PMS1 homolog 2, mismatch repair system component</i>
POLD1	NM_001256849.1	<i>DNA polymerase delta 1, catalytic subunit</i>
POLQ	NM_199420.3	<i>DNA polymerase theta</i>
POPDC3	NM_022361.4	<i>popeye domain containing 3</i>
PPARG	NM_005037.5	<i>peroxisome proliferator activated receptor gamma</i>
PPARGC1A	NM_013261.3	<i>PPARG coactivator 1 alpha</i>
PPP2CB	NM_001009552.1	<i>protein phosphatase 2 catalytic subunit beta</i>
PPP2R1A	NM_014225.3	<i>protein phosphatase 2 scaffold subunit Aalpha</i>
PPP2R2C	NM_001206995.1	<i>protein phosphatase 2 regulatory subunit Bgamma</i>
PRC1	NM_199413.1	<i>protein regulator of cytokinesis 1</i>
PREP	NM_002726.3	<i>prolyl endopeptidase</i>
PRF1	NM_001083116.1	<i>perforin 1</i>
PRKAA2	NM_006252.3	<i>protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2</i>
PRKACA	NM_002730.3	<i>protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha</i>
PRKACB	NM_182948.2	<i>protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta</i>
PRKCA	NM_002737.2	<i>protein kinase C alpha</i>
PRKCB	NM_212535.2	<i>protein kinase C beta</i>
PRKDC	NM_006904.6	<i>protein kinase, DNA-activated, catalytic polypeptide</i>
PRKX	NM_005044.4	<i>protein kinase, X-linked</i>
PRLR	NM_000949.5	<i>prolactin receptor</i>
PROM1	NM_001145847.1	<i>prominin 1</i>
PSAT1	NM_021154.4	<i>phosphoserine aminotransferase 1</i>
PSMB10	NM_002801.3	<i>proteasome subunit beta 10</i>
PSMB7	NM_002799.2	<i>proteasome subunit beta 7</i>
PSMB9	NM_002800.4	<i>proteasome subunit beta 9</i>
PTCH1	NM_000264.3	<i>patched 1</i>
PTEN	NM_000314.6	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTGDS	NM_000954.5	<i>prostaglandin D2 synthase</i>
PTGER3	NM_000957.2	<i>prostaglandin E receptor 3</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel Breast Cancer 360® da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
PTGS2	NM_000963.1	<i>prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i>
PTTG1	NM_004219.2	<i>pituitary tumor-transforming 1</i>
PYCARD	NM_013258.3	<i>PYD and CARD domain containing</i>
RAC2	NM_002872.4	<i>Rac family small GTPase 2</i>
RAC3	NM_001316307.1	<i>Rac family small GTPase 3</i>
RAD51	NM_133487.3	<i>RAD51 recombinase</i>
RAD51C	NM_058216.2	<i>RAD51 paralog C</i>
RAD52	NM_134424.3	<i>RAD52 homolog, DNA repair protein</i>
RAD54L	NM_003579.3	<i>RAD54 like</i>
RARRES3	NM_004585.3	<i>retinoic acid receptor responder 3</i>
RASAL1	NM_001193520.1	<i>RAS protein activator like 1</i>
RASGRF1	NM_001145648.1	<i>Ras protein specific guanine nucleotide releasing factor 1</i>
RASGRF2	NM_006909.2	<i>Ras protein specific guanine nucleotide releasing factor 2</i>
RASGRP1	NM_001128602.1	<i>RAS guanyl releasing protein 1</i>
RB1	NM_000321.2	<i>RB transcriptional corepressor 1</i>
RBL1	NM_002895.3	<i>RB transcriptional corepressor like 1</i>
RBL2	NM_001323611.1	<i>RB transcriptional corepressor like 2</i>
RBX1	NM_014248.3	<i>ring-box 1</i>
RELN	NM_005045.3	<i>reelin</i>
RFC4	NM_002916.3	<i>replication factor C subunit 4</i>
RNASE2	NM_002934.2	<i>ribonuclease A family member 2</i>
RNF103	NM_001198951.1	<i>ring finger protein 103</i>
ROBO4	NM_019055.5	<i>roundabout guidance receptor 4</i>
ROCK1	NM_005406.2	<i>Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1</i>
ROCK2	NM_001321643.1	<i>Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2</i>
RORA	NM_134262.2	<i>RAR related orphan receptor A</i>
RORB	NM_006914.3	<i>RAR related orphan receptor B</i>
RPS6KA5	NM_182398.1	<i>ribosomal protein S6 kinase A5</i>
RPS6KB1	NM_001272042.1	<i>ribosomal protein S6 kinase B1</i>
RPS6KB2	NM_003952.2	<i>ribosomal protein S6 kinase B2</i>
RRM2	NM_001034.1	<i>ribonucleotide reductase regulatory subunit M2</i>
RUNX3	NM_001031680.2	<i>runt related transcription factor 3</i>
S100A14	NM_020672.1	<i>S100 calcium binding protein A14</i>
S100A7	NM_002963.3	<i>S100 calcium binding protein A7</i>
S1PR1	NM_001400.3	<i>sphingosine-1-phosphate receptor 1</i>
SCARA5	NM_173833.5	<i>scavenger receptor class A member 5</i>
SCUBE2	NM_020974.1	<i>signal peptide, CUB domain and EGF like domain containing 2</i>
SELE	NM_000450.2	<i>selectin E</i>
SERBP1	NM_001018067.1	<i>SERPINE1 mRNA binding protein 1</i>
SERPINB5	NM_002639.4	<i>serpin family B member 5</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel Breast Cancer 360® da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
SERPINH1	NM_001207014.1	<i>serpin family H member 1</i>
SFN	NM_006142.3	<i>stratifin</i>
SFRP1	NM_003012.3	<i>secreted frizzled related protein 1</i>
SFRP2	NM_003013.2	<i>secreted frizzled related protein 2</i>
SFRP4	NM_003014.2	<i>secreted frizzled related protein 4</i>
SHC2	NM_012435.2	<i>SHC adaptor protein 2</i>
SHC4	NM_203349.3	<i>SHC adaptor protein 4</i>
SHE	NM_001010846.2	<i>Src homology 2 domain containing E</i>
SHMT2	NM_001166356.1	<i>serine hydroxymethyltransferase 2</i>
SIDT1	NM_017699.2	<i>SID1 transmembrane family member 1</i>
SIGIRR	NM_021805.2	<i>single Ig and TIR domain containing</i>
SIX1	NM_005982.3	<i>SIX homeobox 1</i>
SKA3	NM_145061.5	<i>spindle and kinetochore associated complex subunit 3</i>
SKP1	NM_006930.3	<i>S-phase kinase associated protein 1</i>
SKP2	NM_001243120.1	<i>S-phase kinase associated protein 2</i>
SLC2A1	NM_006516.2	<i>solute carrier family 2 member 1</i>
SLC39A6	NM_012319.2	<i>solute carrier family 39 member 6</i>
SLC44A4	NM_001178044.1	<i>solute carrier family 44 member 4</i>
SLPI	NM_003064.3	<i>secretory leukocyte peptidase inhibitor</i>
SMAD1	NM_005900.2	<i>SMAD family member 1</i>
SMAD3	NM_001145104.1	<i>SMAD family member 3</i>
SMAD4	NM_005359.5	<i>SMAD family member 4</i>
SMAD5	NM_005903.5	<i>SMAD family member 5</i>
SMC1B	NM_001291501.1	<i>structural maintenance of chromosomes 1B</i>
SMO	NM_005631.3	<i>smoothened, frizzled class receptor</i>
SMURF2	NM_022739.3	<i>SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2</i>
SNAI1	NM_005985.3	<i>snail family transcriptional repressor 1</i>
SNAI2	NM_003068.4	<i>snail family transcriptional repressor 2</i>
SOCS1	NM_003745.1	<i>suppressor of cytokine signaling 1</i>
SOCS2	NM_003877.3	<i>suppressor of cytokine signaling 2</i>
SOCS3	NM_003955.3	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
SOX10	NM_006941.3	<i>SRY-box 10</i>
SOX17	NM_022454.3	<i>SRY-box 17</i>
SOX2	NM_003106.2	<i>SRY-box 2</i>
SOX9	NM_000346.2	<i>SRY-box 9</i>
SP1	NM_138473.2	<i>Sp1 transcription factor</i>
SPC25	NM_020675.3	<i>SPC25, NDC80 kinetochore complex component</i>
SPDEF	XM_011514457.1	<i>SAM pointed domain containing ETS transcription factor</i>
SPN	NM_001030288.1	<i>sialophorin</i>
SPP1	NM_000582.2	<i>secreted phosphoprotein 1</i>

