

Amanda Aparecida Splendor Solera

“Avaliação do perfil de alterações germinativas em mulheres com câncer de mama triplo negativo com ausência de variantes patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*”.

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. Edenir Inêz Palmero
Co- Orientador: Dr. Cristiano de Pádua Souza

Barretos, SP

2022

Amanda Aparecida Splendor Solera

“Avaliação do perfil de alterações germinativas em mulheres com câncer de mama triplo negativo com ausência de variantes patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*”.

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. Edenir Inêz Palmero
Co- Orientador: Dr. Cristiano de Pádua Souza

Barretos, SP

2022

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito de financiamento do Departamento de Ciência e Tecnologia (DECIT), através do estudo clínico NACATRINE.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão das instituições citadas.

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DOS PESQUISADORES

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.

Dedico esse trabalho primeiramente à Deus. Aos meus orientadores Dra. Edenir e Dr. Cristiano, que me deram a oportunidade e todo suporte necessário para que esse estudo acontecesse. À minha mãe e ao Rodrigo que sempre me apoiaram em tudo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua infinita bondade comigo.

À Dra. Edenir, a minha imensa gratidão pela oportunidade de fazer parte de seu grupo, na qual, o seu amor pela pesquisa em câncer hereditário fez com que me apaixonasse cada vez mais por essa linha de pesquisa e pelo meu projeto de mestrado. Agradeço por todo conhecimento compartilhado, todo tempo dedicado, toda paciência e por se fazer tão presente mesmo estando a quilômetros de distância.

Ao Dr. Cristiano, pela oportunidade de participar do projeto NACATRINE, por toda sua dedicação, por todo conhecimento compartilhado nesses dois anos de mestrado.

Ao Centro de Diagnóstico Molecular do Hospital de Amor de Barretos em especial à Oncogenética. À Me. Gabriela Fernandes, Me. André Escremim e Me. Cristina Sábado, por todo o empenho em me ajudar e auxiliar no preparo das primeiras bibliotecas do sequenciamento de nova geração. Agradeço por todo o apoio, assistência e todo conhecimento compartilhado nesses anos.

Às minhas acessoras interna e externa Dra. Ana Carolina de Carvalho Peters e Dra. Maria Nirvana Formiga, por todas as sugestões durante as bancas, que foram de extrema importância para o enriquecimento desse trabalho.

À pós-graduação do Hospital de Amor de Barretos por toda a colaboração durante o mestrado.

Ao Instituto de ensino e pesquisa pelo incentivo à pesquisa.

Aos Meus colegas de laboratório principalmente ao nosso grupo de pesquisa a Me. Cintia, Me. Ariane, Me. Kericy, por compartilharem suas experiências com técnicas laboratoriais, na qual, foram importantíssimas para a realização desse trabalho.

Ao Me. Felipe, não tenho como agradecer toda ajuda que me forneceu nesses dois anos, estava sempre de prontidão para tirar dúvidas. Agradeço também a todos os sábios conselhos fornecidos, foram de grande valia para meu crescimento pessoal e profissional.

À Dra. Edilene e a Me. Thais Couto Laureano pelo suporte nas análises de bioinformática.

A todos os biólogos do CPOM.

À Caroline Lourenço da Conceição, à Lívia Macedo Tavares e a Taís Vaz do NAP (Núcleo de Apoio ao pesquisador) de Barretos que me ajudou nas coletas dos dados, e à Joyce Ramos de Almeida do NAP de Jales que me ajudou com as coletas dos dados daquele local.

Ao NEB (Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística) que me auxiliou em todas as análises estatísticas realizadas nesse estudo.

Aos clínicos do Ambulatório, na qual, foram de extrema importância no recrutamento das pacientes.

Às pacientes desse estudo, pois, sem elas nada seria possível.

E por último, porém, não menos importante, à minha mãe que esteve presente em todos os momentos e ao Rodrigo por me apoiar, me aconselhar, me auxiliar e me suportar nos momentos bons e ruins da minha vida profissional e pessoal.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 CÂNCER DE MAMA – EPIDEMIOLOGIA	1
1.2 CÂNCER DE MAMA – ASPECTOS GERAIS	3
1.3 CÂNCER DE MAMA – FATORES DE RISCO, SUBTIPOS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	5
1.4 CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO	7
1.5 CÂNCER DE MAMA E AS VIAS DE REPARO DE DANOS AO DNA	10
1.6 CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO (CMTN) – SUBTIPOS, FATORES DE RISCO, PROGNÓSTICO E TERAPÊUTICA	13
1.6.1 SUBTIPOS DE CMTN	13
1.6.2 FATORES DE RISCO	14
1.6.3 PROGNÓSTICO E TERAPÊUTICA	16
1.7 ANCESTRALIDADE E CÂNCER DE MAMA	19
1.8 NACATRINE	20
2. JUSTIFICATIVA	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVO GERAL:	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	23
4. METODOLOGIA	24
4.1 PACIENTES	25
4.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	25
4.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO	25
4.2 ANÁLISES MOLECULARES	26
4.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA	26
4.2.2. SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)	26
4.2.2.1 PREPARO DA BIBLIOTECA	27
4.2.2.2 ANÁLISES DE QUALIDADE	28
4.2.2.3 SEQUENCIAMENTO	29
4.2.2.4 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA	29
4.2.2.5 ANÁLISES DE VARIANTES	29
4.2.3 ANOTAÇÃO DAS VARIANTES	32
4.2.3.1 ANNOVAR (<i>ANNOTATED VARIATION</i>)	32
4.2.4 BANCOS DE DADOS	32
4.2.4.1 BANCOS DE DADOS DE FREQUÊNCIAS POPULACIONAIS	32
4.2.4.1.1 AbraOM (ARQUIVO BRASILEIRO ONLINE DE MUTAÇÕES)	32
4.2.4.1.2 GnomAD (<i>GENOME AGGREGATION DATABASE</i>)	33

4.2.5 BANCOS DE DADOS COM VARIANTES CLINICAMENTE RELEVANTES	33
4.2.5.1 CLINVAR	33
4.2.6 FERRAMENTAS DE PREDIÇÃO <i>IN SILICO</i>	34
4.2.6.1 REVEL (<i>RARE EXOME VARIANT ENSEMBLE LEARNER</i>).....	34
4.2.6.2 MCAP (<i>MENDELIAN CLINICALLY APPLICABLE PATHOGENICITY</i>)	34
4.2.6.3 EIGEN	34
4.2.6.4 GENOCANYON	35
4.2.6.5 HSF (<i>HUMAN SPLICING FINDER</i>).....	35
4.2.7 INSPEÇÃO MANUAL DAS VARIANTES	35
4.3 CRITÉRIOS DA ACMG (<i>AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS AND GENOMICS</i>)	36
5. CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS – SEQUENCIAMENTO CONVENCIONAL.....	41
6. ANCESTRALIDADE	42
7. ANÁLISES ESTÁTISTICAS	42
8. ASPECTOS ÉTICOS	43
9. RESULTADOS	43
9.1 ANÁLISES MOLECULARES	45
9.2 HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	54
9.3 ANÁLISES DE ANCESTRALIDADE.....	57
9.4 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DA CASUÍSTICA E CORRELAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS COM O PERFIL MUTACIONAL	63
9.5 ANÁLISES CLÍNICAS: CORRELAÇÃO DAS VARIANTES ENCONTRADAS COM A RPC E TRATAMENTO	65
9.6 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA GLOBAL E SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA.....	67
10. DISCUSSÃO.....	70
11. CONCLUSÃO	83
12. REFERÊNCIAS	86
ANEXO 1: VARIÁVEIS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS.....	107
ANEXO 2: PORCENTAGENS DE COBERTURAS DE 30X, 50X, 100X E COBERTURA MÉDIA DAS AMOSTRAS.	111
ANEXO 3: HEREDOGRAMAS DAS PACIENTES COM VARIANTES PROVAVELMENTE PATOGÊNICAS E PATOGENICAS.	117
ANEXO 4: VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO INCERTO (VUS).....	143
ANEXO 5: HISTÓRIA FAMILIAR DAS PACIENTES INCLUÍDAS NO PROJETO DE MESTRADO.....	153
ANEXO 6: LISTA DE PRIMERS SINTETIZADOS PARA A CONFIRMAÇÃO DAS VARIANTES, PROTOCOLO E CLICAGENS PARA O SEQUENCIAMENTO	159
ANEXO 7: ELETROFEROGRAMAS DO SEQUENCIAMENTO DE SANGER.....	162

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1: Taxa de incidência dos dez principais cânceres do mundo.

Figura 2: Os dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020.

Figura 3: Representação espacial das regiões do Brasil, para o câncer de mama feminino estimado para o ano de 2020.

Figura 4: *Hallmarks* do câncer.

Figura 5: Via de recombinação homóloga.

Figura 6: Deficiência de recombinação homóloga em câncer de mama triplo negativo.

Figura 7: Danos causados ao DNA por agentes de platina.

Figura 8: Fluxograma do estudo clínico NACATRINE.

Figura 9: Fluxograma geral das etapas realizadas no projeto de mestrado.

Figura 10: Fluxograma do preparo da biblioteca para sequenciamento.

Figura 11: Fluxograma de análise e classificação das variantes.

Figura 12: *Consort* de inclusões e exclusões do projeto de mestrado.

Figura 13: Proporção das ancestralidades analisadas na população de estudo.

Figura 14: Análise de sobrevida global em relação a ancestralidade africana.

Figura 15: Análise de sobrevida global em relação a ancestralidade Europeia.

Figura 16: Análise de sobrevida global em relação a ancestralidade ameríndia.

Figura 17: Análise de sobrevida global em relação a ancestralidade asiática.

Figura 18: Curva de sobrevida Global em relação ao tratamento.

Figura 19: Curva de sobrevida livre de doença em relação ao tratamento.

Figura 20: Curvas de SG e SLD das 126 pacientes analisadas molecularmente em relação ao seu perfil mutacional.

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Características e frequência de acometimento dos subtipos conhecidos de câncer de mama.

Tabela 2: Risco relativo das variantes patogênicas dos genes relacionados ao câncer de mama.

Tabela 3: Painel Gênico (*Inherited disease Panel, Qiagen*).

Tabela 4: Etapas da revisão manual das variantes raras encontradas no sequenciamento.

Tabela 5: *Evidência de patogenicidade utilizadas na classificação das variantes.* (Retirado e traduzido de Richards e colaboradores,2015).

Tabela 6: *Evidências de impacto benigno preconizados na classificação das variantes.* (Retirado e traduzido de Richards e colaboradores,2015).

Tabela 7: Caracterização clínica das pacientes molecularmente analisadas.

Tabela 8: Variantes provavelmente patogênicas (IV) e patogênicas (V).

Tabela 9: Variantes Classe III (VUS) com alto VAF e alto escore de REVEL.

Tabela 10: Variantes Patogênicas e patogênicas e as histórias familiares de suas portadoras.

Tabela 11: Correlação da ancestralidade africana com variáveis clínicas.

Tabela 12: Correlação da ancestralidade europeia com variáveis clínicas.

Tabela 13: Correlação da ancestralidade asiática com variáveis clínicas.

Tabela 14: Correlação da ancestralidade ameríndia com variáveis clínicas.

Tabela 15: Correlação de variáveis clínicas com a presença ou não de variantes patogênicas germinativas não *BRCA1/2*.

Tabela 16: Correlação de variáveis clínicas com a presença ou não de variantes patogênicas não *BRCA1/2*.

Tabela 17: Taxa de Rpc de acordo com o status de mutação germinativa não *BRCA1/2* e braço de tratamento.

Tabela 18: Comparação da Taxa de Rpc por braço de tratamento e status de mutação.

LISTA DE ABREVIÇÕES:

AbraOM – Arquivo Brasileiro Online de Mutações

ACMG[#] – American College of Medical Genetics and Genomics

BER[#] - Base Excision Repair

BLIS[#] – Basal-Like Immune Supressed

CMTN – Câncer de Mama Triplo Negativo

DNA[#] – Deoxyribonuclei Acid

DRH – Deficiência de Recombinação Homóloga

gnomAD[#] – Genome Aggregation Database

HAB – Hospital de Amor de Barretos

HBOC[#] – Hereditary Breast and Ovarian Cancer

HER2[#] – Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

HNPCC[#] - Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer

HSF[#] – Human Splincing Finder

IM[#] – Immunomodulatory

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LAR[#] – Luminal Androgen Receptor

MCAP[#] – Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity

MES[#] – Mesenchymal-Like

MMR[#] – Mismatch Repair

NER[#] – Nucleotide Excision Repair

NGS[#] – Next Generation Sequence

NHEJ[#] – Non-Homologous End-Joining

PCNA[#] - Proliferation Cell Nuclear Antigen

PCR[#] – Polymerase Chain Reaction

RE – Receptor de Estrogênio

REVEL[#] – Rare Exome Variant Ensemble Learner

RH – Recombinação Homóloga

RP – Receptor de Progesterona

Rpc – Resposta Patológica Completa

SG- Sobrevida Global

SLD – Sobrevida Livre de Doença

TN – Triplo Negativo

UMI[#] – Unique Molecular Index

VUS[#] – Variants of Uncertain Significance

WT[#] – Wild Type

[#] Do Inglês

RESUMO

Justificativa: Do total de casos de câncer de mama triplo negativo (CMTN), cerca de 15% apresentam variantes germinativas patogênicas nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*. Além disso, aproximadamente 60% dos CMTNs apresentam deficiência na via de recombinação homóloga, apesar de apresentarem os genes *BRCA1/BRCA2* funcionais. Considerando o pior prognóstico dos CMTN, é de extrema importância realizar a caracterização desses tumores tanto para direcionar pacientes e famílias a um acompanhamento adequado ao seu risco de câncer, quanto para encontrar um biomarcador que possa ser utilizado em estratégias terapêuticas personalizadas. **Objetivo:** Avaliar o perfil e a frequência de alterações germinativas em mulheres com câncer de mama triplo negativo com ausência de variantes germinativas patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, além de realizar uma caracterização clínica e do perfil ancestral das pacientes avaliadas. **Materiais e Métodos:** O presente estudo está inserido no contexto de um estudo clínico fase II, prospectivo, que avalia a resposta ao tratamento padrão de antraciclinas e taxanos com a adição ou não de carboplatina de pacientes com CMTN, intitulado NACATRINE. Foram incluídas no presente projeto de mestrado, 126 pacientes do sexo feminino com CMTN estádios II e III, WT (*Wild type*) para os genes *BRCA1* e *BRCA2*. A avaliação do perfil mutacional deu-se através do sequenciamento de um painel gênico constituído por 298 genes (Painel comercial *Inherited Disease Panel - Qiagen*). O sequenciamento foi feito a partir de DNA constitutivo (extraído de sangue periférico) na plataforma MiSeq (Illumina). A análise bioinformática dos dados foi feita com auxílio do software CLC v. 20.02, as variantes foram anotadas através do software ANNOVAR e classificadas com base nos critérios preconizados pelo *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*. **Resultados:** Dentre as pacientes avaliadas a mediana da idade ao diagnóstico foi 46 anos, com a maioria apresentando grau histológico III e estadiamento inicial IIb. Cento e vinte e seis pacientes tiveram seus dados de sequenciamento analisados. Dentre as variantes identificadas, 149 foram classificadas como VUS e 27 classificadas como IV ou V. Dentre os genes com variantes IV e V destacam-se genes envolvidos em síndromes hereditárias conhecidas, tais como *TP53*, *MLH1*, *PMS2*, *MUTYH*, *CDKN2A*, *PALB2* e *RAD51C*; genes associados a Anemia de Fanconi *FANCA*, *FANCD2* e *FANCE*, além de outros genes como *WRN*, *SBDS*, *NTRK1*, *CYLD* e *ALK*. No que se refere ao perfil ancestral, a maioria das pacientes apresentou maiores

proporções de ancestralidade europeia (57,99%), seguida de ancestralidade africana (22,75%), ameríndia (9,92%) e asiática (9,31%). Observamos associação entre uma maior sobrevida e ancestralidade asiática e entre as pacientes com ancestralidade ameríndia e o grau histológico do tumor. No que se refere à associação entre a presença de variantes potencialmente patogênicas e o tratamento quimioterápico padrão e experimental com a adição da carboplatina, não foi identificada nenhuma associação estatisticamente significativa. **Conclusão:** A análise da presença de variantes germinativas patogênicas em outros genes além de *BRCA1* e *BRCA2* é extremamente importante nos pacientes com câncer de mama triplo negativo, dado representarem uma proporção considerável dos casos de câncer de mama hereditário, tendo assim implicações, tanto no contexto de prevenção e prognóstico quanto até mesmo se tornar um alvo terapêutico.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer Hereditário, Câncer de mama triplo negativo, ensaio clínico, carboplatina, painel gênico, variantes patogênicas.

ABSTRACT

Background: Among cases of triple negative breast cancer (TNBC), approximately 15% are germline pathogenic variants in the *BRCA1* or *BRCA2* genes. In addition, approximately 60% of TNBC present homologous recombination deficiency even though having functional *BRCA1/BRCA2* genes. Considering the worse prognosis of TNBC, it is extremely important to carry out the characterization of these tumors to direct patients and families to appropriate follow-up to their cancer risk and to find a biomarker that can be used in personalized therapeutic strategies. **AIM:** To evaluate the profile and frequency of germline alterations in women with triple negative breast cancer with an absence of pathogenic germline variants in the *BRCA1* and *BRCA2* genes, in addition to performing a clinical and ancestral profile characterization of the evaluated patients. **MATERIAL AND METHODS:** The present study is a part of a prospective phase II clinical study that evaluates the response to standard treatment of anthracyclines and taxanes with or without the addition of Carboplatin in patients with TNBC, entitled NACATRINE. We included in this master's project 126 female patients with TNBC in stages II/III, WT for *BRCA1* and *BRCA2* genes. The mutational profile was evaluated through the sequencing of a gene panel consisting of 298 genes (Commercial Panel Inherited Disease Panel -Qiagen). The sequencing was performed using constitutive DNA (extracted from peripheral blood) on MiSeq platform (Illumina). The bioinformatic analysis of the data was performed with the help of the CLC software v.20.02. Variants were annotated using the ANNOVAR software and classified based on the criteria recommended by the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). **RESULTS:** Among the patients evaluated, the median age at diagnosis was 46 years, the majority presenting histological grade III and initial stage IIb. One hundred and twenty-six patients had their sequencing data analyzed. Among the variants identified, 149 were classified as VUS and 27 classified as IV and V. From the genes with variants IV and V, genes involved in known hereditary syndromes stand out, such as *TP53*, *MLH1*, *PMS2*, *MUTYH*, *CDKN2A*, *PALB2*, and *RAD51C*, genes associated with Fanconi anemia *FANCA*, *FAND2* and *FANCE*; and other genes such as *WRN*, *SBDS*, *NTRK1*, *CYLD* and *ALK*. Regarding to the ancestral profile the majority of patients had higher proportions of European ancestry (57,99%), followed by African (22,75%), Native American (9,92%) and Asian (9,31%). We observed an association between greater survival and Asian ancestry and between patients with Native American ancestry and histological grade of the tumor.

Regarding the association between the presence of potentially pathogenic variants and standard and experimental chemotherapy treatment with the addition of carboplatin, no statistically significant association was identified. **CONCLUSIONS:** The analysis of the presence of pathogenic germline variants in genes other than *BRCA1* and *BRCA2* is extremely important in patients with triple negative breast cancer, as they represent a considerable proportion of case of hereditary breast cancer, thus having implications both in the context of prevention and prognosis as to even becoming a therapeutic target.

KEYWORDS: Hereditary Cancer, Triple Negative Breast Cancer, Clinical Trial, Carboplatin, Gene Panel, Pathogenic Variants.

1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA – EPIDEMIOLOGIA

O câncer de mama foi o mais incidente no mundo na população feminina (figura 1) e em 2020 a quinta maior causa de morte por câncer em mulheres, ultrapassando o câncer de pulmão. Constatando assim que, a cada quatro casos de câncer em mulheres um é câncer de mama, e, a cada seis óbitos por câncer, um é devido ao câncer de mama¹.

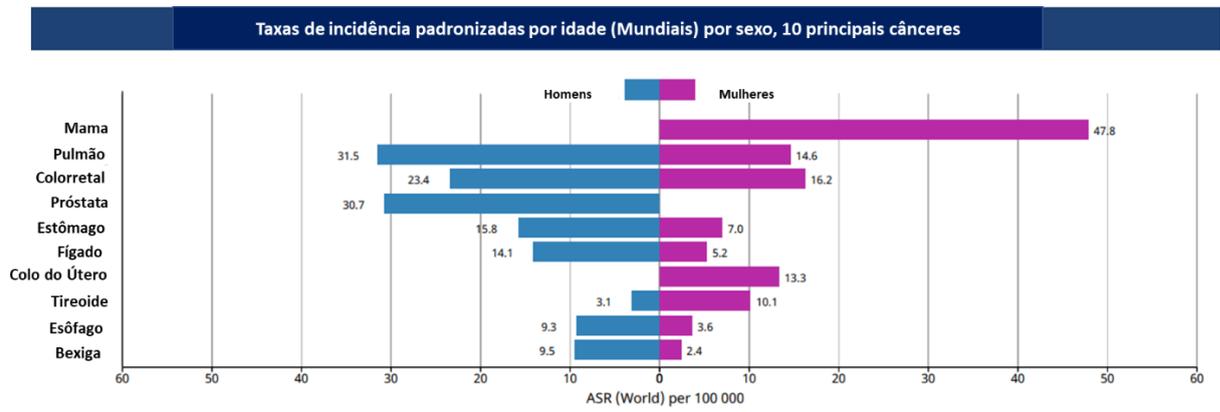


Figura 1: Taxa de incidência dos dez principais cânceres do mundo¹.