Continua na próxima página.



**Anexo B (continuação)** – Lista de genes do painel *Breast Cancer 360®* da NanoString Technologies.

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
SPRY1	NM_005841.2	<i>sprouty RTK signaling antagonist 1</i>
SPRY2	NM_001318537.1	<i>sprouty RTK signaling antagonist 2</i>
SPRY4	NM_030964.3	<i>sprouty RTK signaling antagonist 4</i>
SRPX	NM_001170750.1	<i>sushi repeat containing protein, X-linked</i>
ST6GALNAC2	NM_006456.2	<i>ST6 N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 2</i>
STAT1	NM_007315.3	<i>signal transducer and activator of transcription 1</i>
STC1	NM_003155.2	<i>stanniocalcin 1</i>
SUV39H2	NM_001193424.1	<i>suppressor of variegation 3-9 homolog 2</i>
SYTL4	NM_001129896.2	<i>synaptotagmin like 4</i>
TAP1	NM_000593.5	<i>transporter 1, ATP binding cassette subfamily B member</i>
TAP2	NM_018833.2	<i>transporter 2, ATP binding cassette subfamily B member</i>
TAPBP	NM_003190.4	<i>TAP binding protein</i>
TBC1D9	NM_015130.2	<i>TBC1 domain family member 9</i>
TBX1	NM_080646.1	<i>T-box 1</i>
TCEAL1	NM_004780.2	<i>transcription elongation factor A like 1</i>
TCF4	NM_001243226.1	<i>transcription factor 4</i>
TCF7L1	NM_031283.2	<i>transcription factor 7 like 1</i>
TEK	NM_000459.4	<i>TEK receptor tyrosine kinase</i>
TFDP1	NM_007111.4	<i>transcription factor Dp-1</i>
TFF1	NM_003225.2	<i>trefoil factor 1</i>
TFF3	NM_003226.3	<i>trefoil factor 3</i>
TGFB1	NM_000660.4	<i>transforming growth factor beta 1</i>
TGFB2	NM_001135599.3	<i>transforming growth factor beta 2</i>
TGFB3	NM_001329938.1	<i>transforming growth factor beta 3</i>
TGFBR2	NM_001024847.2	<i>transforming growth factor beta receptor 2</i>
THBS1	NM_003246.2	<i>thrombospondin 1</i>
THBS2	NM_003247.3	<i>thrombospondin 2</i>
THBS4	NM_001306212.1	<i>thrombospondin 4</i>
THY1	NM_006288.3	<i>Thy-1 cell surface antigen</i>
TIE1	NM_005424.4	<i>tyrosine kinase with immunoglobulin like and EGF like domains 1</i>
TIGIT	NM_173799.2	<i>T-cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
TIMP4	NM_003256.3	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 4</i>
TLE3	NM_001105192.1	<i>transducin like enhancer of split 3</i>
TLR4	NR_024168.1	<i>toll like receptor 4</i>
TLX1	NM_001195517.1	<i>T-cell leukemia homeobox 1</i>
TMEM45B	NM_138788.3	<i>transmembrane protein 45B</i>
TMPRSS2	NM_005656.3	<i>transmembrane protease, serine 2</i>
TMPRSS4	NM_019894.3	<i>transmembrane protease, serine 4</i>
TNF	NM_000594.3	<i>tumor necrosis factor</i>
TNFAIP6	NM_007115.3	<i>TNF alpha induced protein 6</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel *Breast Cancer 360*<sup>®</sup> da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
TNFSF10	NM_003810.3	<i>TNF superfamily member 10</i>
TNKS	NM_003747.2	<i>tankyrase</i>
TNKS2	NM_025235.3	<i>tankyrase 2</i>
TNN	NM_022093.1	<i>tenascin N</i>
TOP2A	NM_001067.3	<i>DNA topoisomerase II alpha</i>
TP53	NM_000546.2	<i>tumor protein p53</i>
TPSAB1	NM_003294.3	<i>tryptase alpha/beta 1</i>
TRIP13	NM_001166260.1	<i>thyroid hormone receptor interactor 13</i>
TSPAN1	NM_005727.2	<i>tetraspanin 1</i>
TSPAN7	NM_004615.3	<i>tetraspanin 7</i>
TTK	NM_003318.4	<i>TTK protein kinase</i>
TTYH1	NM_020659.3	<i>tweety family member 1</i>
TUBA4A	NM_006000.2	<i>tubulin alpha 4a</i>
TWIST1	NM_000474.3	<i>twist family bHLH transcription factor 1</i>
TWIST2	NM_001271893.3	<i>twist family bHLH transcription factor 2</i>
TYK2	NM_003331.4	<i>tyrosine kinase 2</i>
TYMP	NM_001113755.2	<i>thymidine phosphorylase</i>
TYMS	NM_001071.1	<i>thymidylate synthetase</i>
UBE2C	NM_007019.2	<i>ubiquitin conjugating enzyme E2 C</i>
UBE2T	NM_014176.1	<i>ubiquitin conjugating enzyme E2 T</i>
VCAN	NM_001126336.2	<i>versican</i>
VEGFA	NM_001171623.1	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
VEGFD	NM_004469.4	<i>vascular endothelial growth factor D</i>
VIM	NM_003380.3	<i>vimentin</i>
VIT	NM_053276.3	<i>vitrin</i>
WDR77	NM_024102.2	<i>WD repeat domain 77</i>
WEE1	NM_003390.3	<i>WEE1 G2 checkpoint kinase</i>
WIF1	NM_007191.2	<i>WNT inhibitory factor 1</i>
WNT10A	NM_025216.2	<i>Wnt family member 10A</i>
WNT11	XM_011545241.2	<i>Wnt family member 11</i>
WNT2	NM_003391.2	<i>Wnt family member 2</i>
WNT4	NM_030761.4	<i>Wnt family member 4</i>
WNT5A	NM_003392.3	<i>Wnt family member 5A</i>
WNT5B	NM_030775.2	<i>Wnt family member 5B</i>
WNT6	NM_006522.3	<i>Wnt family member 6</i>
WNT7B	NM_058238.2	<i>Wnt family member 7B</i>
WRN	NM_000553.4	<i>Werner syndrome RecQ like helicase</i>
WT1	NM_000378.3	<i>Wilms tumor 1</i>
XRCC2	NM_005431.1	<i>X-ray repair cross complementing 2</i>
XRCC3	NM_001100119.1	<i>X-ray repair cross complementing 3</i>