No Brasil são esperados, para o triênio 2020 – 2022, 625 mil novos casos de câncer, sendo 66.280 mil mulheres recém diagnosticadas com câncer de mama a cada ano, excluindo os tumores de pele não melanoma. Pode-se observar na figura 2, que o câncer de mama é o mais incidente, seguido do câncer colorretal e colo de útero, sendo, esses três tumores correspondentes a 50% de todos os cânceres que acometem a população feminina. E o câncer de mama, de forma isolada, responsável por 30% de todos os casos ².

	Localização Primária	Casos	%
 Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
	Cólon e reto	20.470	9,2%
	Colo do útero	16.590	7,4%
	Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
	Glândula tireoide	11.950	5,4%
	Estômago	7.870	3,5%
	Ovário	6.650	3,0%
	Corpo do útero	6.540	2,9%
	Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
	Sistema nervoso central	5.220	2,3%

Figura 2: Os dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020. Adaptado de Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil².

Em estimativa realizada pelo INCA em 2020, os autores relataram que o câncer de mama

feminina apresentou altas taxas de incidência em todas as regiões do país. Ao realizar a distribuição de incidência pelas regiões, pode-se perceber que o sudeste apresentou a maior taxa de incidência de câncer de mama do país com 32,5%, seguida da região sul com 28%. Logo após, encontra-se a região nordeste com 27,3%, a região centro-oeste apresenta 26,3% de taxa de incidência e a região norte apresenta a menor taxa de incidência de câncer de mama com apenas 21%. Essa porcentagem pode ser explicada, devido a taxa de incidência do câncer de colo de útero ser semelhante ao câncer de mama na região norte do país².

Na figura 3, observa-se a distribuição espacial da incidência do câncer de mama feminino em 2020, enfatizando cada região do país.

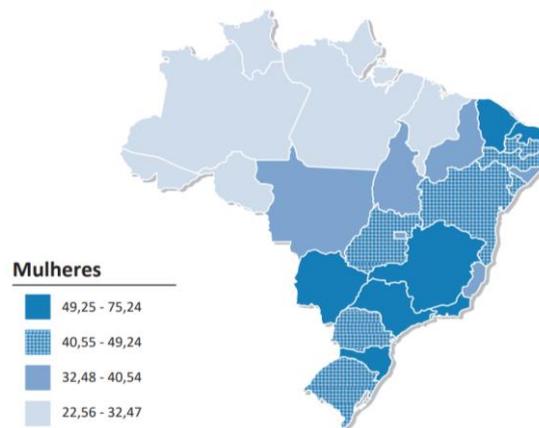


Figura 3: Representação espacial das regiões do Brasil, para o câncer de mama feminino estimado para o ano de 2020.

No que se refere a incidência de câncer de mama, é importante demonstrar os dados provenientes do Hospital de Amor de Barretos (HAB) (previamente conhecido como Hospital de câncer de Barretos), centro de referência na prevenção e tratamento do câncer. Pudemos observar que o registro de novos casos de câncer de mama nos anos 2015 (1.114), 2016 (1.131), 2017 (1.336) apresentou ínfimo aumento, contudo no ano de 2018 notou-se a queda desses números para 935 novos casos no ano. Em 2019, foram admitidos no HAB 819 casos de câncer de mama, sendo 3 em homens e 816 em mulheres. Do total de pacientes admitidos em 2019, 53% possuía faixa etária entre 40 e 59 anos e 74% eram residentes da região sudeste do Brasil³. Contudo, essa queda se deve ao fato que, os pacientes passaram a ter acesso a outros centros oncológicos, em outras cidades e regiões do estado, logo, um número menor de pacientes passaram a ser admitidos nesse centro de diagnóstico de câncer.

1.2 CÂNCER DE MAMA – ASPECTOS GERAIS

O câncer é uma doença genética que ocorre devido a alterações nos genes que regulam o funcionamento das células. A carcinogênese resulta de múltiplas etapas e pode envolver dezenas, ou até centenas de genes. Dentre os fatores causais destacam-se as mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos, sendo os principais grupos de genes envolvidos nesse processo os proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes relacionados ao reparo do DNA⁴.

O processo de carcinogênese inicia-se quando células normais adquirem características e habilidades, que as tornam capazes de transformá-las em células malignas. Hanahan e Weinberg em estudo publicado em 2000, propuseram seis características conhecidas como *hallmarks* do câncer, os quais envolvem o processo de carcinogênese e fornecem hipóteses que explicam a grande heterogeneidade presente nas doenças neoplásicas⁵.

Os *hallmarks* descritos são: sinalização proliferativa permanente, insensibilidade a supressores de crescimento, capacidade replicativa ilimitada, ativação de invasão e metástase, indução da angiogênese, resistência à morte celular. Esses *hallmarks* constituem-se, segundo os autores, os motivos pelos quais as células normais não respondem aos estímulos internos, tanto para interromper a proliferação celular quanto para se submeterem a apoptose, tornando-se assim, células tumorigênicas⁵.

Em atualização publicada em 2011, Hanahan e Weinberg, apresentaram quatro funções adicionais aos seis *hallmarks* previamente descritos, que podem ser adquiridas durante o processo de carcinogênese (Figura 4). Essas funções foram desmembradas em duas categorias, a primeira categoria nomeada por suas características capacitadoras, sendo a instabilidade genômica (caracterizada pelo acúmulo de alterações gênicas e genômicas), e os processos inflamatórios, que comprometem os mecanismos de reparo ao DNA, levando à instabilidade genômica. Esses processos iniciam-se por mutações somáticas causadas por agentes intrínsecos (ROS - *Reactive oxygen species*, liberação de citocinas) e extrínsecos^{5, 6}.

A segunda categoria, foi nomeada de funções emergentes e caracteriza-se pela reprogramação no metabolismo e energia celular, ajuda na proliferação e substitui programas metabólicos que atuam em células normais. A outra característica é atribuída ao sistema imunológico e a capacidade das células cancerígenas de se evadirem do sistema imune⁵.

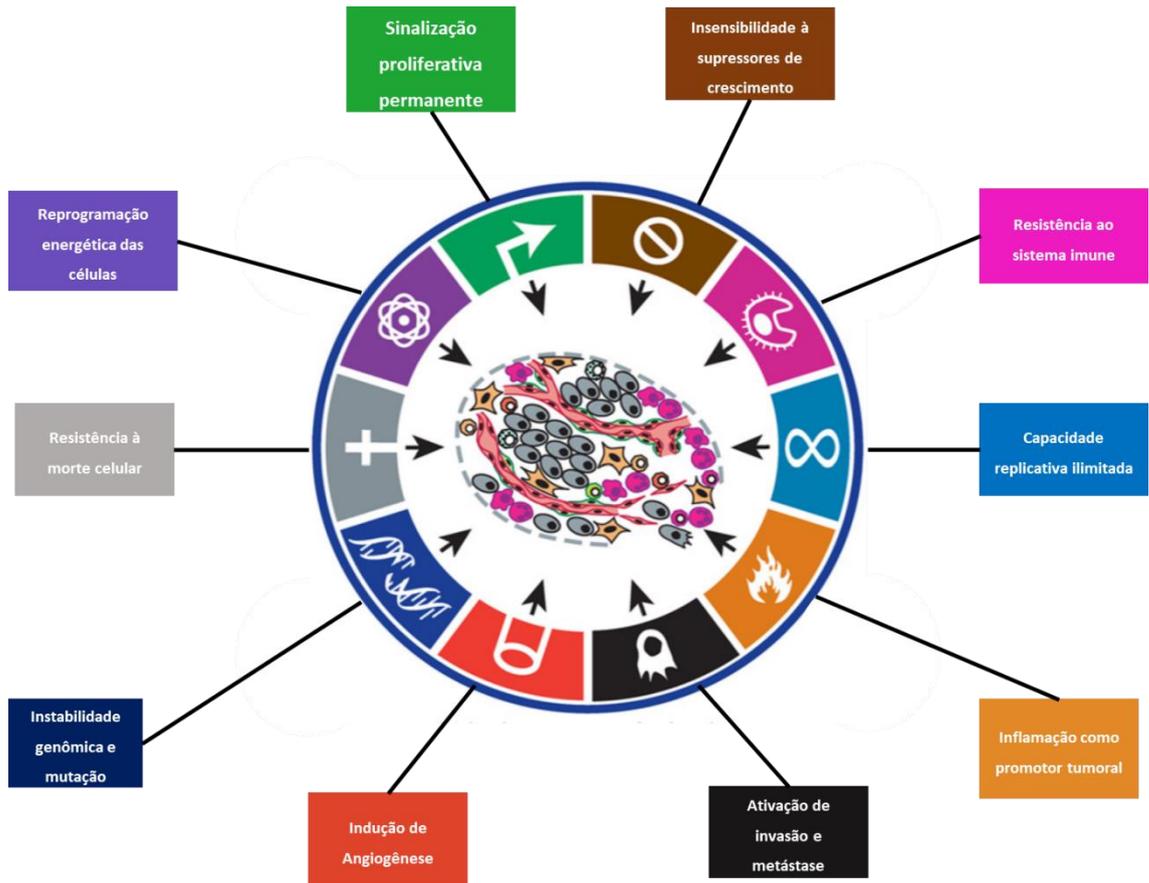


Figura 4: *Hallmarks* do câncer⁵. Adaptada de Hanahan e Weinberg 2011.

A instabilidade genômica é um dos *hallmarks* do câncer e pode surgir por alterações nos cromossomos, alterações no número de cópias, presença de variantes patogênicas ou até mesmo um conjunto de todos os três eventos anteriores⁷.

A importância da instabilidade genômica na carcinogênese já se encontra bem estabelecida no contexto das síndromes hereditárias, levando a um aumento no risco do desenvolvimento do câncer⁸. Dentre as diversas síndromes associadas à instabilidade genômica e causadas pela presença de variantes patogênicas em genes de reparo destacam-se a Síndrome de Lynch e a Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Ovário (HBOC – *Hereditary breast and ovarian cancer*). Considera-se que essas síndromes hereditárias são responsáveis por 3 – 5% dos cânceres de cólon e 5 – 7% dos cânceres de mama e ovário⁷.

Hanahan em 2022, publicou uma atualização sobre os *hallmarks* do câncer, na qual, o autor apresenta possíveis *hallmarks* e características facilitadoras que podem ser incorporadas como os componentes principais dos *hallmarks* do câncer. Sendo eles: desbloqueio da plasticidade fenotípica, dividida em: desdiferenciação (célula normal que

avançou por uma via e assumiu um estado pode reverter seu curso), diferenciação bloqueada, transdiferenciação (células normais que levaram sua diferenciação até o estágio final, pode causar um curto-circuito, mantém a expansão das células cancerosas parcialmente diferenciado, contudo, semelhante ao progenitor). Reprogramação epigenética não mutacional, microbiomas polimórficos e células senescentes⁹.

1.3 CÂNCER DE MAMA – FATORES DE RISCO, SUBTIPOS, DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Uma ampla gama de fatores de risco genéticos e não genéticos podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de mama¹⁰. Entre eles estão: idade da menarca, presença de câncer de mama e/ou ovário na família, o uso de contraceptivos por tempo prolongado, menopausa tardia e menarca precoce, uso de terapia de reposição hormonal, nuliparidade ou gravidez tardia¹¹. Estima-se que cerca de 20% dos cânceres de mama estão relacionados com fatores de riscos modificáveis, como a obesidade, o sedentarismo e o uso de álcool, sendo que, na ausência desses fatores, há uma diminuição no risco do desenvolvimento do câncer¹².

Na prática clínica utiliza-se cinco subtipos moleculares para classificar o câncer de mama, tendo como base a histologia e a expressão imunohistoquímica de algumas proteínas importantes, como receptores de estrogênio (RE), receptores de progesterona (RP) e o fator de crescimento epidermal 2 (HER2), assim como, o marcador de proliferação ki67¹². Os cinco subtipos são: Luminal A, Luminal B, Luminal B HER2 superexpresso, HER2 superexpresso e Triplo Negativo (TN)¹³⁻¹⁵. A tabela 1 apresenta algumas características importantes, como a expressão dos receptores hormonais e os genes comumente mutados em cada subtipo tumoral, assim como, a frequência de acometimento de cada subtipo de câncer de mama.

Tabela 1: Características e frequência de acometimento dos subtipos conhecidos de câncer de mama^{12, 16-22}.

Subtipos Tumorais	Características	Frequência de acometimento
Luminal A	Expressão de RE e/ou RP, baixa expressão de Ki67 Baixa taxa mutacional, possuem espectro diverso e os genes comumente mutados são: <i>PIK3CA</i> , <i>GATA3</i> ,	

	<i>MAP3K1</i> . São tumores diploides e apresentam aberrações afetando todos os cromossomos, incluindo ganhos de 5, 8, 1q e perda de 18 e 16q16, apresentando expressão da ciclina D1.	60 – 70%
Luminal B	Baixo grau de expressão de RE e RP (< 20%) e altas taxas de proliferação (ki67 > 14%). Demonstram aneuploidia, mutações frequentes nos genes <i>TP53</i> e <i>PI3KCA</i> e alterações que afetam as vias do retinoblastoma e MAPK.	10 – 20%
Luminal B HER2 Positivo	Apresentam expressão de RE e RP menor do que os tumores luminais A e o HER2 positivo; são tumores pleomórficos, possuem alto índice de Ki67 e respondem a terapias alvos para ERBB2.	
HER2 Positivo Não Luminal	Caracterizam-se pela superexpressão do receptor HER2, podendo os RE e RP serem negativos; apresentam expressão de genes associados à progressão do ciclo celular e também mutações nos genes <i>PIK3CA</i> , <i>GRB7</i> , <i>PPM1D</i> , <i>CCND1</i> .	13 – 15%
Triplo Negativo (TN)	Ausência de expressão de RE, RP e ERBB2 (HER2). Alta expressão de citoqueratinas basais (<i>CK 5/6</i> , <i>CK14</i> e <i>CK7</i>) e também do receptor do fator de crescimento epidérmico (<i>EGFR</i>), vimentinas e p-caderinas.	10 – 15%

No que se refere ao tratamento, os dois principais pilares para o manejo do câncer de mama são o tratamento locorregional e a terapia sistêmica. A histologia e as características moleculares do câncer de mama influenciam diretamente na decisão do tratamento¹².

A terapia locorregional consiste basicamente na retirada cirúrgica do tumor e no uso de radioterapia para controle local. Devido aos avanços das técnicas cirúrgicas (procedimentos oncoplásticos) e às abordagens multidisciplinares (terapia sistêmica primária), muito tem evoluído para conservar a mama²³.

Terapia sistêmica baseia-se no uso de quimioterápicos que podem ser utilizados de maneira neoadjuvante ou adjuvante²³. O método de terapia neoadjuvante (uso de

quimioterápicos antes da cirurgia) é utilizado principalmente em tumores maiores e mais avançados, como o câncer de mama triplo negativo (CMTN)¹².

1.4 CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO

Cerca de 5 – 10% dos cânceres de mama são hereditários. Os cânceres hereditários associam-se à presença de uma variante germinativa patogênica herdada, de maneira autossômica dominante, estando assim, presente em todas as células do indivíduo¹¹.

A grande maioria das síndromes hereditárias envolve a presença de alterações germinativas em genes classificados como supressores tumorais, os quais, seguem o modelo de perda de função, proposta em 1971 por Knudson (teoria de dois *Hits* de Knudson)²⁴. Essa proposta, teoriza que um indivíduo com predisposição de desenvolver câncer já possui um alelo mutado, contudo, essas variantes heterozigotas não são prejudiciais, pois, a função normal do gene é parcialmente compensada pelo alelo normal, mas se ocorrer a inativação do segundo alelo por alterações somáticas (agentes ambientais ou endógenos), ocorre a perda total de função do referido gene, levando ao processo de carcinogênese¹¹.

Portanto, comparados com cânceres esporádicos, que necessitam de dois eventos somáticos para inativarem ambos os alelos dos genes, portadores de variantes germinativas apresentam uma maior predisposição de desenvolver o câncer, pois, necessitam de apenas um evento para o início à carcinogênese¹¹.

A síndrome de predisposição ao câncer de mama e ovário hereditários (HBOC) é uma síndrome com padrão de herança autossômico dominante e destaca-se pela idade jovem ao diagnóstico dos tumores e por levar ao desenvolvimento de tumores síncronicos ou metacrônicos²⁵. Caracteriza-se, pela presença de história familiar positiva para tumores de mama e ovário, além de risco aumentado para outros tipos tumorais como pâncreas, próstata, melanoma e outros²⁵.

Essa síndrome é resultante, de variantes germinativas patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Porém, outros genes de alto e moderado risco associam-se ao fenótipo de HBOC. Variantes em genes de alto e moderado risco são responsáveis por 25% de todos os cânceres de mama hereditário, sendo que os genes *BRCA1* e *BRCA2* representam 25 – 28% desse grupo de variantes^{26, 27}.

A busca e identificação dos genes de susceptibilidade para câncer de mama hereditário teve início nos anos 90. Em 1994, Wiki e colaboradores publicaram um estudo com a identificação e localização do gene *BRCA1* no cromossomo 17q21. Em seguida, Wooster e colaboradores, em 1995, identificaram o gene *BRCA2*, que continha 27 éxons, sendo que 8 deles possuíam uma sequência repetida chamada de motivo BRC, o qual foi considerado o melhor domínio para interagir com o gene *RAD51*²⁸⁻³³.

Mulheres portadoras de variantes patogênicas em *BRCA1* possuem um risco cumulativo vital de 40-87% para o desenvolvimento do câncer de mama e de 16-68% para desenvolver câncer de ovário. Mulheres com variantes patogênicas em *BRCA2* apresentam um risco cumulativo vital de 27-84% para o câncer de mama e de 11-30% de desenvolver o câncer de ovário³⁴.

Embora os genes *BRCA1* e *BRCA2* sejam os genes mais associados ao câncer de mama hereditário, existem outros genes que também levam à predisposição ao câncer de mama hereditário. A presença de variantes germinativas patogênicas nos genes *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1* são, respectivamente, associados às Síndromes de Li-Fraumeni, Cowden, Peutz–Jeghers, e à Síndrome do Câncer Gástrico Difuso Hereditário e estão relacionadas a um aumento no risco cumulativo vital de desenvolver o câncer de mama. O risco cumulativo varia segundo a síndrome envolvida, tal como, mulheres que possuem Síndrome de Li-Fraumeni tem 50% de chance de desenvolver o câncer de mama até 30 anos, entretanto, esse risco aumenta para 90% em mulheres com 70 anos ou mais³⁵.

Mulheres com síndrome de Peutz–Jeghers possuem um risco cumulativo de 54% para o desenvolvimento do câncer de mama até os 65 anos. Pacientes com Síndrome de Cowden tem até 50% de chance de desenvolver o câncer de mama entre 38 a 46 anos. Mulheres com síndrome do câncer gástrico difuso hereditário apresentam risco de 39% de desenvolver carcinoma de mama até os 80 anos³⁵⁻³⁷.

Os avanços tecnológicos na biologia molecular estão correlacionados ao avanço no nosso conhecimento acerca de genes associados ao desenvolvimento do câncer de mama hereditário. Utilizam-se técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS), com o intuito de identificar genes adicionais associados ao câncer de mama hereditário¹⁰.

Um dos primeiros trabalhos utilizando painéis poligênicos foi publicado por Walsh e colaboradores em 2011. Nesse estudo foram incluídas 360 mulheres com tumores de ovário (281, sendo oito delas com tumores sincrônicos de endométrio), peritônio (48) ou tuba uterina

(31), submetidas à cirurgia primária. Todas foram avaliadas através de um painel poligênico com 21 genes. Do total, 24% eram portadoras de variantes germinativas patogênicas associadas à perda de função proteica, 18% nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e 6% em outros genes: *BARD1*, *BRIP1*, *CHEK2*, *MRE1 1A*, *MSH6*, *NBN*, *PALB2*, *RAD50*, *RAD51* ou *TP53*³⁸.

As análises em larga escala do DNA ajudam a identificar a frequência/prevalência de alterações germinativas patogênicas em genes de moderado e baixo risco, bem como em genes de alto risco, mas que não são classicamente associados à HBOC. A identificação de alterações germinativas em genes de moderado a baixo risco propicia descobertas de fenótipos e sobreposições de fenótipos inesperados, nos direcionando a uma prática clínica mais ampla.

Variantes em genes de alta e moderada penetrância contribuem para predisposição ao câncer, entre eles, *TP53*, *PTEN*, *CDH1*, *ATM*, *PALB2*, *RAD51* (nas isoformas C, D, B), contudo, essas variantes explicam aproximadamente 5% dos casos hereditários, considerando que variantes VUS (variantes de significado clínico desconhecido) são também encontradas nesses genes³⁹. Wendt e Margolin relataram em 2019, que cerca de 50% dos genes de suscetibilidade ao câncer de mama ainda são desconhecidos⁴⁰.

Os genes de predisposição ao câncer podem ser classificados quanto ao risco relativo que conferem de desenvolver câncer. As mutações nos genes considerados de alto risco estão associadas com um risco relativo superior a 5 vezes no desenvolvimento do câncer em relação a pacientes não portadoras destas variantes. Já os genes de risco moderado conferem um risco relativo na faixa entre 1,5 - 5 vezes. Por fim, variantes nos genes considerados de baixo risco, conferem um risco relativo abaixo de 1,5 vezes⁴¹.

A tabela 2 apresenta o risco relativo das variantes patogênicas de genes para o desenvolvimento de câncer de mama⁴²⁻⁴⁵

Tabela 2: Risco relativo das variantes patogênicas dos genes relacionados ao câncer de mama. (Adaptado de Harbeck e colaboradores, 2019)¹².