Continua na próxima página.

**Anexo B (continuação) – Lista de genes do painel Breast Cancer 360® da NanoString Technologies.**

<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
ZBTB16	NM_001018011.1	<i>zinc finger and BTB domain containing 16</i>
ZEB1	NM_001128128.2	<i>zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
ZEB2	NM_001171653.1	<i>zinc finger E-box binding homeobox 2</i>
ZFPM2	NM_012082.3	<i>zinc finger protein, FOG family member 2</i>
ZFYVE9	NM_004799.3	<i>zinc finger FYVE-type containing 9</i>
ZIC2	NM_007129.2	<i>Zic family member 2</i>
ZNF205	NM_003456.2	<i>zinc finger protein 205</i>

<b>Internal Reference Genes</b>		
<b>Símbolo</b>	<b>RefSeq</b>	<b>Gene</b>
ABCF1	NM_001090.2	<i>ATP binding cassette subfamily F member 1</i>
ACTB	NM_001101.2	<i>actin beta</i>
G6PD	NM_000402.4	<i>glucose-6-phosphate dehydrogenase</i>
GUSB	NM_000181.1	<i>glucuronidase beta</i>
MRPL19	NM_014763.3	<i>mitochondrial ribosomal protein L19</i>
NRDE2	NM_017970.3	<i>NRDE-2, necessary for RNA interference, domain containing</i>
OAZ1	NM_004152.2	<i>ornithine decarboxylase antizyme 1</i>
POLR2A	NM_000937.2	<i>RNA polymerase II subunit A</i>
PSMC4	NM_006503.2	<i>proteasome 26S subunit, ATPase 4</i>
PUM1	NM_001020658.1	<i>pumilio RNA binding family member 1</i>
RPLP0	NM_001002.3	<i>ribosomal protein lateral stalk subunit P0</i>
SDHA	NM_004168.3	<i>succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A</i>
SF3A1	NM_005877.4	<i>splicing factor 3a subunit 1</i>
STK11IP	NM_052902.2	<i>serine/threonine kinase 11 interacting protein</i>
TBC1D10B	NM_015527.3	<i>TBC1 domain family member 10B</i>
TBP	NM_001172085.1	<i>TATA-box binding protein</i>
TFRC	NM_003234.1	<i>transferrin receptor</i>
UBB	NM_018955.3	<i>ubiquitin B</i>