GENE	RISCO RELATIVO
<i>BRCA1</i>	11,4
<i>BRCA2</i>	11,7

TP53	10,5
PTEN	6,8
STK11	6,6
CDH1	6,6
PALB2	5,3
CHEK2	3,0
ATM	2,8
RAD51D	2,4
BRIP1	2,0
BARD1	1,8

1.5 O CÂNCER DE MAMA E AS VIAS DE REPARO DE DANOS AO DNA

A grande maioria dos genes associados ao câncer de mama hereditário, identificados até o momento, atuam no reparo de danos ao DNA.

As células sofrem danos ao DNA constantemente, por isso, apresentam um complexo e coordenado mecanismo de resposta de danos ao DNA, que abrange numerosas e independentes vias de sinalização. Essa resposta, ocorre principalmente para manter a viabilidade celular e prevenir contra possíveis neoplasias. Essa manutenção é feita através da regulação do ciclo celular, remodelação da cromatina, metabolismo e apoptose⁴⁶.

As principais vias de reparo incluem a via de reparo de excisão de base (BER; do inglês, *Base Excision Repair*), reparos de excisão de nucleotídeos (NER; do inglês, *Nucleotide Excision Repair*) e reparo de pareamentos errôneos (MMR; do inglês, *Mismatch Repair*). Essas vias são conhecidas por atuar no reparo de quebras de fita simples do DNA⁴⁴.

A via BER é empregada no reparo de pequenas lesões de base como oxidação, alquilação e desaminação. Esse mecanismo consiste no reconhecimento de danos ao DNA, a excisão de base (reparo curto) é feita por uma glicosilase de DNA para formar um localapurínico/apirimidinico (AP), em seguida a clivagem do local AP é feita pela endonuclease APE1, formando-se a quebra de fita simples. Após a formação da quebra de fita simples a primeira proteína ativada é o PARP1, que funciona como um sensor, recrutando assim, as

outras enzimas envolvidas no processo de reparo como o XRCC1. Por fim, a lacuna é preenchida pela DNA polimerase e o complexo XRCC1. A proteína LIG3 é responsável por selar a fita, ou alternativamente, quando dois a dez nucleotídeos são removidos (reparo longo), sintetiza-se uma nova cadeia através da DNA polimerase e a ligação é realizada pela LIG1⁴⁷.

A via de reparo NER é utilizada no reparo de nucleotídeos maiores como dímeros de timidina causados por luz ultravioleta e danos ao DNA acima de 30 pares de bases. São conhecidos dois mecanismos de detecção de danos ao DNA nessa via. Uma reconhece os danos em todo o genoma (GG-NER) e a outra reconhece danos apenas na fita transcrita (TC-NER) de genes ativos que causam o bloqueio da RNA polimerase II^{47, 48}.

No primeiro caso, a detecção é feita pelo complexo XPC (XPC, HR23B e CENT2), sendo a fita não-danificada protegida pelo PARP1. Na outra via de reparo NER, a prisão da RNA polimerase II é o sinal de partida que promove o recrutamento das proteínas da síndrome de Cockayne grupo A (ERCC8) e a proteína do grupo B (ERCC6). Após o reconhecimento, as duas vias necessitam do XPA que age como um sistema de organização de outros componentes da via. O complexo do fator de transcrição IIH (TIIH), primeiramente desenrola o DNA ao redor do dano através da atividade das helicases XPB e XPD. Por fim, o dano é removido pela proteína de excisão ERCC1-XPF e a endonuclease XPG, essa lacuna é então preenchida por uma DNA polimerase e pela atividade da DNA ligase XRCC1- LIG3 ou LIG1^{47, 48}.

Em relação às vias de reparo de danos de fita simples ao DNA, temos ainda a via MMR. Essa via é um sistema de reparo baseado em excisão envolvendo o reconhecimento de pareamentos errôneos, levando a excisão direcionada, corte e a síntese do DNA. O sistema MMR, diferentemente de NER e BER, não está associado ao reparo de danos ocasionado por agentes externos, mas aos erros ocorridos durante a duplicação do DNA. Essa via é essencial para corrigir pequenas inserções e deleções que ocorre em sequências repetidas conhecidas como microssatélites^{49, 50}. As proteínas centrais utilizadas nessa via são: MutS que formam dois heterodímeros MutS α (MSH2-MSH6) e MutS β (MSH2-MSH3) e as proteínas MutL que formam três heteodímeros MutL α (MLH1-PMS2), MutL β (MLH1-MLH3), MutL γ (MLH1-PMS1).

De forma resumida, o dímero MutS reconhece a base incompatível na fita filha e se liga ao DNA danificado, a MutL recruta a DNA helicase II para realizar a separação das duas fitas. Em seguida, a atividade da exonuclease (MLH1-PMS1) é ativado pelo grampo PCNA (*proliferation cell nuclear antigen*), que executa um corte no DNA, logo após o DNA é excisado pela EXO1 e por último, a polimerase δ sintetiza um novo fragmento de DNA, sendo, a LIG1

responsável pela a ligação da fita⁴⁷.

Outras importantes vias no reparo de danos ao DNA são as que atuam no reparo de danos que afetam ambas as fitas do DNA. Dentre elas destacam-se a via de reparo por recombinação homóloga (RH; do inglês, *Homologous Recombination*) e a junção de extremidade não homóloga (NHEJ, do inglês, *Non-Homologous End-Joining*), responsáveis por realizar o reparo de quebras de dupla fita de DNA.

A via de recombinação homóloga é um mecanismo de reparo ao DNA mais fidedigno. Destaca-se por ocorrer na fase tardia do ciclo celular (S/G2), e compreende, a geração de fita simples de DNA, seguida pela invasão de fita (junção de *holiday*), e por fim, pela síntese do novo DNA, usando como molde a fita de DNA do cromossomo homólogo⁴⁵. A via NHEJ realiza o reparo através da ligação direta das extremidades livres do DNA, e é somente utilizada nas fases G0/G1, pois exige que o reparo seja revisado durante o ciclo celular, tornando-se assim uma via menos precisa⁴⁹.

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* atuam, dentre outras funções, na resposta aos danos no DNA através da recombinação homóloga⁵¹.

A proteína BRCA1 associa-se com múltiplas proteínas de reparo e do ciclo celular e forma múltiplos complexos que contribuem para a manutenção da estabilidade cromossômica e supressão tumoral. BRCA1 é um substrato central da resposta de dano ao DNA, mediado por ATM e ATR que controlam as vias de respostas⁵². Quando as células possuem variantes patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, o reparo por recombinação homóloga fica deficitário e, dessa forma, a célula utiliza a via complementar de junção de extremidade não homóloga (NHEJ), que leva à acúmulos de erros ao DNA, instabilidade genômica e ao maior risco de doenças malignas⁵³.

O BRCA2 funciona como um regulador do RAD51, pois, é responsável por localizá-lo e levá-lo para as regiões com fita simples de DNA expostas (sendo esse processo também dependente do PALB2, localizador do BRCA2). Em seguida, o RAD51 liga-se ao DNA danificado 3', formando um filamento de nucleoproteínas, com proteínas mediadoras (BRCA2, RAD51C, RAD51D, XRCC2, PALB2) que iniciam a busca pela sequência do DNA molde e possuem a capacidade de invadir a dupla hélice em um trecho intacto e homólogo do DNA. As enzimas DNA polimerases utilizam a sequência homóloga como modelo e a fita simples do DNA como *primer* para realizar a síntese⁵³⁻⁵⁵.

A figura 5 ilustra a via de reparo de recombinação homóloga, que envolve não apenas

uma interação complexa e coordenada de BRCA1 e BRCA2, mas também de várias outras proteínas de reparo do DNA, como: ATM, BARD1, BRIP1, MRE11, RAD50, NSB1 (NBN), RAD51C, RAD51D e PALB2⁵³.

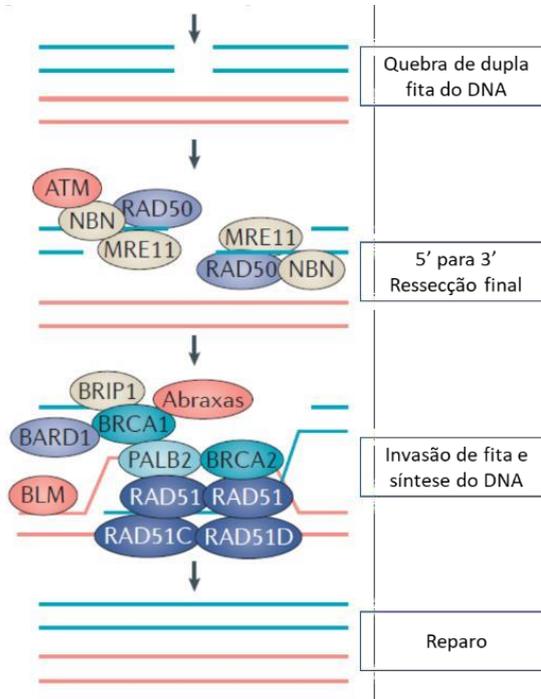


Figura 5: Via de recombinação homóloga⁵⁴. Adaptada de Nielsen e colaboradores 2016.

As proteínas BRCA1 e BRCA2 desenvolvem papéis importantes na via de recombinação homóloga e na predisposição hereditária ao câncer de mama. Porém, sabe-se que outros genes dessa mesma via também estão envolvidos na predisposição hereditária deste tumor⁵³. É conhecido que a família das proteínas RecA/RAD51 desempenha um papel central neste processo. A proteína RAD51 é uma das iniciadoras da RH⁵⁶.

1.6 CÂNCER DE MAMA TRIPLA NEGATIVO (CMTN) – SUBTIPOS, FATORES DE RISCO, PROGNÓSTICO E TERAPÊUTICA

1.6.1 SUBTIPOS DE CMTN

Em revisão publicada por Zhao e colaboradores em 2020, os autores mencionaram que o CMTN pode ser classificado de acordo com seu *status* de deficiência de recombinação homóloga (DRH) e conforme o transcriptoma desses tumores⁵⁷. Um estudo publicado por Jiang e colaboradores em 2019, classificou o CMTN em quatro subtipos principais: BLIS (*Basal – Like Immune suppressed*), IM (*Immunomodulatory*), MES (*Mesenchymal – Like*), LAR (*Luminal*

Androgen Receptor). Os tumores BLIS são responsáveis por 39% dos cânceres de mama triplo negativos e apresentam altos escores de DRH, 77% deles possuem variantes somáticas no gene *TP53* e alta instabilidade cromossômica. Caracterizam-se pela alta expressão de genes do ciclo celular, ativação do reparo do DNA e baixa regulação dos genes de resposta imune⁵⁸.

Os IM compreendem 24% dos CMTNs, caracterizam-se por possuírem um melhor prognóstico em relação aos outros subtipos de CMTN. Cerca de 81% dos tumores com este subtipo molecular apresentam variantes no gene *TP53*, além de se caracterizarem por alta sinalização de células imunológicas e alta expressão de genes que sinalizam citocinas^{57, 58}.

Os tumores LAR correspondem a 23% dos triplo negativos e apresentam pior prognóstico. São comumente encontrados em asiáticos e em pacientes idosos, e apresentam receptores positivos de andrógenos. Ainda, 61% apresentam variantes no gene *TP53* e, aproximadamente 70% são mutados na via *PIK3CA – AKT*^{57, 58}.

Os subtipos MES caracterizam-se pelo enriquecimento em *cancer stem cells*, apresentando um perfil mutacional semelhante aos tumores LAR e ativação da via *JAK – STAT3*, correspondendo à 15% dos CMTN^{57, 58}.

1.6.2 FATORES DE RISCO

Estudos epidemiológicos demonstram maior prevalência de tumores triplo negativos em mulheres jovens, afro-americanas e em população hispânica, bem como em pacientes portadoras de variantes patogênicas no gene *BRCA1*^{59, 60}. Um estudo publicado por Hahnen e colaboradores em 2017, sugeriu que a causa do câncer de mama triplo negativo pode estar associada com doenças hereditárias devido a idade precoce, característica significativa desse tipo tumoral. Neste estudo, os autores relataram que 110 de 291 pacientes (37,8%) apresentaram história familiar positiva de câncer⁶¹.

A associação do fenótipo triplo negativo com a presença de variantes patogênicas no gene *BRCA1* já é bem consolidada na literatura⁴⁵, sendo que dentre as mulheres com câncer de mama que apresentam variantes patogênicas no gene *BRCA1*, 70 – 90% desenvolvem o subtipo triplo negativo, enquanto que nas pacientes diagnosticadas com câncer de mama que possuem variantes germinativas patogênicas no gene *BRCA2* somente 16 – 23% desenvolvem o CMTN.

Sabe-se ainda que variantes patogênicas nesses genes representam apenas 15,4% das

variantes presentes no CMTN, sugerindo que outros fatores genéticos e outros genes além de *BRCA1* e *BRCA2* podem desempenhar um papel importante na etiologia do CMTN^{45, 62, 63}.

Estudos que avaliaram a relevância clínica da utilização de painéis gênicos contendo múltiplos genes de predisposição ao câncer de mama e as suas frequências, demonstraram que o câncer de mama triplo negativo é enriquecido com variantes nos genes da via de recombinação homóloga^{53, 64, 65}.

Lin e colaboradores, em 2016, analisaram 133 pacientes através de um painel gênico de 68 genes e observaram que 22,6% tinham variantes germinativas patogênicas: 9 em *BRCA1*, 11 em *BRCA2*, 2 em *RAD50*, 2 em *TP53* e 1 em cada um dos genes *ATM*, *BRIP1*, *FANCI*, *MSH2*, *MUTYH* e *RAD51C*. Concomitante a isso, os autores observaram que os cânceres de mama triplo negativos possuem a maior taxa de variantes germinativas (45%) em comparação com outros subtipos tumorais⁶⁴.

Couch e colaboradores em 2015, encontraram variantes em 14,6% de 1.824 pacientes com CMTN analisados, incluindo 8,5% em *BRCA1*, 2,7% em *BRCA2* e 3,7% em genes da via de recombinação homóloga (*PALB2*, *BARD1*, *RAD51C*, *RAD51D* e *BRIP1*)⁶⁵, esses resultados, demonstram a importância que a deficiência na via de recombinação homóloga tem em cânceres de mama triplo negativos⁶⁶.

Sabe-se que outros mecanismos como metilação, instabilidade ou atenuação da transcrição e até mesmo variantes somáticas/germinativas em outros genes comprometem o reparo fidedigno do DNA. Tumores com DRH apresentam similaridades fenotípicas e moleculares com os tumores *BRCA* – mutados, mesmo aqueles que apresentam os genes *BRCA1/2* – *wild type*, o que levou pesquisadores a hipotetizar que neoplasias que possuem deficiência na via de reparo ao DNA, podem apresentar uma alteração compartilhada de um subconjunto maior de CMTN¹⁹. Essas similaridades, resultam no fenótipo “*BRCAness*”, comumente conhecido por apresentar deficiência adquirida ou herdada na via de recombinação homóloga, a qual vem sendo amplamente utilizada para fins terapêuticos.

Sharma em 2018, reportou também que esses mecanismos biológicos acima citados podem influenciar na DRH e que o fenótipo “*BRCAness*” são encontrados em 50 – 60% de todos os cânceres de mama triplo negativos (Figura 6), expandindo assim o tratamento com agentes de platina e inibidores de PARP, tanto para tumores *BRCA*-mutados, quanto para tumores com *BRCA* – *Wild type*¹⁹.

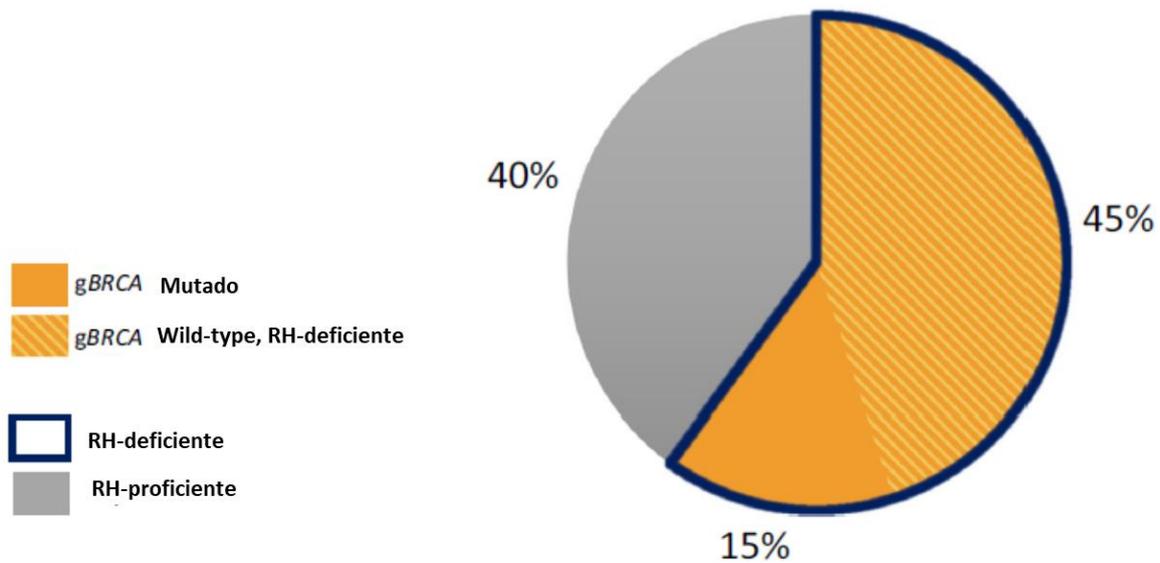


Figura 6: Deficiência de recombinação homóloga em câncer de mama triplo negativo¹⁹.

Uma das estratégias empregadas para a identificação de tumores com alteração na via de reparo por recombinação homóloga é um ensaio que avalia a perda da heterozigose do genoma tumoral (LOH – *Loss of heterozygosity*), desequilíbrio alélico e telomérico (TAI – *Telomeric allelic imbalance*) e transição de estado em larga escala (LST – *Large Scale State Transition*) a qual mede indiretamente a instabilidade do genoma tumoral. Os altos escores de DRH (≥ 42) são altamente relacionados com variantes nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e sensibilidade à quimioterapia neoadjuvante/adjuvante com platina em pacientes com CMTN. Salientando que o fenótipo “*BRCAness*” pode apresentar grande instabilidade genômica, alta sensibilidade aos agentes intercalantes e conseqüentemente boa resposta clínica¹⁸.

1.6.3 PROGNÓSTICO E TERAPÊUTICA

Mulheres diagnosticadas com câncer de mama triplo negativo apresentam um pior prognóstico em relação às aquelas diagnosticadas com os outros subtipos moleculares, devido tanto a agressividade quanto à falta de um alvo estabelecido, tendo a quimioterapia como opção padrão de terapia sistêmica, tornando-se desafiador o tratamento dessas pacientes⁶⁷.

Os cânceres de mama triplo negativo tendem a recidivar em 30% dos casos dentro de 1 – 3 anos com alta incidência de metástases viscerais⁶⁸. Além disso, a sobrevida média de pacientes com CMTN após a metástase é de apenas 13,3 meses, comparado com cerca de 5 anos em relação as pacientes com câncer de mama metastático HER2 positivo^{18, 69}

A terapia neoadjuvante com antraciclina e taxano, adição ou não de agentes de platina,

é o tratamento padrão ouro para CMTN. Caso a paciente não alcance a resposta patológica completa (Rpc) com o tratamento neoadjuvante, recomenda-se o uso de tratamentos adjuvantes com capecitabina¹².

Desde os anos 2000, vem sendo estudadas drogas à base de platina como cisplatina e carboplatina no tratamento do câncer de mama e ovário^{70, 71}. A via de recombinação homóloga representa um alvo para terapias que induzem quebras de duplas fitas durante a replicação do DNA, assim como, os agentes de platina. O mecanismo de ação desses compostos envolve principalmente sua interação com o DNA, através da formação de monoaddutos. Esses monoaddutos evoluem através de uma segunda ligação covalente para uma ligação cruzada de DNA que pode ser na mesma fita de DNA (ligações cruzadas intra-fita de DNA, que comumente ocorre), ou ligações em fitas opostas (ligações inter-fita) que são responsáveis pela atividade antitumoral da droga. A figura 7 ilustra, de forma resumida, o modo de ação desses quimioterápicos. Se esses danos não forem revertidos, a principal consequência é um bloqueio na síntese e transcrição do DNA⁷².

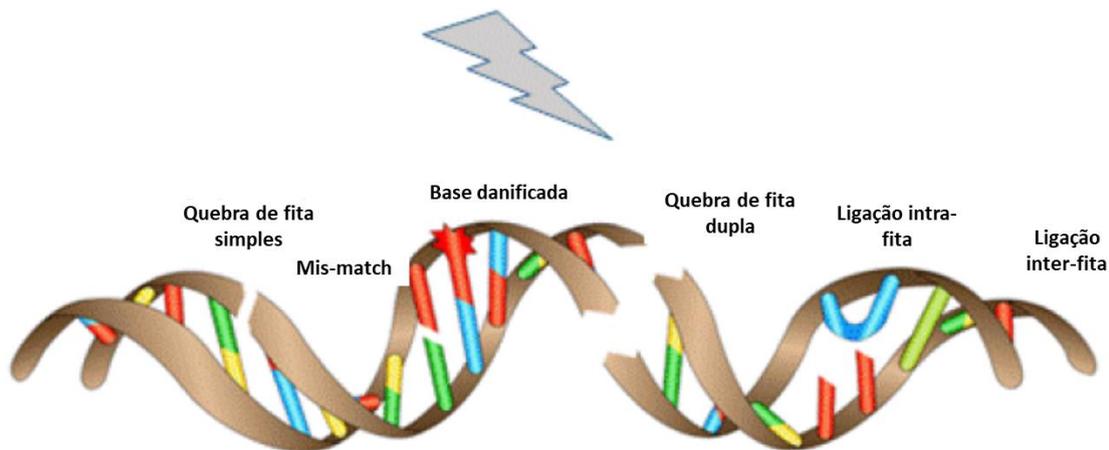


Figura 7: Danos causados ao DNA por agentes de platina. Adaptado de Damia e colaboradores, 2019⁷².