## APÊNDICES

**Apêndice 1- Casos do estudo**

<b>Amostra</b>	<b>ID</b>	<b>Idade</b>	<b>Subtipo Molecular</b>	<b>E.C.</b>	<b>Tipo Histológico</b>	<b>T</b>	<b>N</b>
1	MAMA_02	78	Luminal A	IIB	Ductal	T2	N1
2	MAMA_03	54	Luminal B	IIA	Lobular	T1	N1
3	MAMA_04	42	Luminal B	IIA	Ductal	T2	N1
4	MAMA_06	26	Luminal B	IIA	Ductal	T1	N1
5	MAMA_07	45	Luminal B HER2+	IIA	Ductal	T2	N1
6	MAMA_08	63	Luminal A	I	Ductal	T1	N0
7	MAMA_10	58	Luminal B HER2+	IIA	Ductal	T2	N0
8	MAMA_11	67	Luminal A	I	Ductal	T1	N0
9	MAMA_12	49	Triplo Negativo	IIA	Ductal	T2	N0
10	MAMA_13	81	Triplo Negativo	IIA	Ductal	T2	N0
11	MAMA_14	54	HER2+	IIA	Ductal	T2	N0
12	MAMA_21	65	Luminal A	IIA	Lobular	T2	N0
13	MAMA_22	57	Luminal A	I	Lobular	T1	N0
14	MAMA_23	49	Luminal A	I	Lobular	T1	N0
15	MAMA_25	49	Luminal B HER2+	I	Ductal	T1	N0
16	MAMA_28	73	Luminal B	IIB	Lobular	T2	N1
17	MAMA_31	79	HER2+	IIB	Ductal	T2	N0
18	MAMA_42	45	Triplo Negativo	IIB	Ductal	T2	N1
19	MAMA_44	41	Luminal B	IIA	Ductal	T2	N0
20	MAMA_45	47	Triplo Negativo	IIA	Ductal	T2	N0
21	MAMA_46	35	Luminal B	I	Ductal	T2	N0
22	MAMA_49	47	Triplo Negativo	IIA	Ductal	T2	N0
23	MAMA_51	46	Triplo Negativo	IIB	Ductal	T3	N0
24	MAMA_54	59	Luminal A	I	Ductal	T1	N0
25	MAMA_55	47	Luminal A	IIA	Ductal	T2	N0

E.C. = Estadiamento clínico; T = Tamanho tumoral; N = Comprometimento linfonodal.

Continua na próxima página.

**Apêndice 1 (continuação) - Casos do estudo**

<b>Amostra</b>	<b>ID</b>	<b>Idade</b>	<b>Subtipo Molecular</b>	<b>E.C.</b>	<b>Tipo Histológico</b>	<b>T</b>	<b>N</b>
26	MAMA_56	64	Luminal B HER2+	IIA	Ductal	T2	N0
27	MAMA_57	60	Luminal A	IIA	Ductal	T2	N0
28	MAMA_60	43	Luminal B HER2+	IA	Ductal	T1	N0
29	MAMA_63	62	Luminal B	IA	Ductal	T1	N0
30	MAMA_64	44	Luminal B	I	Lobular	T1	N0
31	MAMA_65	55	Luminal B	IIA	Ductal	T1	N1
32	MAMA_66	58	Luminal B	I	Lobular	T1	N0
33	MAMA_67	49	Luminal B HER2+	I	Ductal	T1	N0
34	MAMA_68	42	Luminal B	I	Ductal	T1	N0
35	MAMA_72	69	Triplo Negativo	IIA	Ductal	T1	N1
36	MAMA_78	59	Luminal A	IIA	Ductal	T2	N0
37	MAMA_79	52	Luminal B HER2+	IIA	Ductal	T2	N0
38	MAMA_80	57	Luminal A	IIA	Lobular	T2	N0
39	MAMA_82	59	Luminal A	IIA	Ductal	T1	N1
40	MAMA_85	60	Luminal A	IIA	Ductal	T2	N0
41	MAMA_86	50	Luminal B	IIA	Ductal	T1	N1
42	MAMA_88	48	Triplo Negativo	IIB	Ductal	T2	N0
43	MAMA_89	43	Luminal A	IIA	Ductal	T1	N1
44	MAMA_91	63	Triplo Negativo	IIA	Ductal	T2	N0
45	MAMA_94	70	Luminal B	IIA	Ductal	T2	N0
46	MAMA_96	63	Luminal A	I	Lobular	T1	N1
47	MAMA_98	40	Luminal B	IIA	Ductal	T2	N0
48	MAMA_100	62	Luminal B	IIA	Ductal	T1	N2
49	MAMA_104	44	Luminal B	IIA	Ductal	T1	N1
50	MAMA_105	45	Luminal B	IIA	Ductal	T2	N0
51	MAMA_115	70	Luminal B	IIA	Ductal	T1	N1

E.C. = Estadiamento clínico; T = Tamanho tumoral; N = Comprometimento linfonodal.

Continua na próxima página.

**Apêndice 1 (continuação) - Casos do estudo**

Amostra	ID	Idade	Subtipo Molecular	E.C.	Tipo Histológico	T	N
52	MAMA_120	56	Luminal B	I	Ductal	T1	N0
53	MAMA_122	71	Luminal A	I	Ductal	T1	N0
54	MAMA_123	80	Luminal A	I	Ductal	T1	N0
55	MAMA_124	50	Luminal B HER2+	I	Ductal	T1	N0
56	MAMA_125	69	Luminal A	I	Lobular	T1	N0
57	MAMA_126	54	Luminal B	IA	Ductal	T1	N0
58	MAMA_130	62	Luminal B	IA	Ductal	T1	N0
59	MAMA_131	43	Luminal B HER2+	I	Ductal	T1	N0
60	MAMA_139	47	Luminal B	IA	Ductal	T1	N0
61	MAMA_140	38	Luminal A	IA	Ductal	T1	N0
62	MAMA_146	38	Luminal A	IIB	Lobular	T2	N1
63	MAMA_147	57	Luminal A	IIB	Ductal	T2	N1
64	MAMA_149	47	Luminal A	I	Ductal	T2	N1
65	MAMA_152	45	Luminal A	IIA	Ductal	T3	N0
66	MAMA_153	54	Luminal B	IIA	Ductal	T2	N0
67	MAMA_155	52	Luminal A	IIA	Ductal	T2	N0
68	MAMA_159	47	Luminal B HER2+	IIB	Ductal	T2	N1
69	MAMA_162	71	Luminal B	IIB	Ductal	T2	N1
70	MAMA_166	67	Luminal B	IIB	Ductal	T2	N1
71	MAMA_168	49	Triplo Negativo	IIIA	Ductal	T3	N1
72	MAMA_170	22	Triplo Negativo	IIIA	Ductal	T3	N2
73	MAMA_172	57	Luminal B	IIB	Ductal	T2	N2
74	MAMA_177	37	Luminal B HER2+	IIIA	Ductal	T2	N2
75	MAMA_179	57	Luminal B	IIIA	Ductal	T1	N2
76	MAMA_183	45	Luminal B	IIIA	Ductal	T3	N1
77	MAMA_185	61	Luminal B	IIIA	Ductal	T3	N2

E.C. = Estadiamento clínico; T = Tamanho tumoral; N = Comprometimento linfonodal.