Um estudo de fase II, randomizado, intitulado GeparSixto, publicado em 2014, recrutou 588 pacientes com subtipo triplo negativo ou HER2-positivo. Os grupos foram randomizados para paclitaxel, doxorubicina com ou sem carboplatina. O grupo do CMTN recebeu também o bevacizumabe e o grupo HER2-positivo recebeu trastuzumabe e lapatinibe. Análise do subgrupo de CMTN que recebeu tratamento com a carboplatina, aponta que a taxa de resposta patológica completa foi de 53,2% (84 de 158 pacientes). Já no grupo que não recebeu a carboplatina a taxa de Rpc foi de 36,9% (58 de 157 pacientes), mostrando assim, um

resultado significativo na adição de carboplatina no tratamento neoadjuvante de CMTN⁷³.

De forma adicional, um estudo fase III intitulado *Brightness*, publicado em 2018, randomizou 634 pacientes em três grupos: Paclitaxel com Carboplatina e Velaparib, Paclitaxel com Carboplatina e somente Paclitaxel. Este estudo mostrou que a taxa de Rpc foi de 58% vs 31% ($p < 0.0001$), para o grupo que recebeu Paclitaxel com Carboplatina como tratamento em relação à aqueles que receberam somente o Paclitaxel, salientando que a adição da platina se faz importante no tratamento de CMTN⁷⁴.

Estudos com terapias neoadjuvantes demonstram que a resposta patológica completa fornece um marcador preditivo de resposta clínica a longo prazo e ganho de sobrevida em pacientes com CMTN⁷⁵. A correlação entre o prognóstico clínico e a Rpc vem sendo observada^{76, 77}, demonstrando que pacientes com CMTN com Rpc podem alcançar resultados similares àquelas pacientes com outros subtipos tumorais. Por outro lado, a presença de doença residual após a quimioterapia neoadjuvante, associa-se ao risco de recorrência precoce e mortalidade^{68, 76}.

No presente estudo, as pacientes que obtiverem as seguintes classificações após a cirurgia (ypT0, ypN0 e M0), foram consideradas com alcance de Rpc. Aquelas pacientes que possuíam qualquer outra classificação foram consideradas como apresentando presença de doença residual^{76, 78}.

O câncer de mama triplo negativo constitui o subtipo de câncer de mama ideal para o uso de ICIs (*Immune Checkpoints Inhibitors*), dado que, além da dificuldade de resposta com os tratamentos padrões para a totalidade de pacientes acometidos, apresenta alta instabilidade genômica, a qual leva à produção de neoantígenos e à alta imunogenicidade com maior expressão de PD-L1. No entanto, a imunoterapia usada de forma isolada não apresenta altas taxas de respostas no CMTN, principalmente em linhas posteriores de terapias, mas em combinação com outros tratamentos a imunoterapia tem exibido melhor resposta em CMTN metastático^{79, 80}.

Diversos estudos avaliando o efeito da imunoterapia em CMTN têm sido publicados. Em estudo realizado por Schmid e colaboradores em 2018, os autores demonstraram que o anticorpo anti-PD-L1 atezolizumabe em combinação com o nab-paclitaxel mostrou ser mais eficiente que o nab-paclitaxel sozinho em pacientes com CMTN avançado e PD-L1 positivo, previamente não tratados, tornando-se assim, um novo padrão de tratamento⁸¹.

Outra modalidade terapêutica que vem sendo empregada no tratamento de CMTN são

os inibidores da enzima poli (ADP-ribose) polimerase (PARP), que está envolvida no reparo de DNA por excisão de base. Ensaios clínicos têm mostrado sua eficácia em CMTN metastático com variantes nos genes *BRCA1* e *BRCA2*^{82, 83}.

Basicamente, a inibição de PARP leva a constantes quebras de fita simples de DNA que colapsam a forquilha de replicação, resultando assim, em quebras de dupla fita. Essas quebras são reparadas pela via de recombinação homóloga (RH) que necessita dos genes *BRCA* funcionais. Em tumores com deficiência nesses genes, esse reparo ocorre por uma via alternativa, propensa a erros, conhecida como junção de extremidade não homóloga (NHEJ), resultando em instabilidade cromossômica, parada do ciclo celular e apoptose⁷⁹.

Nesse contexto, ocorre o que se conhece como letalidade sintética, que se dá quando há a combinação de duas mutações em dois ou mais genes que, combinados levam à morte celular, ou seja, ocorre a inativação da via de reparo de danos de fita simples devido ao bloqueio de PARP e, de forma simultânea, esses pacientes possuem a via de recombinação homóloga deficiente, dado que as proteínas BRCA1 e BRCA2 são fundamentais nesse tipo de reparo⁷⁹.

1.7 ANCESTRALIDADE E CÂNCER DE MAMA

A população brasileira apresenta uma grande heterogeneidade genética. Esta heterogeneidade é resultado de mais de 500 anos de cruzamentos interétnicos entre os nativos americanos, colonizadores e os escravos africanos⁸⁴. O Brasil apresenta uma ampla ancestralidade europeia, principalmente no sul. A descendência africana se encontra bem difundida por todo o país (exceto no sul) e seus maiores níveis se encontram no leste do país. A ancestralidade Nativo-americana pode ser encontrada em maior concentração no noroeste do país (Amazônia)⁸⁵.

O estudo da ancestralidade no contexto do câncer de mama é embasado na literatura. Sabe-se que, apesar de apresentarem uma taxa de incidência menor de câncer de mama quando comparadas com as mulheres brancas, mulheres afro-americanas apresentam uma taxa de mortalidade mais alta por câncer em relação a qualquer outro grupo racial ou étnico nos Estados Unidos⁸⁶. Essa alta taxa de mortalidade em mulheres afro-americanas, ocorre devido a uma combinação de fatores, nos quais, incluem o acesso a tratamentos, questões ambientais e as diferenças biológicas presentes nos tumores⁸⁷.

Segundo a literatura, a incidência de tumores triplo negativos difere conforme a etnia da mulher. A frequência de CMTN em mulheres afro-americanas é 29,8%, aumentando essa incidência para 53,2% em mulheres da África central, contudo, no que se refere as mulheres americanas brancas é estimado que somente 15,5% desenvolva esse subtipo tumoral, demonstrando assim, a importância do fator genético no CMTN⁴⁵.

Em estudo publicado por Dietze e colaboradores em 2015, os autores relatam que mulheres afro-americanas possuem a menor incidência de variantes patogênicas no gene *BRCA1* em relação à mulheres com descendência europeia. Os autores citaram, um estudo publicado por Nanda e colaboradores em 2005, onde os autores analisaram 155 famílias de alto risco para câncer de mama da universidade de Chicago e observaram que os afro-americanos obtiveram baixa taxa de variantes germinativas patogênicas no gene *BRCA1* quando comparadas com não-hispânicos (27,9% vs 46,2%), porém, os afro-americanos apresentaram uma alta taxa de variantes (44,2% vs 11,5%)^{88, 89}.

Com isso, Prakash e colaboradores publicaram em 2018 que mulheres afro-americanas com CMTN apresentam menos de 25% de variantes germinativas patogênicas no gene *BRCA1* e sugerem que outros eventos moleculares ou variantes presentes em outros genes podem promover o CMTN nessas mulheres, sendo o que as diferem de outras etnias e devido a esse fato, apresentam duas vezes mais incidência de morte que pacientes Brancas não-hispânicas⁹⁰.

1.8 NACATRINE

Esse projeto de mestrado é vinculado ao estudo clínico NACATRINE. O NACATRINE é um estudo de fase II, prospectivo, randomizado e aberto, que objetivou avaliar se a terapia neoadjuvante com adição ou não de carboplatina, tinha impacto na resposta patológica completa (R_{pc}) em pacientes com câncer de mama triplo negativo (CMTN), estágio II e III. No total, 154 mulheres foram incluídas para tratamento com quimioterapia neoadjuvante padrão associada ou não a carboplatina. Todas as pacientes elegíveis para o estudo receberam 4 ciclos de quimioterapia com o esquema de doxorubicina e ciclofosfamida a cada 21 dias.

Ao final do tratamento com antraciclinas, as pacientes foram randomizadas para taxano ou taxano e carboplatina. Critérios de estratificação da randomização foram o status *BRCA* (Mutado vs WT), linfonodos axilares (N0 vs N positivo) e idade (≤ 50 vs >50 anos). Entre duas

a seis semanas do término da quimioterapia neoadjuvante, as pacientes foram submetidas a cirurgia, sendo, a peça cirúrgica enviada ao setor de patologia para avaliação da resposta patológica.

Como parte do estudo NACATRINE, o presente trabalho objetivou analisar, de modo clínico e molecular, pacientes com câncer de mama triplo negativo e com ausência de variantes germinativas patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

2. JUSTIFICATIVA

O Câncer de Mama do subtipo Triplo Negativo (CMTN) caracteriza-se por apresentar pior prognóstico em relação a outros subtipos de cânceres de mama, com uma alta taxa de mortalidade quando metastático.

Uma parcela significativa desses tumores apresenta variantes germinativas patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. No entanto, sabe-se que cerca de 60% dos tumores triplo negativos, mesmo não apresentando variantes patogênicas em *BRCA1* ou em *BRCA2*, possuem deficiência na via de recombinação homóloga, sendo classificados como tumores *BRCAness*. Estas pacientes podem, mesmo na ausência de variantes patogênicas nos genes *BRCA1/2*, receberem estratégias diferenciadas de manejo e tratamento. A identificação e a caracterização das alterações germinativas associadas ao desenvolvimento de tumores de mama triplo negativos são de fundamental importância, tanto no contexto de prevenção (identificar famílias e familiares de alto risco e oferecer acompanhamento preventivo e personalizado), quanto para o tratamento (estratégias como tratamento com inibidores de PARP já oferecidas a pacientes com defeitos na via de reparo por RH), assim como, para uma maior compreensão dos mecanismos biológicos associados ao desenvolvimento desse subtipo tumoral.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Avaliar o perfil e a frequência de alterações germinativas patogênicas em mulheres com câncer de mama triplo negativo, com ausência de variantes germinativas patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e participantes do estudo clínico NACATRINE.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar o perfil e frequência de variantes germinativas patogênicas em um painel de genes previamente associado com o câncer hereditário, em mulheres com câncer de mama triplo negativo;
- Avaliar a frequência de variantes germinativas patogênicas em genes de reparo em um grupo de mulheres com câncer de mama triplo negativo;
- Identificar as principais vias de reparo de danos ao DNA alteradas;
- Determinar o perfil ancestral da casuística e correlacionar com as características clínicas e histopatológicas;
- Comparar o perfil mutacional das pacientes do estudo com as características clínicas, histopatológicas e de história familiar;
- Comparar o perfil mutacional das pacientes do estudo com doença residual *versus* resposta patológica completa em resposta ao tratamento neoadjuvante.

4. METODOLOGIA

Conforme destacado na introdução, o presente estudo está sendo realizado como parte do estudo clínico fase II NACATRINE. Assim, após a admissão das pacientes no Hospital de Amor de Barretos (HAB), as mesmas são avaliadas para possível ingresso no estudo. As pacientes incluídas receberam quimioterapia neoadjuvante seguida de cirurgia da mama. Todas as pacientes tiveram o *status* do gene *BRCA* testado através do encaminhamento de suas amostras de sangue para o centro de diagnóstico molecular da mesma Instituição.

Na figura 8, é possível observar o fluxograma detalhado do estudo clínico NACATRINE.

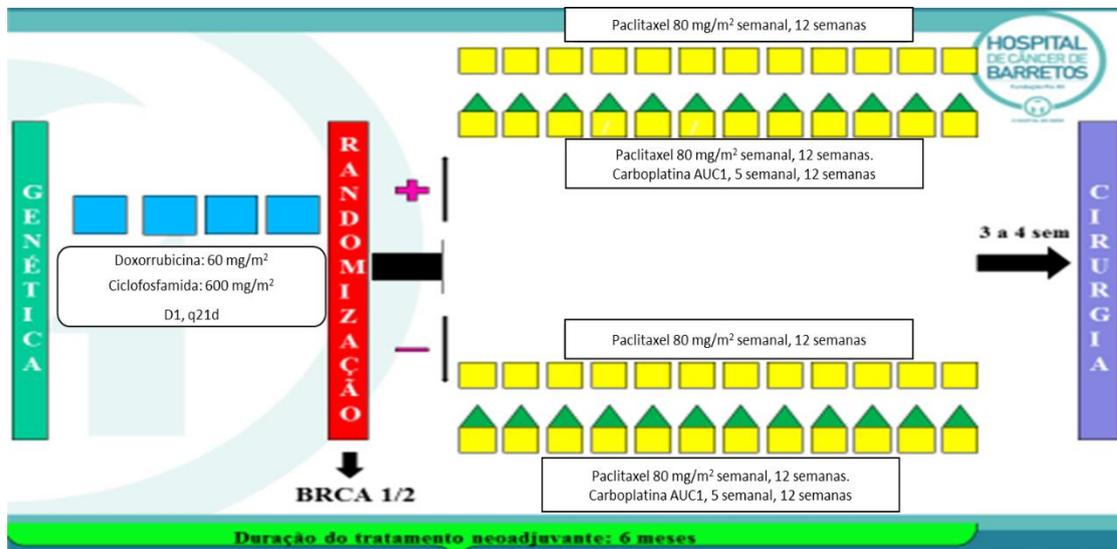


Figura 8: Fluxograma do estudo clínico NACATRINE. Adaptado da versão original do projeto.

No presente projeto de Mestrado foram avaliadas as pacientes, cujo resultado do teste genético apresentou ausência de variantes patogênicas germinativas nos genes de *BRCA1* e *BRCA2*. Essas pacientes foram submetidas ao sequenciamento de um grupo de 298 genes (painel gênico comercial). A figura 9 nos mostra um fluxograma sintetizando cada etapa realizada no presente trabalho.

As variáveis clínicas e histopatológicas foram coletadas a partir do prontuário clínico da paciente (Anexo 1) e armazenadas na plataforma de dados Redcap. A história familiar de câncer foi coletada a partir do prontuário da Oncogenética e os heredogramas armazenados no software Progeny versão 11.2.0.4.

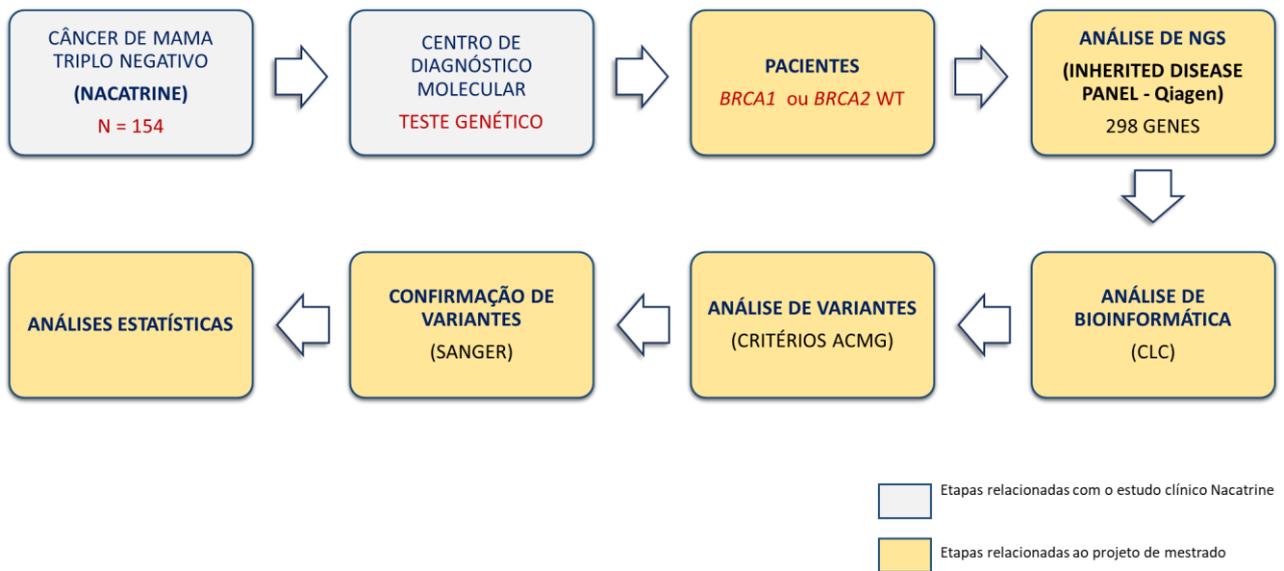


Figura 9: Fluxograma geral das etapas realizadas no projeto de mestrado.

4.1 PACIENTES

Para o presente projeto, os seguintes critérios de inclusão/exclusão foram empregados:

4.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

- Preenchimento do termo Consentimento livre e esclarecido;
- Pacientes incluídas no estudo clínico NACATRINE;
- Mulheres com diagnóstico de câncer de mama triplo negativo estágio II ou III;
- Idade ≥ 18 anos;
- Ausência de variantes germinativas patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

4.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

- Material biológico com quantidade ou qualidade insuficientes para a realização do painel gênico;
- Pacientes cujas análises por NGS não atingiram os critérios mínimos de qualidade estabelecidas no estudo.
- Pacientes que tiveram progressão de doença ou evoluíram à óbito antes da randomização do estudo NACATRINE, ou antes de realizar a cirurgia.

4.2 ANÁLISES MOLECULARES

4.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Foram solicitadas alíquotas de 50 ng de DNA genômico constitutivo das pacientes ao diagnóstico molecular do HAB, local onde foi realizado o teste genético para os genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Este DNA foi extraído a partir de sangue periférico, utilizando o kit QIAamp Blood DNA Mini Kit (Qiagen) em plataforma automatizada (QIAcube, Qiagen) seguindo especificações do fabricante. A quantificação e pureza das extrações foram obtidas por meio do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

4.2.2. SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS)

As pacientes, cujos resultados foram negativos para variantes patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, foram sequenciadas por um painel gênico comercial (*Inherited disease panel*, Qiagen) composto por 298 genes, que compreende não apenas genes relacionados com o risco aumentado do desenvolvimento de câncer de mama e ovário hereditários, mas, também, genes envolvidos nas diferentes vias de reparo do DNA. Um detalhamento dos genes contidos no painel encontra-se na tabela 3.

Tabela 3: Painel Gênico (Inherited disease Panel, Qiagen).

ABCB11	ANTXR1	BLM	CHEK2	DDB2	ESCO2	FLCN	HEXA	LYST	MSMB	P3H1	POLE	RECQL4	SLC37A4	TPP1
ABCC8	ANTXR2	BMPR1A	CHM	DHCR7	EXT1	FMR1	HEXB	MAPK10	MSR1	PAH	POLH	RET	SLX4	TRPV4
ACBCD1	APC	BRCA1	CLN3	DICER1	EXT2	G6PC	HFE	MAX	MTAP	PALB2	POMGNT1	RHBDF2	SMAD4	TSC1
ACADM	ARSA	BRCA2	CLN5	DIS3L2	F11	GAA	HGSNAT	MC1R	MTHFR	PALLD	POMT1	RNASEL	SMARCA4	TSC2
ACADS	ARX	BRIP1	CLN6	DKC1	F5	GALNT12	HRAS	MCCC2	MTM1	PAX6	POU1F1	RPGRIP1L	SMARCB1	TSHB
ACADVL	ASAH1	BTD	CLN8	DLD	FAH	GALT	IDUA	MCOLN1	MUT	PCDH15	POU6F2	RS1	SMPD1	UBA1
ADA	ASCC1	BTK	COL1A2	DMD	FANCA	GATA2	IGHMBP2	MECP2	MUTYH	PDE11A	PPT1	RSPO1	SOX10	UROD
ADAMTS13	ASL	BUB1B	COL4A3	DNAJB2	FANCB	GBA	IKBKAP	MEFV	MYO7A	PDGFRA	PRKAR1A	RTEL1	STAR	UROS
ADAMTS2	ASPA	CBS	COL4A4	EDA	FANCC	GCDH	IL2RG	MEN1	NBN	PDHA1	PROC	RUNX1	STK11	USH1C
AGA	ASS1	CD96	COL7A1	EDN3	FANCD2	GJB2	INVS	MET	NDUFA13	PEX1	PROP1	SBDS	SUFU	USH1G
AGL	ATM	CDC73	CRTAP	EDNRB	FANCE	GLA	KCNQ1	MFSD8	NEB	PEX7	PRX	SCNN1A	TERC	VHL
AGPS	ATP7A	CDH1	CTNS	EGR2	FANCF	GLB1	KDR	MITF	NF1	PHOX2B	PSAP	SCNN1B	TERT	WAS
AHT1	ATP7B	CDH23	CTSK	EHBP1	FANCG	GLI3	KIF1B	MKS1	NF2	PI3KCA	PTCH1	SCNN1G	TGFBR1	WRN
AIP	ATP8B1	CDK4	CYLD	EPCAM	FANCI	GLMN	KIT	MLH1	NPC1	PKHD1	PTCH2	SDHA	TINF2	WT1
AKT1	ATR	CDKN1B	CYP11A1	EPHB2	FANCL	GNPTAB	KLHDC8B	MLH3	NPC2	PLEKHG5	PTEN	SDHAF2	TMC6	XPA
ALDH3A2	AXIN2	CDKN2A	CYP21A2	ERCC2	FANCM	GPC3	L1CAM	MMAB	NPHP1	PLOD1	RAD50	SDHB	TMC8	XPC
ALDOB	BAP1	CEBPA	CYP27A1	ERCC3	FGD4	HADHA	LAMA2	MPZ	NPHP4	PLP1	RAD51B	SDHC	TMEM127	XRCC3
ALK	BARD1	CEP290	CYP27B1	ERCC4	FH	HADHB	LHX3	MRE11A	NTRK1	PMP22	RAD51C	SDHD	TMEM67	ZIC3
ALS2	BCKDHA	CFTR	DBT	ERCC5	FKRP	HBB	LIG4	MSH2	NUP62	PMS2	RAD51D	SGSH	TNNT1	
AMPD1	BCKDHB	CHEK1	DCX	ERCC6	FKTN	HESX1	LRPPRC	MSH6	OTC	POLD1	RB1	SLC26A2	TP53	

4.2.2.1 PREPARO DA BIBLIOTECA

O preparo da biblioteca do painel foi feito de acordo com o protocolo do fabricante (*Qiaseq™ Targeted DNA Panel handbook – maio 2017*).