Continua na próxima página.

**Apêndice 1 (continuação) - Casos do estudo**

<b>Amostra</b>	<b>ID</b>	<b>Idade</b>	<b>Subtipo Molecular</b>	<b>E.C.</b>	<b>Tipo Histológico</b>	<b>T</b>	<b>N</b>
78	MAMA_190	40	Luminal B	IIIA	Ductal	T2	N2
79	MAMA_191	59	Luminal B	IIIA	Ductal	T3	N2
80	MAMA_193	56	Luminal A	IIA	Ductal	T1	N1
81	MAMA_198	71	Luminal A	IIIA	Ductal	T2	N2
82	MAMA_212	73	Luminal B HER2+	IIB	Ductal	T2	N1

E.C. = Estadiamento clínico; T = Tamanho tumoral; N = Comprometimento linfonodal.



**Apêndice 2** - Quantificação do RNA total obtido a partir de tecido tumoral para avaliação do perfil molecular pela tecnologia *NanoString*.

ID	Nanodrop(ng/uL)	Razão		Qubit
		260/280	260/230	
MAMA_02_T	42,3	2,06	0,66	40,2
MAMA_03_T	31,4	1,94	0,5	25,6
MAMA_04_T	767,5	2	1,58	412
MAMA_06_T	43,6	2,01	0,72	36,8
MAMA_07_T	464	1,99	1,45	294
MAMA_08_T	90,2	1,95	0,94	56,6
MAMA_10_T	358,3	2,05	1,56	280
MAMA_11_T	181,6	2	1,35	142
MAMA_12_T	608	2	1,66	486
MAMA_13_T	661,1	2,03	1,74	164
MAMA_14_T	147,2	2,04	1,42	110
MAMA_21_T	186,7	2,01	1,35	118
MAMA_22_T	56,9	1,91	0,77	27,4
MAMA_23_T	55,5	1,92	0,78	36,2
MAMA_25_T	80,6	1,99	1,08	52,6
MAMA_28_T	95,3	2	1,28	67
MAMA_31_T	607,1	2	1,63	384
MAMA_42_T	430,7	2,03	1,65	372
MAMA_44_T	492,6	2,04	1,72	175
MAMA_45_T	791,1	2,02	1,82	436
MAMA_46_T	877,2	2,03	1,8	614
MAMA_49_T	430,2	2,05	1,68	280
MAMA_51_T	924,2	2,02	1,74	378
MAMA_54_T	114,7	2,06	1,24	73,2
MAMA_55_T	958	2,06	1,95	688
MAMA_56_T	183,9	2,06	1,41	124
MAMA_57_T	382,3	2,06	1,6	258
MAMA_60_T	173,3	2,07	1,48	270
MAMA_63_T	57,4	2,07	0,92	35
MAMA_64_T	86,3	2,1	1,16	63,2
MAMA_65_T	78,1	2,08	1,06	45,8
MAMA_66_T	219,3	2,06	1,61	138
MAMA_67_T	265,1	2,07	1,66	208
MAMA_68_T	160,1	2,07	1,45	107
MAMA_72_T	2068,4	2,05	2,07	1550
MAMA_78_T	1391,2	2,05	2,06	894

Continua na próxima página.

**Apêndice 2 (continuação)** - Quantificação do RNA total obtido a partir de tecido tumoral para avaliação do perfil molecular pela tecnologia *NanoString*.

ID	Nanodrop(ng/uL)	Razão		Qubit
		260/280	260/230	
MAMA_79_T	805,6	2,06	1,94	568
MAMA_80_T	141,1	2,07	1,35	99
MAMA_82_T	40	2,12	0,71	25,6
MAMA_85_T	37	2,18	0,68	21,8
MAMA_86_T	38,4	2,18	0,78	20,8
MAMA_88_T	804,4	2,05	1,88	568
MAMA_89_T	140,1	2,08	1,35	73,6
MAMA_91_T	474,7	2,08	1,8	328
MAMA_94_T	444,5	2,07	1,85	302
MAMA_96_T	171	2,07	1,52	30,6
MAMA_98_T	1.426	2,05	2,09	816
MAMA_100_T	92	2,05	1,22	59
MAMA_104_T	92	2,04	1,20	57
MAMA_105_T	723	2,05	1,90	514
MAMA_115_T	846	2,04	1,92	530
MAMA_120_T	321	2,07	1,66	226
MAMA_122_T	125	2,10	1,27	94
MAMA_123_T	284	2,05	1,66	218
MAMA_124_T	634	2,04	1,86	394
MAMA_125_T	31	2,04	0,56	22
MAMA_126_T	689	2,04	1,95	528
MAMA_130_T	1064	2,07	2,03	736
MAMA_131_T	371	2,07	1,79	244
MAMA_139_T	87	2,06	1,16	63,8
MAMA_140_T	861	2,07	1,98	598
MAMA_146_T	135	2,04	1,26	88
MAMA_147_T	62	2,01	0,85	37
MAMA_149_T	679	2,056	1,91	440
MAMA_152_T	161	2,05	1,33	97
MAMA_153_T	344	2,05	1,71	204
MAMA_155_T	341	2,05	1,75	258
MAMA_159_T	1.311	2,05	2,03	794
MAMA_162_T	394	2,07	1,78	200
MAMA_166_T	106	2,05	1,23	72
MAMA_168_T	822	2,03	1,79	486
MAMA_170_T	1.206	2,06	2,05	792

Continua na próxima página.

**Apêndice 2 (continuação)** - Quantificação do RNA total obtido a partir de tecido tumoral para avaliação do perfil molecular pela tecnologia *NanoString*.

ID	Nanodrop(ng/uL)	Razão		Qubit
		260/280	260/230	
MAMA_172_T	438	2.06	1.77	290
MAMA_177_T	1.049	2.05	2.02	584
MAMA_179_T	170	2.04	1.42	119
MAMA_183_T	531	2.03	1.83	338
MAMA_185_T	166	2.04	1.41	113
MAMA_190_T	831	2.07	1.96	610
MAMA_191_T	477	2.06	1.80	354
MAMA_193_T	845	2.06	2.00	556
MAMA_198_T	1.464	2.07	2.06	900
MAMA_212_T	730	2.08	1.92	448

### Apêndice 3 – Tabela de variantes

Hugo_Symbol	Chromosome	Start_Position	End_Position	Variant_Classification	Ref	Alt	Tumor_Sample_Barcode	HGVSp_Short	Driver_status
AKT3	1	243708883	243708883	Missense_Mutation	C	G	MAMA_10	p.D394H	passenger (oncdriveMUT)
AKT3	1	243736226	243736226	Splice_Site	A	T	MAMA_54	p.X273_splice	-
AKT3	1	243809331	243809331	Nonsense_Mutation	C	T	MAMA_66	p.W98*	-
ALDH1A1	9	75524676	75524676	Splice_Site	C	A	MAMA_06	p.X401_splice	-
ALDH1A1	9	75524558	75524558	Missense_Mutation	C	A	MAMA_170	p.A440S	passenger (oncdriveMUT)
ALDH1A1	9	75555096	75555096	Missense_Mutation	C	T	MAMA_183	p.E47K	passenger (oncdriveMUT)
BRCA1	17	41246334	41246334	Nonsense_Mutation	G	C	MAMA_10	p.S405*	-
BRCA1	17	41228607	41228607	Missense_Mutation	C	A	MAMA_42	p.S1482I	passenger (oncdriveMUT)
BRCA1	17	41251793	41251793	Missense_Mutation	C	A	MAMA_45	p.L182F	-
<b>BRCA2</b>	<b>13</b>	<b>32900673</b>	<b>32900673</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>MAMA_10</b>	<b>p.G185E</b>	<b>driver (oncdriveMUT); predicted; LoF</b>
BRCA2	13	32953632	32953632	Nonsense_Mutation	C	A	MAMA_85	p.S2978*	-
BRCA2	13	32953631	32953631	Missense_Mutation	T	A	MAMA_100	p.S2978T	passenger (oncdriveMUT)
BRCA2	13	32953632	32953632	Nonsense_Mutation	C	A	MAMA_100	p.S2978*	-
BRCA2	13	32972626	32972626	Nonsense_Mutation	A	T	MAMA_131	p.K3326*	passenger (oncdriveMUT)
<b>CDH1</b>	<b>16</b>	<b>68857460</b>	<b>68857460</b>	<b>Nonsense_Mutation</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>MAMA_22</b>	<b>p.Q699*</b>	<b>driver (boostDM: tissue specific model); predicted; LoF</b>
CDH1	16	68842594	68842594	Splice_Site	A	G	MAMA_23	p.X178_splice	-
<b>CDH1</b>	<b>16</b>	<b>68772218</b>	<b>68772218</b>	<b>Nonsense_Mutation</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>MAMA_28</b>	<b>p.Q23*</b>	<b>driver (boostDM: tissue specific model); predicted; LoF</b>

Continua na próxima página.

**Apêndice 3 (continuação) – Tabela de variantes**

Hugo_Symbol	Chromosome	Start_Position	End_Position	Variant_Classification	Ref	Alt	Tumor_Sample_Barcode	HGVSp_Short	Driver_status
COL27A1	9	117002768	117002768	Splice_Site	G	T	MAMA_115	p.X945_splice	-
COL27A1	9	116930194	116930194	Missense_Mutation	A	G	MAMA_131	p.Q120R	passenger (oncodriveMUT)
COL27A1	9	116984539	116984539	Missense_Mutation	G	T	MAMA_139	p.G820C	passenger (oncodriveMUT)
DLGAP5	14	55625264	55625264	Nonsense_Mutation	C	A	MAMA_07	p.E617*	passenger (oncodriveMUT)
DLGAP5	14	55625240	55625240	Nonsense_Mutation	C	A	MAMA_28	p.G625*	-
DLGAP5	14	55647944	55647944	Missense_Mutation	G	T	MAMA_104	p.D189E	-
DLGAP5	14	55618561	55618561	Missense_Mutation	G	T	MAMA_155	p.N740K	-
ERBB2	17	37865692	37865692	Missense_Mutation	C	A	MAMA_02	p.N187K	-
ERBB2	17	37882819	37882819	Missense_Mutation	G	T	MAMA_10	p.W959C	-
<b>ERBB2</b>	<b>17</b>	<b>37881414</b>	<b>37881414</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>MAMA_125</b>	<b>p.L869R</b>	<b>driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act</b>
ERBB2	17	37884037	37884037	Missense_Mutation	C	G	MAMA_131	p.P1170A	passenger (oncodriveMUT)
FOXA1	14	38061058	38061058	Missense_Mutation	G	C	MAMA_23	p.R311G	passenger (oncodriveMUT)
<b>FOXA1</b>	<b>14</b>	<b>38061469</b>	<b>38061469</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>MAMA_123</b>	<b>p.S174T</b>	<b>driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; Act</b>
<b>FOXA1</b>	<b>14</b>	<b>38061261</b>	<b>38061261</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>MAMA_130</b>	<b>p.Y243C</b>	<b>driver (oncodriveMUT; predicted; Act</b>
<b>FOXA1</b>	<b>14</b>	<b>38060808</b>	<b>38060808</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>MAMA_131</b>	<b>p.Y394C</b>	<b>driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; Act</b>
<b>FOXA1</b>	<b>14</b>	<b>38061261</b>	<b>38061261</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>MAMA_131</b>	<b>p.Y243C</b>	<b>driver (oncodriveMUT; predicted; Act</b>

Continua na próxima página.