De forma resumida, como visto na figura 10, as amostras de DNA genômico foram fragmentadas por um processo enzimático. Em seguida, realizou-se a ligação dos adaptadores na extremidade 5' livre do DNA. Os adaptadores compreendem o índice específico de cada amostra e os UMIs (*Unique molecular index – Índice molecular único*). O enriquecimento da biblioteca foi realizado utilizando um *primer* específico (*Qiaseq targeted DNA DHS-3011Z – que possui as sondas necessárias para selecionar os genes alvos do painel*) e um *primer* universal (*LT-Foward Primer*), para complementação dos adaptadores. Finalizou-se o preparo das bibliotecas com a PCR universal, para amplificar e garantir a ligação de todos os índices nas bibliotecas.

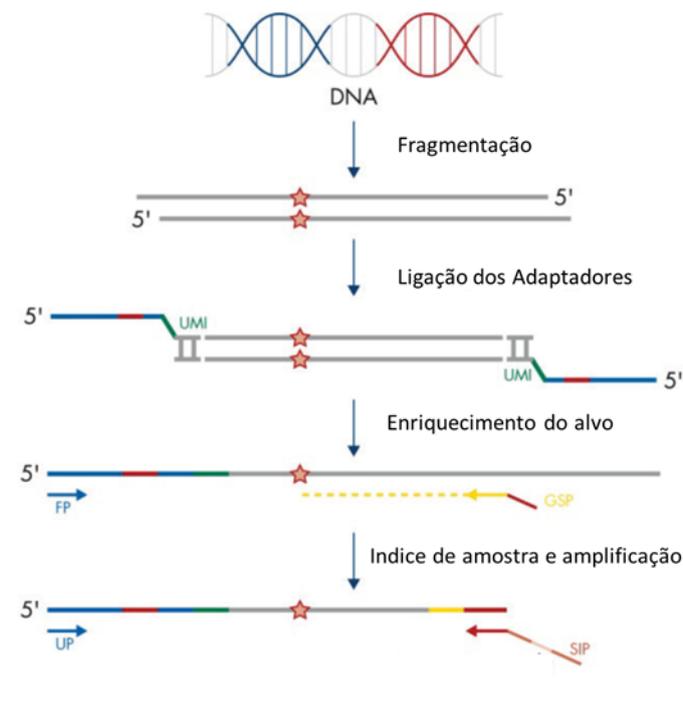


Figura 10: Fluxograma do preparo da biblioteca para sequenciamento (adaptado de Qiaseq™ targeted DNA handbook).

4.2.2.2 ANÁLISES DE QUALIDADE

Após o preparo das bibliotecas, realizou-se a análise de qualidade. Essa etapa ocorre com o auxílio de um sistema de análise microfluídica (*Tapestation*) com o kit *High Sensitivity* utilizando o produto final da biblioteca. Esse método foi utilizado para verificar se o tamanho do fragmento da biblioteca formada estava de acordo com o recomendado pelo fabricante (300 – 1000pb).

A quantificação do DNA presente na biblioteca foi feita por PCR em tempo real (qPCR), seguindo o protocolo *Qiaseq™ Library Quant Assay Kit*, utilizando a plataforma *StepOne Plus Real-time PCR System (Thermo Fisher)*.

Com o tamanho dos fragmentos e o valor total de CT (Cycle Threshold) fornecido pelo qPCR, calculou-se a quantidade necessária de água para diluir as bibliotecas em uma concentração de 2 nM (recomendado pelo fabricante – Qiagen).

4.2.2.3 SEQUENCIAMENTO

Após a diluição de todas as bibliotecas na concentração de 2nM, foi realizado um *pool*, que posteriormente é denaturado. Retirou-se um volume de 10 µl ao qual adicionamos 990 µl de HT1 (*Hybridization buffer*), para obter uma concentração final de 10pM de biblioteca. Desse total, retirou-se 600 µl para preencher o cartucho (*Miseq reagent kit v3*) que possui capacidade de sequenciar 12 amostras (para garantir uma cobertura mínima de 50 vezes). Nesse sequenciamento utiliza-se ainda um *primer* customizado (*QIAseq A Read 1 Custom primer I*) que é inserido no cartucho e conduzido ao sequenciador com as bibliotecas. Por fim, realizou-se o sequenciamento das regiões codificadoras e das regiões intrônicas adjacentes, utilizando a plataforma de sequenciamento de nova geração MiSeq (Illumina).

4.2.2.4 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

Com os arquivos FASTQs liberados pelo sequenciador, a análise de bioinformática foi realizada com auxílio do software CLC *Genomics Workbench* (QIAGEN), versão 20.02. No software, é realizado a retirada os UMIs e a trimagem das *reads* (remoção das sequências adaptadoras). As amostras são sequencialmente mapeadas contra o genoma de referência (GRCh37 hg19). Com os resultados do relatório de controle de qualidade para as regiões alvos do painel, verificou-se a cobertura média vertical das amostras, e a porcentagem de regiões alvos que apresentavam as coberturas de interesse (100x, 50x e 30x). A partir desses resultados, variantes com cobertura maior ou igual a 50x e frequência alélica maior ou igual a 25% foram mantidas, sendo exportadas no formato VCF (*Variant Call Format*), e, posteriormente, anotadas com auxílio do ANNOVAR (*Annotate variation*).

4.2.2.5 ANÁLISES DE VARIANTES

As variantes genéticas encontradas no sequenciamento do painel gênico foram anotadas pelo software ANNOVAR⁹¹, que nos fornece sua localização (intergênicas, gênicas, intrônicas) e sua classificação (*missense*, inserções ou deleções, *frameshift* ou *nonsense*), anotando também as variantes presentes em regiões de *splicing*.

Em seguida foi realizada a inspeção manual em todas as variantes encontradas, onde,

são utilizados os critérios preconizados pela ACMG (*American College of Medical Genetics and genomics*), os quais encontram-se detalhados no item 4.3 da presente dissertação, e a utilização de algumas ferramentas auxiliares.

A inspeção manual foi executada através de bancos de dados, entre eles, bancos de dados de frequências populacionais como o “Arquivo Brasileiro Online de Mutações – AbraOM” e o “*Genome Aggregation Database – GnomAD*”, que nos fornecem a frequência alélica em grupos de etnias diferentes e a frequência alélica geral. São utilizados, juntamente, com o *ClinVar do National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, conhecido por ser um banco de dados com variantes clinicamente relevantes.

No que se refere às ferramentas de predição *in silico*, para o presente estudo, foram utilizadas três ferramentas principais: “*Rare Exome Variant Esemble Learner – REVEL*”, “*Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity – MCAP*” e para regiões de *splicing* o “*Human Splicing Finder – HSF*”. No entanto, quando não há os escores de patogenicidade dessas ferramentas, fazemos a priorização usando outros algoritmos como o **EIGEN** e o **GENOCANYON**. Na figura 11, observa-se um resumo de cada etapa utilizada para classificação da patogenicidade de cada variante.

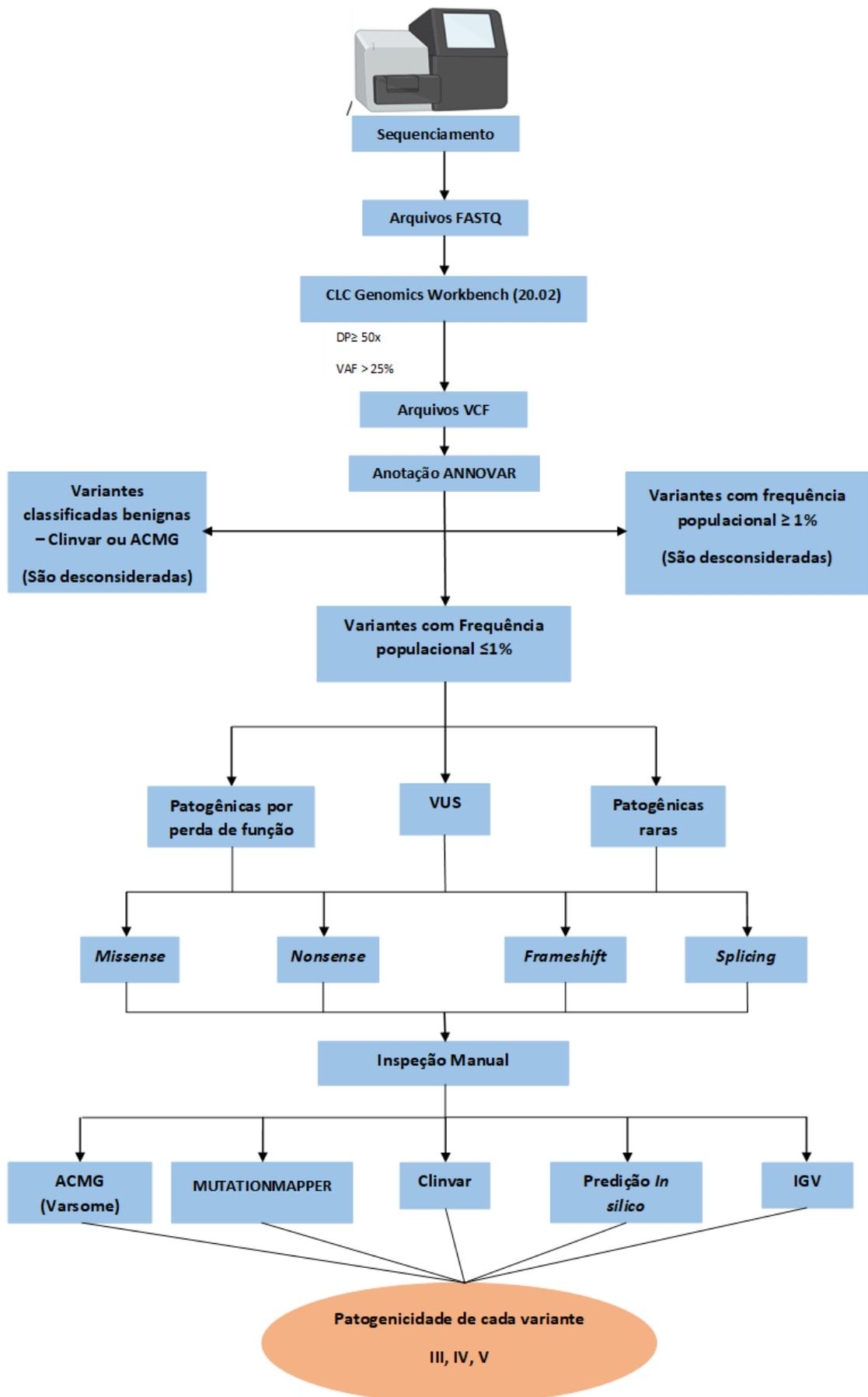


Figura 11: Fluxograma de análise e classificação das variantes.

4.2.3 ANOTAÇÃO DAS VARIANTES

4.2.3.1 ANNOVAR (*ANNOTATED VARIATION*)

O ANNOVAR é um software utilizado para anotar de maneira eficiente as variantes genéticas encontradas em diversos genomas (genoma humano, hg18, hg19, hg38, bem como camundongos, vermes, mosca, leveduras entre outros). Uma das anotações realizada pelo ANNOVAR é a anotação baseada em genes, na qual, é capaz de identificar SNPs (*Single nucleotide Polymorphisms*) ou CNVs (*Copy number variation*) que alteram a tradução das proteínas ou aminoácidos afetados. Esse software utiliza de alguns filtros para identificar variantes relatadas em bancos de dados e a porcentagem da frequência do alelo citado em alguns bancos de dados populacionais, como por exemplo, ExAC ou GnomAD (*Genome aggregation database*). O ANNOVAR também nos fornece, escores de algumas ferramentas de predição *in silico* (*SIFT, PolyPhen, LRT, MutatioTaster, MutationAssessor, FATHMM, METASVM*) e algoritmos de predições intergênicas como GERP++, CADD, entre outras^{91, 92}.

O Intervar é um programa inserido no ANNOVAR e auxilia na anotação de variantes, confere-lhes uma pontuação automatizada com base em cada um dos 18 critérios da ACMG, nos quais, foram definidos e publicados em 2015 por Richards e colaboradores e encontram-se detalhados no item 4.3 da presente dissertação⁹³. O Intervar utiliza o ANNOVAR como software de anotação, para obter informações necessárias das variantes. Em seguida, ele utiliza do seu próprio banco para complementar essas informações.

O Intervar faz uma interpretação preliminar das variantes, na qual, é apresentada junto com o ANNOVAR e esses critérios da ACMG são utilizados em uma revisão manual⁹⁴.

4.2.4 BANCOS DE DADOS

4.2.4.1 BANCOS DE DADOS DE FREQUÊNCIAS POPULACIONAIS

4.2.4.1.1 AbraOM (ARQUIVO BRASILEIRO ONLINE DE MUTAÇÕES)

O arquivo brasileiro online de mutações é um repositório de genótipos e fenótipos representativos da população, essencial para a interpretação de variantes. Formado, através

da filtragem da frequência de alelos de 609 idosos da cidade de São Paulo, que participaram de um estudo intitulado SABE (saúde, bem-estar e envelhecimento). Foram adicionados somente indivíduos idosos, pois os mesmos, possuem uma menor probabilidade de abrigar variantes patogênicas para doenças precoces, tornando esse banco de dados de grande interesse⁹⁵.

4.2.4.1.2 GnomAD (*GENOME AGGREGATION DATABASE*)

O GnomAD é um conjunto de dados com mais de 270 milhões de variantes que estão publicamente disponíveis (<https://gnomad.broadinstitute.org>) é comumente utilizado para estimativas de frequências alélicas no contexto de diagnósticos de doenças raras, aperfeiçoando a descoberta de genes e doenças.

Este banco agrega dados de 125.748 exomas e 15.708 genomas de estudos de sequenciamentos humanos entre eles o Exome Aggregation Consortium (ExAC) e o 1000 genomas. É um banco importante, durante a revisão de patogenicidade das variantes, pois, com suas porcentagens de frequências alélicas, podemos observar se a variante é uma variante rara. Sendo assim, com esses dados revisados adicionamos ou não critérios da ACMG em nosso consenso de patogenicidade⁹⁶.

4.2.5 BANCOS DE DADOS COM VARIANTES CLINICAMENTE RELEVANTES

4.2.5.1 CLINVAR

É um banco de dados público e gratuito de relatórios sobre variantes genéticas humanas e interpretações de seu significado clínico. O ClinVar recebe relatórios com informações de fenótipos que passaram por testes genéticos, trazendo informações de interpretação de variantes do provedor ou somente a fenotipagem. Todas essas informações recebidas são revisadas cientificamente e mapeados conforme o padrão HGVS (*Human genome variation Society*)⁹⁷.

4.2.6 FERRAMENTAS DE PREDIÇÃO *IN SILICO*

4.2.6.1 REVEL (*RARE EXOME VARIANT ENSEMBLE LEARNER*)

O REVEL é composto por 18 escores de patogenicidade calculado com 13 ferramentas diferentes (GERP++, SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster, MutationAssessor, FATHMM, LRT, PhyloP, PhastCons, SIPHY, MutPred, PROVEAN, VEST), sendo oito escores de conservação e 10 escores funcionais. No presente trabalho, consideramos um escore de $\geq 0,7$ para denominar a variante como potencialmente patogênica⁹⁸.

4.2.6.2 MCAP (*MENDELIAN CLINICALLY APPLICABLE PATHOGENICITY*)

A ferramenta MCAP é composta por nove escores estabelecidos para realizar a predição, sendo eles: SIFT, PolyPhen-2, CADD15, MutationTaster, MutationAssessor, FATHMM, LRT, MetaLR, and MetaSVM. Além disso, essa ferramenta possui sete medidas adicionais de região genômica e conservação de genes (RVIS2, PhyloP, PhastCons, PAM250, BLOSUM62, SIPH e GERP). Compreende também aminoácidos observados em códons de 100 espécies, indicando se a amostra tem o aminoácido de referência, aminoácido alternativo ou nenhum alinhamento de aminoácido. Esses recursos são essenciais para aprendizado de máquina. Além disso, o M-CAP é composto de 298 novas características derivadas de sequências múltiplas de 99 genomas de primata, mamíferos e vertebrados que são alinhados ao genoma humano. O escore utilizado para considerar as variantes como deletérias foi $\geq 0,025$ ⁹⁹.

4.2.6.3 EIGEN

O EIGEN é uma abordagem não supervisionada que agrega diferentes anotações em uma medida funcional. Diferentemente da maioria dos métodos, este não é baseado em nenhum dado de treinamento marcado em relação ao seu *status* funcional. O EIGEN é realizado através de uma combinação linear ponderada de anotações, ilustrando a capacidade discriminatória do *meta-score* proposto. São utilizados vários exemplos de variantes associadas a doenças e variantes supostamente benignas da literatura, utilizando no fim um

meta-score mais simples, Eigen-PC, que consiste na decomposição automática de anotação e um autovetor principal para comparar as anotações individuais¹⁰⁰. O escore utilizado para classificar as variantes como deletérias é $\geq 0,5$.

4.2.6.4 GENOCANYON

A ferramenta de predição *in silico* GenoCanyon é uma ferramenta de anotação de genoma completo baseada na aprendizagem estatística não supervisionada, utilizando 22 anotações computacionais e experimentais. Essa anotação é realizada através de uma coleção de escores de genomas comparativos de conservação e escores bioquímicos obtidos pelo projeto ENCODE. A ferramenta utiliza a probabilidade dessa variante estar em local funcional do genoma utilizando um escore de previsão. Em suma, o GenoCanyon não mede apenas a patogenicidade das variantes, mas também a funcionalidade da sua posição no genoma.

Essa ferramenta também possui uma grande flexibilidade estatística, o que pode beneficiar outros relatórios de variantes. O GenoCanyon está disponível no endereço <http://genocanyon.med.yale.edu>¹⁰¹. O escore utilizado para classificar as variantes como patogênicas foi de $\geq 0,5$.

4.2.6.5 HSF (*HUMAN SPLICING FINDER*)

HSF é uma ferramenta utilizada para predizer mutações em sítio de *splicing*. O HSF contém matrizes disponíveis para identificação de ampliadores e identificadores de *splicing* exônico, além de matrizes de posição responsáveis por proporcionar a força dos sítios de *splicing* (5' e 3') e de sequências *branch* (sequência intrônica ligante sinalizadora de *splicing*), sendo constituída de um algoritmo adaptado *do MaxEnt script*, que permite a análise de uma sequência completa, podendo ser feita a definição de limites para prever o sítio de *splicing*¹⁰².

4.2.7 INSPEÇÃO MANUAL DAS VARIANTES

Somente as variantes consideradas raras (Frequência alélica – *Allelic Frequency* (AF) $\leq 1\%$) passaram para a próxima fase, que se constituiu na priorização manual das variantes, realizada de forma independente pela mestranda e pela sua orientadora. Na tabela 4, estão

listadas algumas ferramentas utilizadas nessa fase de curagem manual das variantes e as suas respectivas finalidades, para atingir o consenso final em relação à patogenicidade de cada variante.

Tabela 4: Etapas da revisão manual das variantes raras encontradas no sequenciamento.

FERRAMENTAS	FINALIDADES
GENECARD (https://www.genecards.org/)	Analisar a função, classe e relação do gene com a carcinogênese.
VAR SOME – Verificação dos critérios da ACMG (https://varsome.com/)	Analisar a patogenicidade, utilizando os critérios preconizados pela ACMG
MUTATION MAPPER (https://www.cbioportal.org/mutation_mapper)	Analisar se a variante está em sítio ativo do gene e se poderá levar a danos na proteína
CLINVAR (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/)	Classificar as variantes segundo sua patogenicidade, através de evidências e ponderação dos depositantes desses dados e do grau de confiabilidade (número de estrelas).
IGV (Integrative Genome viewer) https://software.broadinstitute.org/software/igv/	Eliminar possíveis resultados falsos positivos, verificar a cobertura da região e a sequência do DNA.

4.3 CRITÉRIOS DA ACMG (AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS AND GENOMICS)

Os critérios da ACMG representam uma diretriz para a classificação de variantes de acordo seu grau de patogenicidade mediante alguns critérios. Esses critérios são divididos em duas categorias: uma para classificação de variantes como patogênicas ou provavelmente patogênicas e a outra categoria para classificar as variantes como benignas ou provavelmente benignas. Os critérios patogênicos são divididos em: PVS1 (*very strong*), PS1-4 (*Strong*), PM1-5 (*Moderated*), PP1-5 (*Supporting*). Os critérios benignos possuem classificações semelhantes: BS1-4 (*Strong*), BP1-6 (*Supporting*) ou BAS1 (*stand alone*). A numeração de cada categoria não contém diferenças de peso e são meramente rotuladoras. Variantes que não alcançaram pontuação em nenhuma dessas categorias (patogênica ou benigna), ou possuem caráter

conflitantes entre eles, não havendo evidência científica necessária para assim classificá-las, são categorizadas como variantes de significado desconhecido ou incerto, comumente conhecidas como VUS⁹³.

Na tabela 5, pode-se observar uma tradução da tabela do artigo de Richards e colaboradores publicado em 2015, que demonstra detalhadamente os critérios da ACMG utilizados como evidências de patogenicidade para classificar as variantes como provavelmente patogênicas (classe IV) ou patogênicas (classe V). Na tabela 6, estão listadas as evidências de impacto benigno que são preconizados para chegar ao consenso final em relação à classificação das variantes.

Tabela 5: Evidência de patogenicidade utilizadas na classificação das variantes. (Retirado e traduzido de Richards e colaboradores, 2015⁹³).

Evidências de Patogenicidade	Categorias
Muito Forte	<p>PVS1 – Variante Nula (Sem sentido, <i>frameshift</i>, canônico ± 1 ou 2 sítios de splice, códon de iniciação, deleção de único ou múltiplos éxons) em um gene onde LOF (loss of function – perda de função) é um mecanismo conhecido de doença.</p> <p>Advertências:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cuidado com genes onde o mecanismo de doença não é conhecido (por exemplo, <i>GFAP</i>, <i>MYH7</i>); • Cuidado ao interpretar as variantes LOF na extremidade 3' de um gene; • Cuidado com as variantes de <i>splicing</i> que podem levar ao salto do éxon, mas deixa o restante da proteína intacta; • Cuidado com a presença de vários transcritos.
Forte	<p>PS1 – Mudança de um mesmo aminoácido que uma variante patogênica previamente estabelecida, independente da mudança do nucleotídeo. Exemplo: Val \rightarrow Leu causado por G>C ou G>T no mesmo códon.</p> <p>Advertência: Cuidado com as mudanças que afetam no sítio de splicing e não no nível aminoácido/proteína.</p>

PS2 - De novo (Maternidade e paternidade confirmadas), em um paciente com doença e sem histórico familiar.

Nota: Apenas a confirmação por paternidade é insuficiente. Doação de óvulos, maternidade substituta, erro na transferência de embrião e assim por diante, podem contribuir para a não maternidade.

PS3 – Estudos funcionais *in vitro* e *in vivo* bem estabelecidos que suportam o efeito prejudicial no gene ou produto gênico.

Nota: Estudos funcionais validados que demonstram ser reprodutíveis e robusto em um ambiente clínico, as configurações de laboratório de diagnóstico são consideradas as mais bem estabelecidas.

PS4 – A prevalência da variante em indivíduos afetados é significativamente aumentada em comparação com a prevalência nos controles

Nota 1: O risco relativo ou OR, conforme obtido a partir de estudos caso-controle, é $> 5,0$ e o intervalo de confiança em torno da estimativa de risco ou OR não inclui 1,0. Consultar o artigo para obter orientações detalhadas.

Nota 2: Em caso de variantes muito raras, onde os estudos caso-controle podem não atingir significância estatística, a observação prévia da variante em vários pacientes com o mesmo fenótipo e sua ausência em controles, pode ser usado como nível moderado de evidência.

Moderado

PM1 – Localizado em um *hot spot* mutacional e/ou domínio funcional bem estabelecido e crítico (por exemplo, local ativo de uma enzima), sem uma variação benigna.

PM2 – Ausência de controles (ou em frequência extremamente baixa se recessiva), no projeto de sequenciamento do exoma, projeto 1000 genomas ou consórcio de agregação do exoma (Exome aggregation consortium – ExAC).

Advertência: Dados populacionais para inserções/deleções podem ser mal identificadas pelo sequenciamento de nova geração.

PM3 – Para desordens recessivas detectadas em trans com uma variante patogênica.

Nota: Isso requer teste dos pais (ou filhos) para determinar a fase.

PM4 – O tamanho da proteína muda como resultado de deleções e inserções no quadro em uma região não repetida ou variantes *stop loss*.

PM5 – Nova variante *missense* em um aminoácido onde, uma alteração *missense* diferente já havia sido previamente determinada como patogênica.

Exemplo: *Arg156His* é patogênico; agora *Arg156Cys*.

Advertência: Cuidado com as mudanças que afetam o *splicing*, e não o nível aminoácidos/proteínas.

PM6 – De novo, mas sem confirmação de paternidade e maternidade.

Apoio

PP1 – Co-segregação, vários membros da família afetados com doença em um gene definitivamente conhecido por causar a doença.

Nota: Pode ser usado como forte evidência com o aumento dos dados de segregação.

PP2 – Variantes *missenses* em um gene com baixa taxa de variante benigna e em que as variantes patogênicas são um mecanismo comum de doença.

PP3 – Múltiplas linhas de evidência computacional suportam um efeito deletério no gene ou no produto gênico (conservação, evolução e impacto no sítio de *splicing*).

Advertência: Devido ao fato de muitos algoritmos *in silico* usarem o mesmo ou muito semelhante *input* para as suas predições, cada algoritmo não deve ser analisado como um critério independente. O PP3 pode ser usado somente uma vez em qualquer avaliação de uma variante.

PP4 – O fenótipo do paciente ou a história familiar é altamente específica para uma doença com uma única etiologia genética.

PP5 – Fonte respeitável recentemente relatou a variante como

patogênica, mas a evidência não está disponível para uma avaliação independente.

Tabela 6: Evidências de impacto benigno preconizados na classificação das variantes. (Retirado e traduzido de Richards e colaboradores, 2015)⁹³.

Evidências de impacto benigno	Categorias
Stand-alone	BA1 – Frequência alélica é > 5% no projeto de sequenciamento de exoma, projeto de 1000 genomas ou Consórcio de agregação de Exoma (ExAC).
Forte	<p>BS1 – Frequência alélica é maior que o esperado para a desordem.</p> <p>BS2 – Observado em um indivíduo adulto saudável para um recessivo (homozigoto), dominante (heterozigoto), ou ligado a X (hemizigótico), com penetrância total esperada em uma idade precoce.</p> <p>BS3 – Estudos funcionais <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i> bem estabelecidos não mostram nenhum efeito prejudicial na função da proteína, ou no <i>splicing</i>.</p> <p>BS4 – Falta de segregação em membros afetados de uma família. Advertência: A presença de fenocópias para fenótipos comuns (ou seja, câncer, epilepsia), pode imitar a falta de segregação entre indivíduos afetados. Além disso, as famílias podem ter mais de uma variante patogênica contribuindo para uma desordem autossômica dominante, confundindo ainda mais uma aparente falta de segregação.</p>
Apoio	<p>BP1 – Variantes missenses em um gene para o qual principalmente variantes truncadas são conhecidas por causar doenças.</p> <p>BP2 – Observado em trans com uma variante patogênica para um gene/ desordem dominante totalmente penetrante, ou observado em cis com uma variante patogênica de qualquer padrão de herança.</p>

BP3 – Deleções/inserções *in frame* em uma região repetitiva sem uma função conhecida.

BP4 – Várias linhas de evidência computacional não sugerem nenhum impacto no gene ou produto gênico (conservação, evolução e impacto no *splicing*).

Advertência: Como muitos algoritmos de predição *in silico*, usam o mesmo ou um *input* muito semelhante, cada algoritmo não pode ser considerado um critério independente. BP4 pode ser usado somente uma vez na classificação de uma variante.

BP5 – Variante encontrada em um caso com uma base molecular alternativa para doença.

BP6 – Fonte confiável classificou recentemente a variante como benigna, mas a evidência não está disponível para a realização de uma avaliação independente.

BP7 – Variante sinônima (silenciosa), na qual, algoritmos de predição de *splicing* não preveem nenhum impacto na sequência de *splicing* nem a criação de um novo sítio de *splicing* e o nucleotídeo não é altamente conservado.

5. CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS – SEQUENCIAMENTO CONVENCIONAL

Todas as variantes classificadas após aplicação do *pipeline* e curagem manual, como provavelmente patogênicas ou patogênicas, foram confirmadas por sequenciamento convencional (Sanger).

Para a confirmação desses resultados, os DNAs genômicos em questão foram amplificados por PCR (a sequência dos *primers* sintetizados, o protocolo e as ciclagens utilizadas em cada gene encontra-se no anexo 6), purificados com a enzima ExoSap-IT (USB) e kit Big Dye X terminator (*Applied Biosystems*) e sequenciados bi-direcionalmente utilizando o Kit BigDye terminator v3.1 (*Applied Biosystems*). A eletroforese foi realizada no sequenciador automatizado modelo 3500XL (*Applied Biosystems*), no anexo 7, encontra-se os eletroferogramas dos genes confirmados.

6. ANCESTRALIDADE

Para a análise da ancestralidade foi utilizado o painel de AIM-INDELS (Marcadores informativos de ancestralidade – inserções e deleções) desenhado e publicado por Pereira e colaboradores¹⁰³. Na qual, 46 pares de *primers* foram amplificados em uma única reação de PCR (PCR multiplex) utilizando o Multiplex PCR kit (*Qiagen*).

A PCR foi realizada com as seguintes quantidades: master mix multiplex 5µl, 1 µl de DNA (5 ng) de cada paciente do estudo, 2 µl de água ultra pura, 1 µl do primer mix 10 x e 1 µl do primer reinforcement 10x. A reação de PCR aconteceu nas seguintes condições: denaturação inicial a 95°C por 15 min, seguida por 30 ciclos de 94° C por 30 segundos, 60°C por 90 segundos e 72°C por 45 segundos, encerrando com uma extensão de 60 minutos a 72°C. Para a análise de fragmentos foi preparado um mix com 8,7 µl de Formamida Hi-Di e 0,3 µl de Liz 600. Para cada análise, utilizou-se 9 µl do mix preparado para 1 µl do produto de PCR amplificado, resultando no volume final de 10 µl.

Por fim, foi realizado a denaturação de todas as amostras à 95° C e analisadas através de eletroforese capilar (análise de fragmentos) em um sequenciador ABI 3500XL. Os resultados foram analisados pelo *software* GeneMapper v4.0 (*Applied Biosystems*) e, na sequência os dados foram transferidos para o *software* Structure v2.3.2 para a inferência do perfil ancestral. A avaliação de ancestralidade foi realizada avaliando-se proporcionalmente a mistura entre os quatro continentes de origem étnica: África, Europa, Ásia e América nativa (ameríndios).

7. ANÁLISES ESTÁTISTICAS

Os dados de cada paciente foram caracterizados utilizando medidas de tendência central e dispersão, tais como: média, mediana, desvio padrão, mínimo, máximo, frequência entre outras.

As comparações do perfil mutacional com as características clínicas, histopatológicas e de história familiar, foram realizadas através dos Testes T ou Man-whitney ou ainda Qui-quadrado ou Exato de Fisher, a depender da natureza das características das variáveis em análise. Para realização das análises de ancestralidade, as quatro etnias (africana, europeia,

asiática e ameríndia) foram divididas em tercís e em seguida analisadas pelos teste Qui-quadrado ou Exato de Fisher. A correlação da sobrevida global com a ancestralidade foi realizada pela curva de Kaplan-meier.

Para comparar o perfil mutacional das pacientes com doença residual *versus* as que obtiveram resposta patológica completa ajustamos um modelo de regressão logística múltipla através do qual é estimado o *Odds Ratio* (OR) e seus respectivos intervalos de confiança 95% (IC95%). As análises de sobrevida Livre de doença e global foram realizadas através da curva de Kaplan-meier.

As análises estatísticas foram feitas utilizando o software SPSS versão 22, assumindo 5% como nível de significância.

8. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pelo CEP (CAAE 1.796.766), do Hospital de Amor de Barretos, e está de acordo com a regulamentação ética preconizada para este tipo de estudo (Resolução nº 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS)). Todas as pacientes foram consentidas para entrar no estudo.

Os pesquisadores comprometeram-se com a confidencialidade dos dados e o anonimato das pacientes. As informações estão sendo devidamente arquivadas e somente pesquisadores envolvidos no estudo têm acesso a elas. Os resultados desse estudo (presença de variantes germinativas patogênicas) serão fornecidos aos pacientes em sessão de aconselhamento genético e após confirmação por uma segunda metodologia.

9. RESULTADOS

Foram incluídas no estudo NACATRINE 154 pacientes, das quais, no referido projeto, foram excluídas aquelas que possuem variantes nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (N=29) e 1 paciente excluída devido à não realização do teste genético para os genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Portanto, o número total de pacientes incluídas projeto de mestrado foi de 126 mulheres. As análises moleculares e clínicas foram realizadas com as 126 pacientes, contudo, para análises de R_{pc} e sobrevida em relação ao tratamento foram utilizadas somente 113 pacientes, devido a exclusão de 13 pacientes que tiveram progressão da doença antes da

randomização ou procedimento cirúrgico, ou até mesmo, evoluíram a óbito antes da realização desses procedimentos. Na figura 12, observa-se um *consort* resumindo o número de pacientes utilizado em cada etapa do estudo.

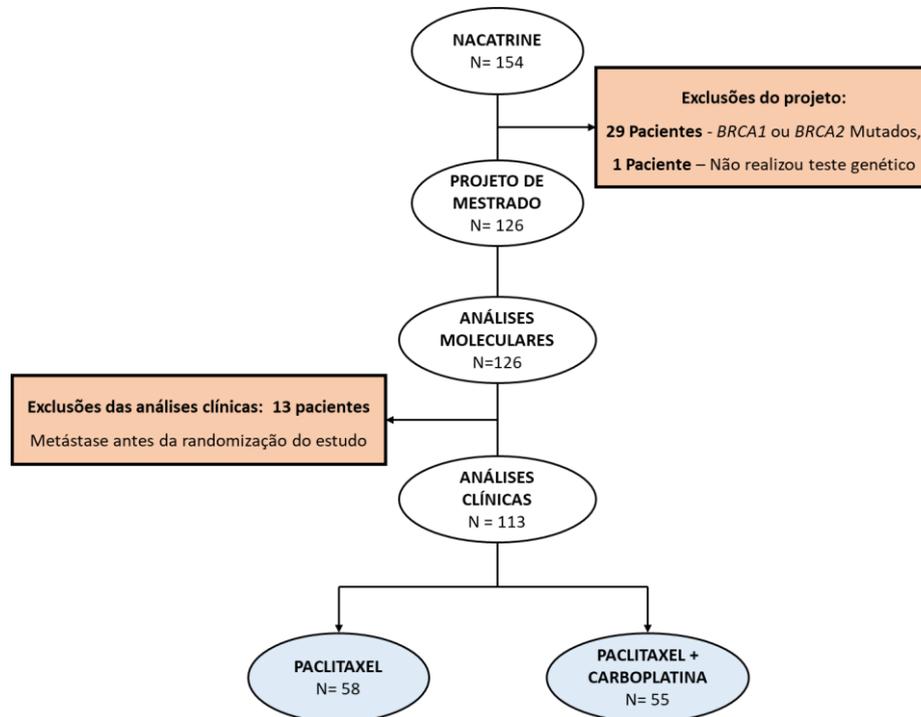


Figura 12: *Consort* de inclusões e exclusões do projeto de mestrado.

Os prontuários clínicos das 126 pacientes foram devidamente revisados e analisados.

Pode-se observar que, a mediana de idade das pacientes foi de 46 anos com desvio padrão de 13,01, variando de 19 a 79 anos. A maioria das pacientes (N=73) apresentou grau histológico III e estadiamento IIIc (N=39) ao diagnóstico. O tamanho do tumor foi predominantemente T3, com status axilar majoritariamente entre N1-N3. Esses dados podem ser observados na tabela 7.

Tabela 7: Caracterização clínica das pacientes incluídas no estudo.

Características	Variáveis	N (%)
Idade (mediana)	46 (19 – 79)	126 (100,0)
Etnia (auto declarada)	Branco	74 (58,7)
	Negro	9 (7,1)
	Pardo	38 (30,2)
	Amarelo	5 (4,0)

	Total	126 (100,0)
Grau Histológico	I	4 (3,2)
	II	48 (38,1)
	III	73 (57,9)
	Indisponível	1 (0,8)
	Total	126 (100,0)
Estadiamento ao diagnóstico	Ila	6 (4,8)
	Ilb	36 (28,6)
	IIla	11 (8,7)
	IIlb	34 (27,0)
	IIlc	39 (31,0)
	Total	126 (100,0)
Tamanho do Tumor	T1 ou T2	40 (31,7)
	T3	50 (39,7)
	T4	36 (28,6)
	Total	126 (100,0)
Status Axilar	N0	51 (40,5)
	N1-N3	75 (59,5)
	Total	126 (100,0)
Status Menopausal	Pré	58 (46,0)
	Peri	21 (16,7)
	Pós	46 (36,5)
	Indisponível	1 (0,8)
	Total	126 (100)

9.1 ANÁLISES MOLECULARES

O sequenciamento do painel gênico foi realizado para as 126 participantes do estudo. Dados de cobertura para cada uma das 11 corridas encontram-se no anexo 2.

Foram identificadas 27 variantes patogênicas/provavelmente patogênicas em 26 pacientes não aparentadas, representando um total de 20,6% da casuística analisada.

Dentre as variantes classes IV ou V identificadas, encontram-se genes relacionados com síndromes hereditárias e associados ao reparo de danos ao DNA, tais como na via de *mismatch repair* (*MLH1*, *MUTYH*, *PMS2* e *CDKN2A*), anemia de fanconi (*FANCA*, *FANCD2* e *FANCE*) e na via de reparo de recombinação homóloga (*PALB2*, *RAD51C* e *RAD51D*).

Uma das pacientes (3,85% da amostra) apresentou 2 variantes patogênicas (Fc2000), com variantes nos genes *MUTYH* (em heterozigose) e *NTRK1*.

Foram identificadas sete pacientes, (26,9%), com variantes germinativas patogênicas em genes da família da anemia de fanconi (Fc2727, Fc2163, Fc2959, Fc3074, Fc2936, Fc3286, Fc3320) (anexo 3), sendo 6 destas pacientes diagnosticadas com câncer de mama antes dos 50 anos.

Uma variante (c.1278+3_1278+6del;p. Val427Phefs*20) identificada no gene *FANCD2*, foi identificada em três pacientes não aparentadas (Fc2936, Fc3286 e Fc3320) (anexo 3), sendo essa variante confirmada por sanger nos 3 casos.

Três pacientes (11,5%) apresentaram variantes patogênicas (em heterozigose) no gene *MUTYH* (Fc2000, Fc2111, Fc2650) (anexo 3), gene relacionado com o desenvolvimento de câncer colorretal polipomatoso (quando mutado em homozigose). Pode-se observar que as três pacientes que apresentam variantes patogênicas no gene *MUTYH*, receberam diagnóstico de câncer de mama antes dos 40 anos, contudo, somente duas (Fc2000 e Fc2650) (anexo 3), possuem caso de câncer de cólon na família. Além de variantes no gene *MUTYH*, os genes *MLH1* e *PMS2*, envolvidos na Síndrome de Lynch tiveram variantes patogênicas identificadas, sendo *MLH1* nas pacientes Fc1874, Fc3386 e *PMS2* na paciente Fc2792 (anexo 3).

Dentre os genes considerados de alto risco para o câncer de mama, *TP53* e *PALB2*, foram encontradas duas variantes em cada, *PALB2* (Fc2878, Fc3138) (anexo 3) e *TP53* (Fc2186, Fc3296) (anexo 3). Ainda, uma paciente teve variante patogênica no gene *RAD51C* (Fc2528) (anexo 3), gene considerado de alto risco para o câncer de ovário.

Em relação aos genes considerados de moderado risco para o desenvolvimento do câncer de mama, foi encontrada uma variante no gene *RAD51D* (Fc2792) (anexo 3) e uma, no gene *CDKN2A* (Fc2121) (anexo 3).

Foi encontrada uma variante patogênica no oncogene *ALK*, gene classicamente associado com câncer de pulmão de não pequenas células, assim como nos genes *EPHB2* (Fc3256) e *NTRK1* (Fc2000) (anexo 3).

Importante destacar, que das variantes apresentadas no projeto, quatro (15,4%), não

foram reportadas na literatura. Sendo elas, *FANCD2* (c.696-1G>A), *FANCE* (c.1114-1G>A), *WRN* (c. 1273_1276del) e *EPHB2* (c.3059del).

Dentre as variantes patogênicas identificadas, 11 eram variantes do tipo *missense*, 10 variantes eram *frameshift*, 4 variantes encontravam-se em sítio de *splicing*, e 2 eram do tipo *nonsense*. As variantes IV e V estão listadas na tabela 8, juntamente com sua frequência alélica e o escore fornecido pelo algoritmo de predição *in silico* REVEL. Os heredogramas das pacientes com variantes classes IV e V, detalhando a história de câncer da probanda e de seus familiares, estão presentes no anexo 3

Tabela 8: Variantes provavelmente patogênicas (IV) e patogênicas (V) identificadas no estudo.