**Apêndice 3 (continuação) – Tabela de variantes**

Hugo_Symbol	Chromosome	Start_Position	End_Position	Variant_Classification	Ref	Alt	Tumor_Sample_Barcode	HGVSp_Short	Driver_status
MKI67	10	129903104	129903104	Missense_Mutation	C	G	MAMA_08	p.D2334H	passenger (oncdriveMUT)
MKI67	10	129902816	129902816	Missense_Mutation	T	C	MAMA_12	p.K2430E	passenger (oncdriveMUT)
MKI67	10	129913982	129913982	Missense_Mutation	G	T	MAMA_79	p.S230R	-
MKI67	10	129901501	129901501	Missense_Mutation	G	C	MAMA_131	p.T2868S	-
MKI67	10	129901747	129901747	Missense_Mutation	C	T	MAMA_131	p.R2786Q	-
MKI67	10	129906980	129906980	Missense_Mutation	C	T	MAMA_131	p.G1042S	passenger (oncdriveMUT)
MKI67	10	129903331	129903331	Missense_Mutation	C	T	MAMA_193	p.R2258Q	passenger (oncdriveMUT)
PARP4	13	25021323	25021323	Missense_Mutation	A	G	MAMA_67	p.I1039T	passenger (oncdriveMUT)
PARP4	13	25052393	25052393	Missense_Mutation	G	T	MAMA_78	p.H490Q	-
PARP4	13	25009297	25009297	Missense_Mutation	G	T	MAMA_131	p.P1328T	passenger (oncdriveMUT)
PARP4	13	25052393	25052393	Missense_Mutation	G	T	MAMA_149	p.H490Q	-
PARP4	13	25052393	25052393	Missense_Mutation	G	T	MAMA_170	p.H490Q	-
PARP4	13	25052393	25052393	Missense_Mutation	G	T	MAMA_172	p.H490Q	-
PIK3CA	3	178916744	178916744	Missense_Mutation	C	T	MAMA_02	p.T44I	passenger (oncdriveMUT)
<b>PIK3CA</b>	<b>3</b>	<b>178936082</b>	<b>178936082</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>MAMA_02</b>	<b>p.E542K</b>	<b>driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act</b>
PIK3CA	3	178951964	178951964	Missense_Mutation	G	C	MAMA_02	p.G1007R	passenger (oncdriveMUT)

Continua na próxima página.

**Apêndice 3 (continuação) – Tabela de variantes**

Hugo_Symbol	Chromosome	Start_Position	End_Position	Variant_Classification	Ref	Alt	Tumor_Sample_Barcode	HGVSp_Short	Driver_status
PIK3CA	3	178936092	178936092	Missense_Mutation	A	C	MAMA_03	p.E545A	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_04	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178936091	178936091	Missense_Mutation	G	A	MAMA_07	p.E545K	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178936094	178936094	Missense_Mutation	C	A	MAMA_08	p.Q546K	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_10	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178936091	178936091	Missense_Mutation	G	A	MAMA_11	p.E545K	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_14	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act

Continua na próxima página.

**Apêndice 3 (continuação) – Tabela de variantes**

Hugo_Symbol	Chromosome	Start_Position	End_Position	Variant_Classification	Ref	Alt	Tumor_Sample_Barcode	HGVSp_Short	Driver_status
PIK3CA	3	178921552	178921552	Missense_Mutation	A	C	MAMA_21	p.N345T	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_21	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178941867	178941867	Splice_Site	A	T	MAMA_22	p.X730_splice	-
PIK3CA	3	178941869	178941869	Missense_Mutation	G	T	MAMA_22	p.V730L	-
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_22	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_23	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178936091	178936091	Missense_Mutation	G	A	MAMA_25	p.E545K	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178936091	178936091	Missense_Mutation	G	A	MAMA_104	p.E545K	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178936091	178936091	Missense_Mutation	G	A	MAMA_122	p.E545K	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act

Continua na próxima página.



**Apêndice 3 (continuação) – Tabela de variantes**

Hugo_Symbol	Chromosome	Start_Position	End_Position	Variant_Classification	Ref	Alt	Tumor_Sample_Barcode	HGVSp_Short	Driver_status
PIK3CA	3	178921553	178921553	Missense_Mutation	T	A	MAMA_123	p.N345K	-
PIK3CA	3	178921553	178921553	Missense_Mutation	T	A	MAMA_131	p.N345K	-
<b>PIK3CA</b>	<b>3</b>	<b>178936082</b>	<b>178936082</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>MAMA_153</b>	<b>p.E542K</b>	<b>driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act</b>
<b>PIK3CA</b>	<b>3</b>	<b>178952085</b>	<b>178952085</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>MAMA_159</b>	<b>p.H1047R</b>	<b>driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act</b>
<b>PIK3CA</b>	<b>3</b>	<b>178938934</b>	<b>178938934</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>MAMA_162</b>	<b>p.E726K</b>	<b>driver (boostDM: tissue specific model); predicted; Act</b>
PIK3CA	3	178952074	178952074	Missense_Mutation	G	A	MAMA_162	p.M1043I	-
<b>PIK3CA</b>	<b>3</b>	<b>178952085</b>	<b>178952085</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>MAMA_166</b>	<b>p.H1047R</b>	<b>driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act</b>
<b>PIK3CA</b>	<b>3</b>	<b>178952085</b>	<b>178952085</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>MAMA_172</b>	<b>p.H1047R</b>	<b>driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act</b>
<b>PIK3CA</b>	<b>3</b>	<b>178921549</b>	<b>178921549</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>MAMA_177</b>	<b>p.V344G</b>	<b>driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act</b>

Continua na próxima página.

**Apêndice 3 (continuação) – Tabela de variantes**

Hugo_Symbol	Chromosome	Start_Position	End_Position	Variant_Classification	Ref	Alt	Tumor_Sample_Barcode	HGVSp_Short	Driver_status
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_177	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_179	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178936082	178936082	Missense_Mutation	G	A	MAMA_185	p.E542K	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_190	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_191	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_193	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_54	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_60	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act

Continua na próxima página.

**Apêndice 3 (continuação) – Tabela de variantes**

Hugo_Symbol	Chromosome	Start_Position	End_Position	Variant_Classification	Ref	Alt	Tumor_Sample_Barcode	HGVSp_Short	Driver_status
PIK3CA	3	178936091	178936091	Missense_Mutation	G	A	MAMA_63	p.E545K	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_64	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_79	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_80	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_82	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
PIK3CA	3	178921553	178921553	Missense_Mutation	T	A	MAMA_86	p.N345K	-
PIK3CA	3	178952085	178952085	Missense_Mutation	A	G	MAMA_94	p.H1047R	driver (boostDM: tissue specific model); known driver; Act
POLQ	3	121206215	121206215	Missense_Mutation	C	A	MAMA_03	p.A1855S	-
POLQ	3	121200648	121200648	Missense_Mutation	C	A	MAMA_04	p.W1994C	-
POLQ	3	121215670	121215670	Missense_Mutation	C	A	MAMA_04	p.A755S	-

Continua na próxima página.

**Apêndice 3 (continuação) – Tabela de variantes**

Hugo_Symbol	Chromosome	Start_Position	End_Position	Variant_Classification	Ref	Alt	Tumor_Sample_Barcode	HGVSp_Short	Driver_status
POLQ	3	121228496	121228496	Missense_Mutation	G	A	MAMA_152	p.S624F	-
<b>PTEN</b>	<b>10</b>	<b>89692904</b>	<b>89692904</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>MAMA_55</b>	<b>p.R130G</b>	<b>driver (boostDM: tissue specific model); known driver; LoF</b>
PTEN	10	89692780	89692780	Nonsense_Mutation	T	G	MAMA_168	p.Y88*	-
<b>PTEN</b>	<b>10</b>	<b>89711893</b>	<b>89711893</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>MAMA_185</b>	<b>p.Q171K</b>	<b>driver (boostDM: tissue specific model); known driver; LoF</b>
<b>PTEN</b>	<b>10</b>	<b>89692922</b>	<b>89692922</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>MAMA_198</b>	<b>p.C136R</b>	<b>driver (boostDM: tissue specific model); known driver; LoF</b>
RELN	7	103206742	103206742	Missense_Mutation	C	G	MAMA_06	p.R1622P	passenger (oncdriveMUT)
RELN	7	103155737	103155737	Missense_Mutation	C	G	MAMA_45	p.D2672H	passenger (oncdriveMUT)
RELN	7	103234836	103234836	Missense_Mutation	C	T	MAMA_126	p.D1215N	passenger (oncdriveMUT)
TP53	17	7577570	7577570	Missense_Mutation	C	T	MAMA_06	p.M237I	-
<b>TP53</b>	<b>17</b>	<b>7578406</b>	<b>7578406</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>MAMA_10</b>	<b>p.R175H</b>	<b>driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)</b>
TP53	17	7576928	7576928	Splice_Site	T	C	MAMA_12	p.X307_splice	-
<b>TP53</b>	<b>17</b>	<b>7577539</b>	<b>7577539</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>MAMA_13</b>	<b>p.R248W</b>	<b>driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)</b>

Continua na próxima página.

**Apêndice 3 (continuação) – Tabela de variantes**

Hugo_Symbol	Chromosome	Start_Position	End_Position	Variant_Classification	Ref	Alt	Tumor_Sample_Barcode	HGVSp_Short	Driver_status
TP53	17	7578190	7578190	Missense_Mutation	T	C	MAMA_14	p.Y220C	driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)
TP53	17	7577559	7577559	Missense_Mutation	G	A	MAMA_31	p.S241F	driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)
TP53	17	7578190	7578190	Missense_Mutation	T	C	MAMA_104	p.Y220C	driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)
TP53	17	7578263	7578263	Nonsense_Mutation	G	A	MAMA_120	p.R196*	driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)
TP53	17	7578552	7578552	Nonsense_Mutation	G	T	MAMA_126	p.Y126*	-
TP53	17	7574003	7574003	Nonsense_Mutation	G	A	MAMA_147	p.R342*	driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)
TP53	17	7578291	7578291	Splice_Site	T	G	MAMA_149	p.X187_splice	-
TP53	17	7578190	7578190	Missense_Mutation	T	C	MAMA_159	p.Y220C	driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)
TP53	17	7577561	7577561	Missense_Mutation	A	C	MAMA_193	p.S240R	-
TP53	17	7577022	7577022	Nonsense_Mutation	G	A	MAMA_42	p.R306*	driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)

Continua na próxima página.

**Apêndice 3 (continuação) – Tabela de variantes**

Hugo_Symbol	Chromosome	Start_Position	End_Position	Variant_Classification	Ref	Alt	Tumor_Sample_Barcode	HGVSp_Short	Driver_status
<b>TP53</b>	<b>17</b>	<b>7577547</b>	<b>7577547</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>MAMA_44</b>	<b>p.G245V</b>	<b>driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)</b>
TP53	17	7578176	7578176	Splice_Site	C	A	MAMA_45	p.X224_splice	-
<b>TP53</b>	<b>17</b>	<b>7577141</b>	<b>7577141</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>MAMA_46</b>	<b>p.G266E</b>	<b>driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)</b>
TP53	17	7574002	7574002	Missense_Mutation	C	G	MAMA_49	p.R342P	-
TP53	17	7579311	7579311	Splice_Site	C	T	MAMA_51	p.X125_splice	-
<b>TP53</b>	<b>17</b>	<b>7577547</b>	<b>7577547</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>MAMA_57</b>	<b>p.G245D</b>	<b>driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)</b>
<b>TP53</b>	<b>17</b>	<b>7578413</b>	<b>7578413</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>MAMA_63</b>	<b>p.V173M</b>	<b>driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)</b>
TP53	17	7578528	7578528	Missense_Mutation	A	T	MAMA_65	p.F134L	-
<b>TP53</b>	<b>17</b>	<b>7577094</b>	<b>7577094</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>G</b>	<b>A</b>	<b>MAMA_68</b>	<b>p.R282W</b>	<b>driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)</b>
<b>TP53</b>	<b>17</b>	<b>7578271</b>	<b>7578271</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>T</b>	<b>C</b>	<b>MAMA_79</b>	<b>p.H193R</b>	<b>driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)</b>
<b>TP53</b>	<b>17</b>	<b>7577120</b>	<b>7577120</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>C</b>	<b>T</b>	<b>MAMA_88</b>	<b>p.R273H</b>	<b>driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)</b>
TP53	17	7577570	7577570	Missense_Mutation	C	T	MAMA_91	p.M237I	-
<b>TP53</b>	<b>17</b>	<b>7578191</b>	<b>7578191</b>	<b>Missense_Mutation</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>MAMA_98</b>	<b>p.Y220H</b>	<b>driver (boostDM: non-tissue-specific model; predicted; LoF)</b>