ID	Diagnóstico (Idade)	Gene	cDNA – HGVS	p. – HGVS	ACMG	REVEL	GnomAD (ALL)	Clinvar	VAF	Zigosidade	Função
Fc3301	29	ALK	c.1154+1G>A		V (PVS1, PM2 e PP3)	NC	NC	Significado incerto	53,98	Het	Receptor tirosina quinase
Fc2121	31	CDKN2A	c.301G>T	p. Gly101Trp	IV (PM2, PP3, PP5)	0,798	NC	Significado incerto	41,84	Het	Supressor tumoral
Fc2562	47	CYLD	c.2272C>T	p. Arg758*	V (PVS1, PM2, PP3, PP5)	NC	NC	Patogênico	49,02	Het	Supressor tumoral
Fc3256	32	EPHB2	c.3059del	p. Lys1020Argfs*63	IV (PVS1, PM2)	NC	0,00214	Não reportada	47,22	Het	Receptor tirosina quinase
Fc2727	46	FANCA	c.3385G>C	p. Asp1129His	IV (PM2, PM5, PP2, PP3)	0,417	NC	Significado incerto	49,36	Het	Atua no reparo do DNA
Fc2163	24	FANCD2	c.696-1G>A		V (PVS1, PM2, PP3)	NC	NC	Não reportada	52,63	Het	Estabilidade Cromossômica
Fc2936	39	FANCD2	c.1278+3_127 8+6del	p. Val427Phefs*20	IV (PVS1, PM2)	NC	NC	Significado incerto	35,25	Het	Estabilidade Cromossômica
Fc3286	52	FANCD2	c.1278+3_127 8+6del	p. Val427Phefs*20	IV (PVS1, PM2)	NC	NC	Significado incerto	34,83	Het	Estabilidade Cromossômica
Fc3320	42	FANCD2	c.1278+3_127 8+6del	p. Val427Phefs*20	IV (PVS1, PM2)	NC	NC	Significado incerto	46,34	Het	Estabilidade Cromossômica
Fc2959	34	FANCE	c.1114-1G>A		V (PVS1, PM2 e PP3)	NC	NC	Não reportada	53,85	Het	Reparo de ligação cruzada no DNA

Fc3074	35	<i>FANCE</i>	c.1111C>T	<i>p. Arg371Trp</i>	IV (PP3, PM1, PM2 e PP5)	0,336	0,000117	Provavelmente patogênico	60,94	Het	Reparo de ligação cruzada no DNA
Fc3232	62	<i>G6PC</i>	c.247C>T	<i>p. Arg83Cys</i>	V (PP5, PM1, PM2, PM5 e PP3)	0,829	0,000534	Patogênica	49,8	Het	Regula o nível de glicose no sangue
Fc1874	59	<i>MLH1</i>	c.827T>C	<i>p. Ile276Thr</i>	V (PM2, PM5, PP2, PP3)	0,849	0,000003	Significado incerto	49,38	Het	Supressor tumoral
Fc3386	30	<i>MLH1</i>	c.94A>G	<i>p. Ile32Val</i>	IV (PM1, PM2, PM5 e PP2)	0,415	0,0000106	Conflito	50,71	Het	Supressor tumoral
Fc2000	39	<i>MUTYH</i>	c.536A>G	<i>p. Tyr179Cys</i>	V (PS3, PM1, PM2, PP3, PP5)	0,963	NC	Patogênica/Provavelmente patogênica	47,1	Het	Supressor tumoral
Fc2111	32	<i>MUTYH</i>	c.1187G>A	<i>p. Gly396Asp</i>	V (PS3, PS4, PM5)	0,954	NC	Patogênica/Provavelmente patogênica	50	Het	Supressor tumoral
Fc2650	34	<i>MUTYH</i>	c.1187G>A	<i>p. Gly396Asp</i>	V (PM1, PM5, PP3, PP5, PS3)	0,954	NC	Patogênica/Provavelmente patogênica	56,50	Het	Supressor tumoral
Fc2000	39	<i>NTRK1</i>	c.37del	<i>p. Val13Tyrfs</i> *5	IV (PVS1, PM2)	NC	NC	Não reportada	46,72	Het	Receptor tirosina quinase
Fc2878	45	<i>PALB2</i>	c.840del	<i>p. Asn280Lysfs</i> *3	V (PVS1, PM2, PP5)	NC	NC	Patogênica	55,22	Het	Recombinação Homóloga
Fc3138	74	<i>PALB2</i>	c.2470del	<i>p. Cys824Valfs</i> *27	V (PVS1, PP5, PM2)	NC	NC	Patogênica	50,36	Het	Recombinação

											homóloga
Fc2792	68	<i>PMS2</i>	c.2186_2187del	<i>p. Leu729Glnfs*6</i>	IV (PVS1, PP5)	NC	NC	Significado incerto	26	Het	Importante na via de MMR
Fc2528	65	<i>RAD51C</i>	c.890_899del	<i>p. Leu296Hisfs*2</i>	IV (PVS1, PM2)	NC	NC	Patogênica	51,76	Het	Recombinação Homóloga
Fc2791	55	<i>RAD51D</i>	c.694C>T	<i>p. Arg232*</i>	V (PVS1, PM2, PP3, PP5)	NC	NC	Patogênica	49,19	Het	Recombinação Homóloga
Fc1958	44	<i>SBDS</i>	c.258+2T>C		V (PVS1, PM2, PP3, PP5)	NC	NC	Patogênica/ Provavelmente patogênica	45,61	Het	Biogênese dos ribossomos.
Fc2186	19	<i>TP53</i>	c.524G>A	<i>p. Arg175His</i>	V (PP5, PM1, PM2, PM5, PP2 e PP3)	0,922	0,000003 98	Patogênica	47,16	Het	Supressor tumoral
Fc3296	57	<i>TP53</i>	c.742C>T	<i>p. Arg248Trp</i>	V (PP5, PS3, PM1, PM2, PM5, PP2 e PP3)	0,927	0,000003 98	Patogênica	45,26	Het	Supressor tumoral
Fc1903	65	<i>WRN</i>	c.1273_1276del	<i>p. Ser426Pro fs*11</i>	IV (PVS1, PM2)	NC	NC	Não reportada	55,78	Het	Família Helicase (RecQ)

NC = Não consta, Het = Heterozigidade. Consulta no clinvar: 21/01/2022

Além das variantes classes IV e V identificadas, variantes classe III (VUS) foram identificadas em 85 pacientes. Dentre os genes contendo essas variantes, faz-se importante destacar alguns que mesmo obtendo um VAF (*Variant allele frequency*) próxima de 50% (o que seria esperado para variantes em heterozigose em genes supressores tumorais) e com algoritmos de predição *in silico* apontando altos escores de patogenicidade, não encontramos evidências suficientes para aumentar seu grau de patogenicidade para IV ou V. Na tabela 9, é possível observar uma lista dessas variantes classificadas como VUS.

A listagem completa de todas as variantes classe III identificadas encontra-se no anexo 4.

Tabela 9: Variantes Classe III (VUS) com alto VAF e alto escore de REVEL.

ID	Gene	cDNA – HGVS	p. HGVS	VAF	ACMG (revisão manual)	REVEL	Gnomad (ALL)	Clinvar
Fc3099	<i>ATM</i>	c.8560C>T	p. Arg2854Cys	56,48	PM1, PM2, PP3, BP6	0,904	0,000173	Conflito
Fc2941	<i>BARD1</i>	c.1439C>T	p. Leu480Ser	53,07	PM1, PM2, PP3	0,952	0,0000177	Significado incerto
Fc1845	<i>CDH1</i>	c.2351G>A	p. Arg784His	53,33	PM2, PP3	0,732	0,0000398	Significado incerto
Fc1965	<i>CHEK2</i>	c.475T>C	p. Tyr159His	52,89	PM1, PM2, PP3	0,836	NC	Conflito
Fc2552	<i>ERCC6</i>	c.1928T>C	p. Val643Ala	50	PM1, PM2	0,835	0,0000398	Não reportada
Fc2654	<i>EXT2</i>	c.1067G>A	p. Gly356Glu	42,10	PM2, PP3	0,964	0,0000795	Não reportada
Fc2792	<i>MEN1</i>	c.343C>G	p. Arg115Gly	42,268	PM2, PP2, PP3	0,905	NC	Significado incerto
Fc2878	<i>MSH2</i>	c.1045C>G	p. Pro349Ala	41,80	PM2, PM5, PP3	0,993	0,0000884	Conflito
Fc3121	<i>MSH6</i>	c.2347T>A	p. Cys783Ser	42,76	PM1, PM2, PP3	0,857	0,00000708	Significado incerto
Fc2792	<i>MUTYH</i>	c.650G>A	p. Arg217His	50	PM2, PP3, PP5	0,772	NC	Patogênica/ Provavelmente e Patogênica

Fc2142	<i>PTCH1</i>	c.1324G>A	p. Val442Met	41,81	BS2, BP1, PP3	0,743	0,0000212	Significado incerto
Fc2182	<i>RET</i>	c.2371T>A	p. Tyr791Asn	48,01	PM2, PM5, PP3	0,745	0,000046	Significado incerto
Fc2989	<i>SDHC</i>	c.160C>A	p. Pro54Thr	45,08	PM1, PM2, PP3	0,969	NC	Significado incerto
Fc3021	<i>XRCC3</i>	c.283G>A	p. Gly95Ser	44,22	PM1, PM2, PP3	0,79	0,0000134	Não reportada

NC = Não Consta. Consulta clinvar: 21/01/2022

9.2 HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER

Em relação à história familiar de câncer das pacientes incluídas no projeto, do total de 126 pacientes, somente 33 (26,2%) não apresentaram nenhum histórico familiar de câncer. Das 93 pacientes que relataram a presença de câncer na família, 20 (15,9%) possuíam ao menos 1 familiar de primeiro ou segundo grau com câncer de mama; 15 (11,9%) apresentavam algum familiar de primeiro ou segundo grau com câncer de próstata e somente 4 (3,17%) pacientes continham um familiar com câncer de ovário. A história familiar das 126 pacientes incluídas no projeto encontra-se no anexo 5.

Correlacionando o perfil mutacional das pacientes e sua história familiar de câncer, 76,9% da nossa casuística de pacientes mutadas, possuem ao menos um familiar de primeiro ou segundo grau com câncer. Das sete pacientes identificadas com variantes germinativas patogênicas nos genes da família Fanconi, três pacientes não apresentaram história familiar de câncer (Fc2727 – *FANCA*, c.3385G>C, Fc2163 – *FANCD2*, c.696-1G>A, Fc2959 – *FANCE*, c.1114-1G>A), contudo, as outras quatro pacientes apresentaram história familiar positiva para câncer no sistema digestivo. Dentre essas pacientes, somente uma apresentou idade ao diagnóstico após 50 anos (Fc3286 – *FANCD2*, c.1278+3_1278+6del).

Em relação as pacientes com variante germinativa patogênica no gene *MUTYH*, (Fc2000, c.536A>G, Fc2650, c.1187G>A e Fc2111, c.1187G>A) as três apresentaram diagnóstico de câncer de mama antes dos 40 anos, contudo, somente uma não apresentou história familiar de câncer.

No que se refere à presença de câncer de mama, importante mencionar que a paciente Fc2186 (*TP53* – c.524G>A) apresentou mais três casos de câncer de mama na família, além da probanda. No caso das pacientes com variante patogênica nos genes *RAD51C* e *PALB2*, ambos os casos apresentaram mais um caso de câncer de mama na família além do diagnosticado na probanda. Um detalhamento destas informações de história familiar pode ser encontrado na tabela 10.

Tabela 10: Variantes Patogênicas e patogênicas e as histórias familiares de suas portadoras.

ID	Diagnóstico (Idade)	Variante patogênica Gene (c.)	História Familiar* (familiares de primeiro e segundo grau)#
Fc3301	29	<i>ALK (c.1154+1G>A)</i>	Câncer de Esôfago (F, SI), Câncer de Útero (F, SI)
Fc2121	31	<i>CDKN2A (c.301G>T)</i>	Câncer de Próstata, (M,58)
Fc2562	47	<i>CYLD (c.2263C>T)</i>	Câncer pouco diferenciado (F, 52)
Fc3256	32	<i>EPHB2 (c.3059del)</i>	Câncer de Pele (M,45)
Fc2727	46	<i>FANCA (c.3385G>C)</i>	Sem História Familiar
Fc2163	24	<i>FANCD2 (c.696-1G>A)</i>	Sem História Familiar
Fc2936	39	<i>FANCD2 (c.1278+3_1278+6del)</i>	Câncer de estômago (M, 60), Câncer de pele (M, SI)
Fc3286	52	<i>FANCD2 (c.1278+3_1278+6del)</i>	Câncer de Reto (F, SI)
Fc3320	42	<i>FANCD2 (c.1278+3_1278+6del)</i>	Câncer de Cólon (F, SI)
Fc2959	34	<i>FANCE (c.1114-1G>A)</i>	Sem História Familiar
Fc3074	32	<i>FANCE (c.1111C>T)</i>	Câncer de Cólon (F, 65)
Fc3232	62	<i>G6PC (c.247C>T)</i>	Sem História Familiar
Fc3386	30	<i>MLH1 (c.94A>G)</i>	Câncer de Útero (F, SI)
Fc1874	59	<i>MLH1 (c.827T>C)</i>	Leucemia (M,58), Câncer de estômago (F,52)
Fc2000	39	<i>MUTYH (c.536A>G)</i>	Câncer de garganta (M, 45), Câncer de Cólon (F, 53)
Fc2111	32	<i>MUTYH (c.1187G>A)</i>	Sem História Familiar

Fc2650	34	<i>MUTYH</i> (c.1187G>A)	Câncer de cólon (F, 49)
Fc2000	39	<i>NTRK1</i> (c.37delG)	Câncer de garganta (M, 45), Câncer de Cólon (F, 53).
Fc2878	45	<i>PALB2</i> (c.840del)	Câncer de boca (M, 52), Câncer de mama (F, 45)
Fc3138	74	<i>PALB2</i> (c.2470del)	Câncer de bexiga (M, SI), Câncer gástrico (M, SI), Câncer de esôfago (M, SI)
Fc2792	68	<i>PMS2</i> (c.2186_2187del)	Câncer de garganta (M, 40)
Fc2528	65	<i>RAD51C</i> (c.890_899del)	Câncer de garganta (M, 45; M, 45), Câncer de útero e Câncer de mama (F, 60 e 81 anos)
Fc2791	55	<i>RAD51D</i> (c.694C>T)	Câncer de língua (M, SI)
Fc1958	44	<i>SBDS</i> (c.258+2T>C)	Sem história familiar
Fc2186	19	<i>TP53</i> (c.524G>A)	Câncer de mama e adrenal (F,14 e 17), Câncer de Fígado (M, 35), Câncer de mama (F, 35), Câncer de mama (F,42), Câncer de Fígado (F, 69)
Fc3296	57	<i>TP53</i> (c.742C>T)	Sem História Familiar
Fc1903	65	<i>WRN</i> (c.1273_1276delTTAT)	Câncer de útero (F,58), câncer de estômago (F,69), Câncer cerebral (F,SI), Câncer de mama (F,SI).

M= Masculino, F= Feminino, SI= Sem Informação acerca da idade.

*Os familiares não foram testados para a variante encontrada no caso índice, portanto, não é possível afirmar que esses tumores apresentam relação com a variante identificada.

#Não foi contabilizado, nesta coluna, o tumor da probanda.

9.3 ANÁLISES DE ANCESTRALIDADE.

Após as análises moleculares, realizou-se a análise de ancestralidade de todas as 126 pacientes sendo feito a análise de proporção da casuística, separando as pacientes com variantes germinativas não-*BRCA1/2* das pacientes que não apresentaram nenhuma variante (WT). É possível perceber através da figura 13 que a ancestralidade europeia apresentou maior proporção com 57,99%, seguida da ancestralidade africana com uma porcentagem de 22,75%, sendo a ameríndia responsável por 9,92% e a asiática correspondente a apenas 9,31% da nossa casuística.

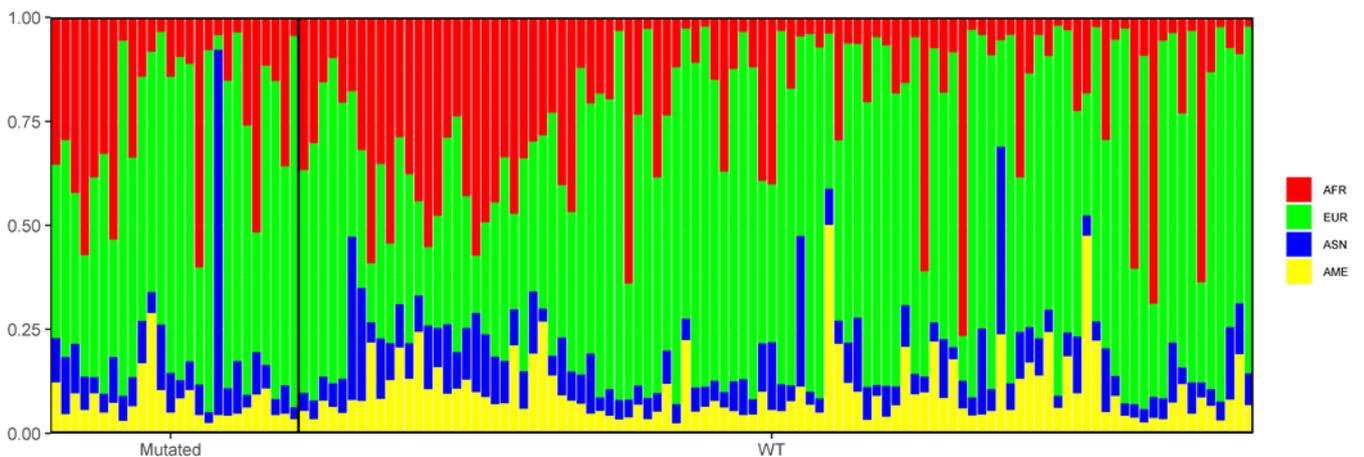


Figura 13: Proporção das ancestralidades analisadas na população de estudo.

Foram realizadas correlações das quatro ancestralidades (africana, europeia, asiática e ameríndia) com algumas variáveis clínicas e também com a sobrevivência dessas pacientes. Contudo, foi possível observar que somente o grau histológico obteve resultado estatisticamente significativo com a ancestralidade ameríndia (tabela 14), enquanto, as outras variáveis não obtiveram nenhuma correlação com as outras ancestralidades. Esses resultados podem ser observados nas tabelas 11, 12 e 13.

Tabela 11: Correlação da ancestralidade africana com variáveis clínicas.

Características	Variáveis	Ancestralidade Africana n (%)			p valor
		Baixo	Intermediário	Alto	
Idade	< 50	24 (58,5)	25 (58,1)	29 (69,0)	0,531 ⁺
	≥ 50	17 (41,5)	18 (41,9)	13 (31,0)	
	Total n (%)	41 (100,0)	43 (100,0)	42 (100,0)	
Grau	Grau I	0 (0,0)	3 (7,0)	1 (2,4)	0,499*
Histológico	Grau II	17 (41,5)	14 (32,6)	17 (41,5)	
	Grau 3	24 (58,5)	26 (60,5)	23 (56,1)	
	Total n (%)	41 (100,0)	43 (100,0)	41 (100,0)	
Estadiamento	IIa	0 (0,0)	3 (7,0)	3 (7,1)	0,099*
	IIb	12 (29,3)	15 (34,9)	9 (21,4)	
	IIIa	1 (2,4)	2 (4,7)	7 (16,7)	
	IIIb	14 (34,1)	8 (18,6)	13 (31,0)	
	IIIc	14 (34,1)	15 (34,9)	10 (23,8)	
	Total n (%)	41 (100,0)	43 (100,0)	42 (100,0)	
Tamanho do tumor	T1 ou T2	14 (34,1)	16 (37,2)	10 (23,8)	0,742 ⁺
	T3	16 (39,0)	16 (37,2)	18 (42,9)	
	T4	11 (26,8)	11 (25,6)	14 (33,3)	
	Total n (%)	41 (100,0)	43 (100,0)	42 (100,0)	

⁺Teste Qui-Quadrado, *Exato de Fisher

Tabela 12: Correlação da ancestralidade europeia com variáveis clínicas.

		Ancestralidade Europeia n (%)			
Características	Variáveis	Baixo	Intermediário	Alto	p valor
Idade	< 50	26 (61,9)	28 (66,7)	24 (57,1)	0,702 ⁺
	≥ 50	16 (38,1)	14(33,3)	18 (42,9)	
	Total n (%)	42 (100,0)	42 (100,0)	42 (100,0)	
Grau	Grau I	0 (0,0)	3 (7,1)	1 (2,4)	0,182 [*]
Histológico	Grau II	12 (29,3)	18 (42,9)	18 (42,9)	
	Grau 3	29 (70,7)	21 (50,0)	23 (54,8)	
	Total n (%)	41 (100,0)	42 (100,0)	42 (100,0)	
Estadiamento	Ila	3 (7,1)	2 (4,8)	1 (2,4)	0,433 [*]
	IIb	10 (23,8)	14 (33,3)	12 (28,6)	
	IIIa	6 (14,3)	3 (7,1)	1 (2,4)	
	IIIb	12 (28,6)	8 (19,0)	15 (35,7)	
	IIIc	11 (26,2)	15 (35,7)	13 (31,0)	
	Total n (%)	42 (100,0)	42 (100,0)	42 (100,0)	
Tamanho do tumor	T1 ou T2	12 (28,6)	13 (31,0)	15 (35,7)	0,966 ⁺
	T3	18 (42,9)	17 (40,5)	15 (35,7)	
	T4	12 (28,6)	12 (28,6)	12 (28,6)	
	Total n (%)	42 (100,0)	42 (100,0)	42 (100,0)	

*Exato de fisher, ⁺ Teste Qui-Quadrado.

Tabela 13: Correlação da ancestralidade asiática com variáveis clínicas.

		Ancestralidade Asiática n (%)			
Características	Variáveis	Baixo	Intermediário	Alto	p valor
Idade	< 50	21 (53,8)	28 (60,9)	29 (70,7)	0,296 ⁺
	≥ 50	18 (46,2)	18 (39,1)	12 (29,3)	
	Total n (%)	39 (100,0)	46 (100,0)	41 (100,0)	
Grau	Grau I	1 (2,6)	2 (4,3)	1 (2,5)	0,974*
Histológico	Grau II	16 (41,0)	18 (39,1)	14 (35,0)	
	Grau 3	22 (56,4)	26 (56,5)	25 (62,5)	
	Total n (%)	39 (100,0)	46 (100,0)	40 (100,0)	
Estadiamento	IIa	0 (0,0)	3 (6,5)	3 (7,3)	0,085*
	IIb	7 (17,9)	15 (32,6)	14 (34,1)	
	IIIa	4 (10,3)	1 (2,2)	5 (12,2)	
	IIIb	10 (25,6)	14 (30,4)	11 (26,8)	
	IIIc	18 (46,2)	13 (28,3)	8 (19,5)	
	Total n (%)	39 (100,0)	46 (100,0)	41 (100,0)	
Tamanho do tumor	T1 ou T2	7 (17,9)	15 (32,6)	18 (46,9)	0,098 ⁺
	T3	18 (46,2)	16 (34,8)	16 (39,0)	
	T4	14 (35,9)	15 (32,6)	7 (17,1)	
	Total n (%)	39 (100,0)	46 (100,0)	41 (100,0)	

⁺ Teste Qui-Quadrado, * Exato de Fisher

Tabela 14: Correlação da ancestralidade ameríndia com variáveis clínicas.

		Ancestralidade Ameríndia n (%)			
Características	Variáveis	Baixo	Intermediário	Alto	p valor
Idade	< 50	21 (50,0)	28 (66,7)	29 (69,0)	0,184 ⁺
	≥ 50	21(50,0)	14 (33,3)	13 (31,0)	
	Total n (%)	42 (100,0)	42 (100,0)	42 (100,0)	
Grau	Grau I	4 (9,5)	0 (0,0)	0 (0,0)	0,019*
Histológico	Grau II	15 (35,7)	21 (51,2)	12 (28,6)	
	Grau III	23 (54,8)	20 (48,8)	30 (71,4)	
	Total n (%)	42 (100,0)	41 (100,0)	42 (100,0)	
Estadiamento	IIa	1 (2,4)	2 (4,8)	3 (7,1)	0,901*
	IIb	14 (33,3)	10 (23,8)	12 (28,6)	
	IIIa	2 (4,8)	4 (9,5)	4 (9,5)	
	IIIb	13 (31,0)	13 (31,0)	9 (21,4)	
	IIIc	12 (28,6)	13 (31,0)	14 (33,3)	
	Total n (%)	42 (100,0)	42 (100,0)	42 (100,0)	
Tamanho do tumor	T1 ou T2	14 (33,3)	12 (28,6)	14 (33,3)	0,705 ⁺
	T3	19 (45,2)	15 (35,7)	16 (38,1)	
	T4	9 (21,4)	15 (35,7)	12 (28,6)	
	Total n (%)	42 (100,0)	42 (100,0)	42 (100,0)	

*Exato de Fisher, ⁺ Teste Qui-Quadrado

Após essas análises, foram realizadas correlações das ancestralidades com a sobrevida global. Pode-se observar que, a ancestralidade africana (figura 14), europeia (figura 15) e ameríndia (figura 16), não apresentaram associação estatisticamente significativa em relação ao aumento de sobrevida. Contudo, a ancestralidade asiática, obteve um p significativo igual a 0,001 (figura 17), o que podemos supor que pacientes com ancestralidade asiática apresentam uma maior sobrevida em relação as pacientes com outras ancestralidades.

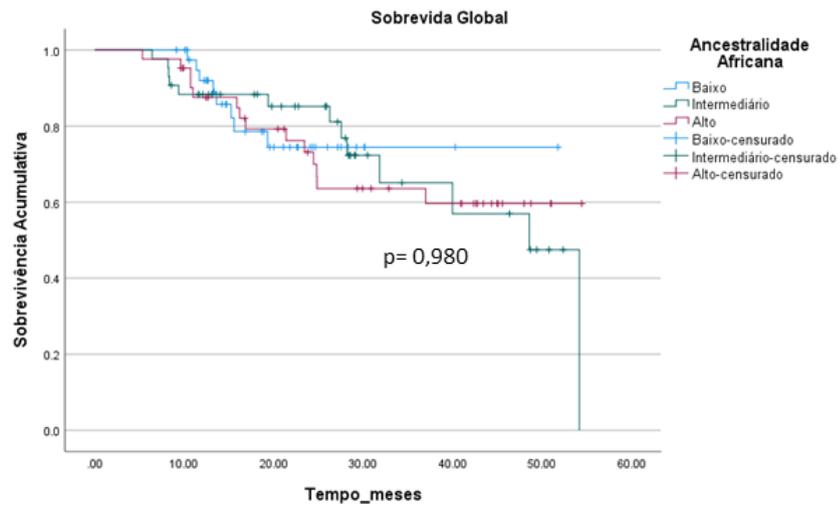


Figura 14: Análise de sobrevida global em relação a ancestralidade africana.

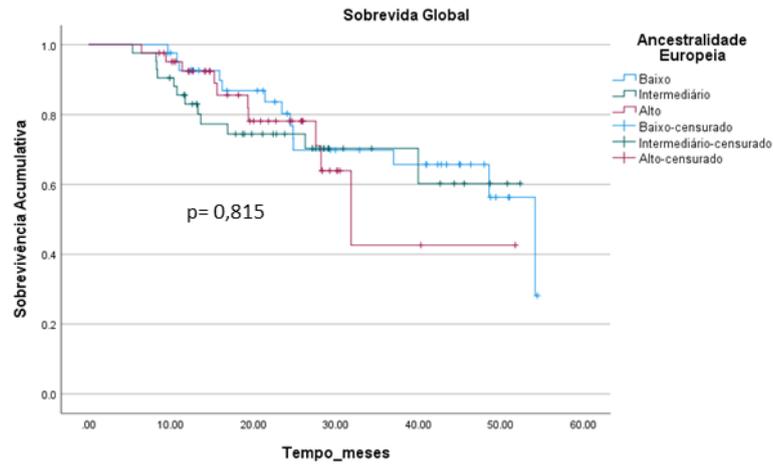


Figura 15: Análise de sobrevida global em relação a ancestralidade europeia.

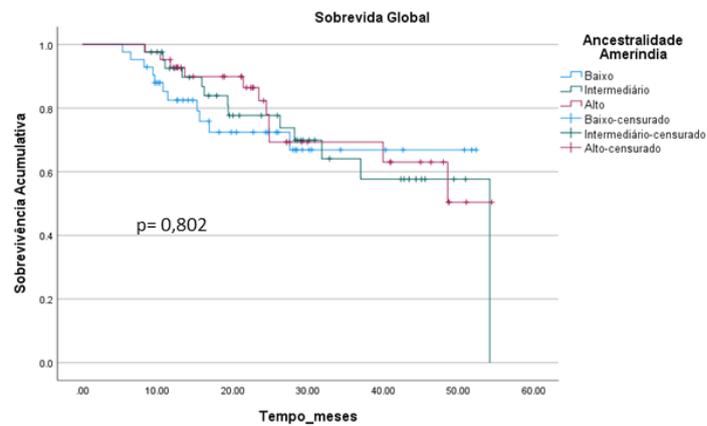


Figura 16: Análise de sobrevida global em relação a ancestralidade ameríndia.

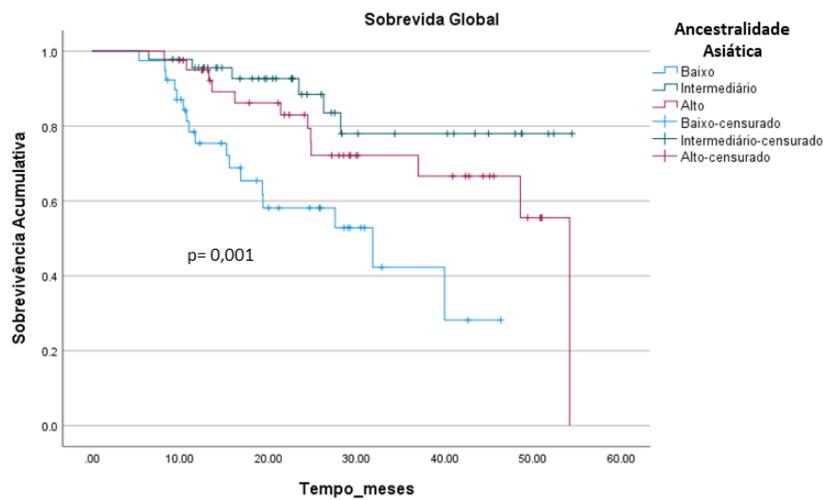


Figura 17: Análise de sobrevivência global em relação a ancestralidade asiática.

9.4 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DA CASUÍSTICA E CORRELAÇÃO DOS DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS COM O PERFIL MUTACIONAL

Realizou-se também, correlações das pacientes com presença e ausência de variantes patogênicas, com suas características clínicas e histopatológicas, como pode ser observado na tabela 15.

Tabela 15: Correlação de variáveis clínicas com a presença ou não de variantes patogênicas germinativas não *BRCA1/2*.

Características	Variáveis	Sem variantes germinativas patogênicas	Variante patogênicas germinativas não <i>BRCA1/2</i>	p valor
		N (%)	N (%)	
Idade	Mediana	46,5 (25 – 79)	43,0 (19 – 74)	0,244 [#]
	< 50	61 (61,0)	17(65,4)	
	≥ 50	39 (39,0)	9 (34,6)	0,822 ⁺
	Total n (%)	100 (100,0)	26 (100,0)	
Tipo Histológico	Ductal	92 (92,0)	22 (84,6)	
	Outros	7 (7,0)	2 (7,7)	0,150 [*]

	Ignorado	1 (1,0)	2 (7,7)	
	Total n (%)	100 (100,0)	26 (100,0)	
Tamanho do Tumor	T1 ou T2	32 (32,0)	8 (30,8)	
	T3	40 (40,0)	10 (38,5)	
	T4	28 (28,0)	8 (30,8)	>0,99 ⁺
	Total n (%)	100 (100,0)	26 (100,0)	
Status axilar	N0	41 (41,0)	10 (38,5)	
	N1 – N3	59 (59,0)	16 (61,5)	0,828 ⁺
	Total n (%)	100 (100,0)	26 (100,0)	
Grau Histológico	I	4 (4,0)	0 (0,0)	
	II	39 (39,0)	9 (34,6)	
	III	57 (57,0)	16 (61,5)	0,285 [*]
	Ignorado	0 (0,0)	1 (3,8)	
	Total n (%)	100 (100,0)	26 (100,0)	
ECOG	0	82 (82,0)	20 (76,9)	
	1 -2	17 (17,0)	5 (19,2)	
	Indisponível	1 (1,0)	1 (3,8)	0,450 [*]
	Total n (%)	100 (100,0)	26 (100,0)	
História Familiar de mama e/ou ovário	Sim	22(22,0)	4 (15,4)	
	Não	78 (78,0)	22 (84,6)	
	Total n (%)	100 (100,0)	26 (100,0)	0,591 ⁺

[#]Teste não paramétrico de Mann-Whitney, ^{*}Teste exato de fisher, ⁺Teste Qui-quadrado

Observa-se na tabela 15, que as características clínicas correlacionadas com o perfil mutacional das pacientes não alcançaram significância estatística. No entanto, nota-se que a idade mediana ao diagnóstico das pacientes com variantes germinativas patogênicas foi menor quando comparado com a idade das pacientes *WT* (43 anos vs 46,5 anos).

9.5 ANÁLISES CLÍNICAS: CORRELAÇÃO DAS VARIANTES ENCONTRADAS COM A RPC E TRATAMENTO

Para a análise da resposta patológica completa e do tratamento e sua correlação com os dados moleculares, utilizamos dados provenientes do ensaio clínico NACATRINE. Por esse motivo, o tamanho amostral considerado para essa análise difere dos 126 pacientes considerados nas demais análises. 13 pacientes foram excluídas devido à progressão da doença ou evolução para óbito por câncer, ou outras causas, antes da randomização do tratamento ou a realização da cirurgia. Portanto, para as análises clínicas o N total é de 113 pacientes.

Realizou-se a correlação do perfil mutacional com variáveis clínicas, como a Rpc, a cirurgia e o tratamento, e, como pode ser observado na tabela 16, nenhuma destas variáveis apresentou significância estatística com a presença de variantes patogênicas.

Tabela 16: Correlação de variáveis clínicas com a presença ou não de variantes patogênicas não *BRCA1/2*.

Características	Variáveis	Sem variantes germinativas patogênicas N (%)	Variantes patogênicas germinativas não <i>BRCA1/2</i> N (%)	p valor
Rpc	Sim	25 (27,2)	4 (19,0)	0,584 ⁺
	Não	67 (72,8)	17 (81,0)	
	Total n (%)	92 (100,0)	21 (100,0)	
Cirurgia	Mastectomia	58 (63,0)	12 (57,1)	0,627 ⁺
	Quadrantectomia	34 (37,0)	9 (52,9)	
	Total n (%)	92 (100,0)	21 (100,0)	
Tratamento	Paclitaxel	48 (52,2)	10 (47,6)	0,810 ⁺
	Paclitaxel +	44 (47,8)	11 (52,4)	
	Carboplatina			
	Total n (%)	92 (100,0)	21 (100,0)	

⁺Teste Qui-Quadrado.

Em seguida, analisou-se a probabilidade de alcance da Rpc em relação ao uso de carboplatina ou não, com a presença de variantes germinativas patogênicas. Pode-se constatar na tabela 17, que pacientes com a presença de variantes germinativas patogênicas tratadas com Paclitaxel apresentaram 1,8 vezes mais chance de alcançar a Rpc em relação àquelas pacientes tratadas com Paclitaxel + Carboplatina, porém, esses dados não demonstraram significância estatística.

Tabela 17: Taxa de Rpc de acordo com o status de mutação germinativa não *BRCA1/2* e braço de tratamento.

Tipo de tratamento	Rpc		OR (95% IC)	p Valor
	Sim	Não		
Sem Carboplatina n (%)				
Total N= 58				
Mutado (exceto <i>BRCA1/2</i>) N= 10	3	7	1,86 (0,40 – 8,62)	0,417*
WT N= 48	9	39		
Com Carboplatina n (%)				
Total N= 55				
Mutado (exceto <i>BRCA1/2</i>) N= 11	1	10	0,175 (0,02 – 1,49)	0,143*
WT N= 44	16	28		

*Teste exato de fisher.

Logo após, analisou-se a chance da Rpc por braço de tratamento e *status* da mutação. Como pode ser observado na tabela 18, pacientes sem mutação, ou seja, o grupo de pacientes *Wild Type*, apresentaram 2 vezes mais chances de responder melhor ao tratamento com carboplatina quando comparado com as pacientes do grupo que possuíam mutações não *BRCA1/2*, contudo, esses resultados também não apresentaram significância estatística.

Tabela 18: Comparação da Taxa de Rpc por braço de tratamento e status de mutação.

Tratamento com Carboplatina vs sem Carboplatina	Rpc	
	OR (95%)	p Valor
Com Carboplatina vs Sem Carboplatina (Total)	1,75 (0,73 – 4,03)	0,282 ⁺
Com Carboplatina vs Sem Carboplatina (Mutado)	0,233 (0,02 – 2,73)	0,311*
Com Carboplatina vs Sem Carboplatina (WT)	2,47 (0,96 – 6,40)	0,065 ⁺

*T exato de fisher, +Teste Qui-Quadrado

Do total de pacientes identificadas com variantes germinativas patogênicas, 4 (15,4%) apresentaram variantes germinativas em genes presentes na via de recombinação homóloga. A paciente Fc2528 que apresentou variante germinativa patogênica no gene *RAD51C*, possuía 65 anos ao diagnóstico, CMTN grau II, estadiamento IIIb, foi excluída do estudo nacatrine e não realizou cirurgia. A Fc2791 apresentou variante germinativa no gene *RAD51D*, possuía 55 anos ao diagnóstico, tumor grau II e estadiamento IIb, não apresentou Rpc, contudo, continua em seguimento no estudo. Duas pacientes apresentaram variantes germinativas patogênicas no gene *PALB2* (Fc2878, Fc3138). A Fc2878, possuía 45 anos ao diagnóstico, com tumor grau III e estadiamento IIIc, realizou cirurgia, mas não alcançou a Rpc, vindo a ter progressão da doença e evoluiu à óbito no ano de 2021. A paciente Fc3138, tinha 74 anos ao diagnóstico, com tumor grau II e estadiamento IIIc, alcançou a Rpc e continua em seguimento pelo estudo clínico nacatrine.

9.6 ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL E SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA.

Foi analisada a sobrevida global (SG) das 113 pacientes (figura 18), em relação ao tratamento. Para analisar a SG dessas pacientes utilizou-se a data do óbito daquelas pacientes que evoluíram à óbito, tanto por câncer, quanto por outras doenças.

Pode-se observar que as pacientes do braço com tratamento experimental (Paclitaxel + Carboplatina) apresentaram uma sobrevida global mediana de 54, 18 meses, enquanto que,

as pacientes que receberam somente o tratamento padrão não apresentaram tempo médio de sobrevida global, pois, a curva não atingiu os 50% necessários para realizar a medição. Esse resultado não foi estatisticamente significativo.

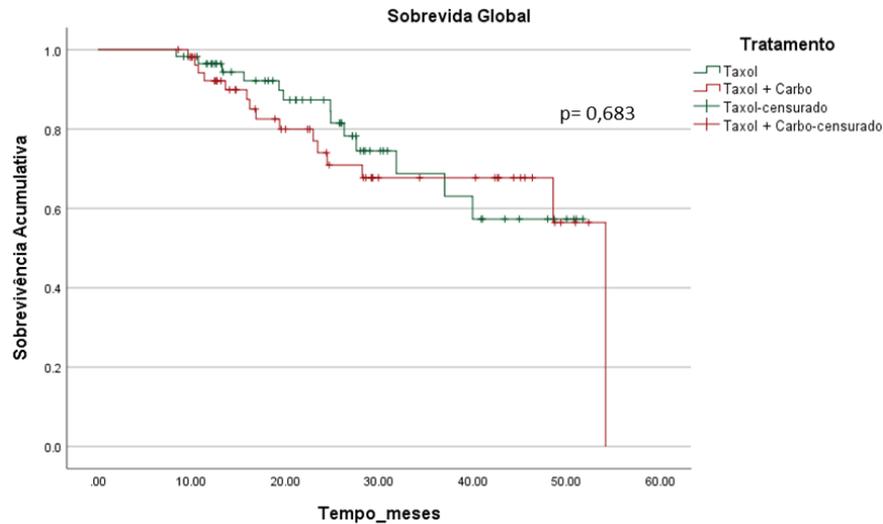


Figura 18: Curva de sobrevida Global em relação ao tratamento.

Em seguida, analisou-se a sobrevida livre de doença (figura 19) das mesmas pacientes (N = 113). Para realização das análises da sobrevida livre de doença (SLD), utilizaram-se as datas de recidiva das pacientes com metástase, a data do óbito para aquelas que evoluíram à óbito e a data da última informação das pacientes que estão vivas.

Na curva de sobrevida livre de doença, pudemos observar que os dois grupos, tanto as pacientes que receberam paclitaxel quanto aquelas que receberam paclitaxel mais carboplatina, apresentaram o mesmo número de eventos (N=15), porém, devido ao fato, do grupo de pacientes que receberam somente paclitaxel possuir 3 pacientes a mais que o tratamento experimental a porcentagem de eventos foi menor (25,9%). Enquanto que as pacientes que receberam paclitaxel mais carboplatina a porcentagem de eventos foi de 27,3%. O tempo mediano de sobrevida livre de doença não pode ser atingido em nenhum dos dois grupos. Essas análises não apresentaram significância estatística.

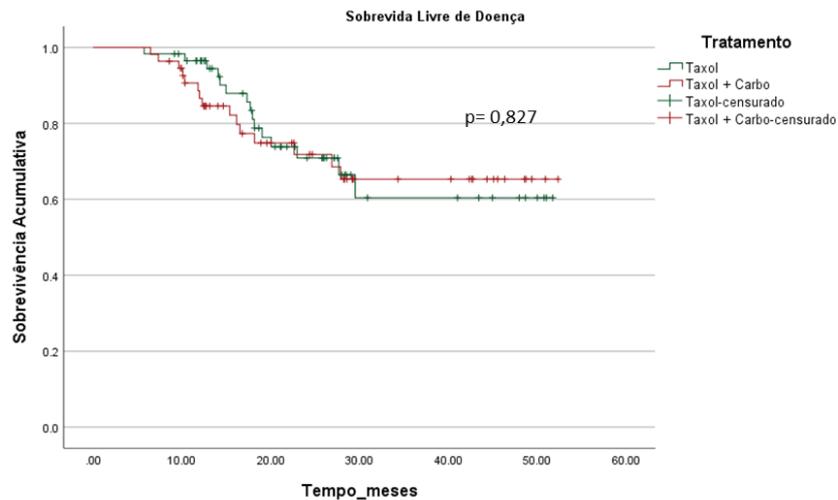


Figura 19: Curva de sobrevida livre de doença em relação ao tratamento.

Por fim analisou-se a sobrevida das pacientes correlacionando com o perfil mutacional das mesmas. Para isso, utilizamos as 126 pacientes, analisadas molecularmente. Analisou-se a SG e a SLD dessas pacientes, e pode-se observar na figura 20, que nenhuma das duas curvas apresentou relevância significativa.

Na sobrevida global, as pacientes que não apresentaram nenhuma variante patogênica germinativa (*WT*), demonstraram um tempo mediano de sobrevida de 57,18 meses. Contudo, as pacientes com variantes patogênicas não alcançaram os 50% necessários para realizar a medição. Em relação à sobrevida livre de doença, as pacientes *WT* apresentaram um total de 35 (38,9%) eventos, enquanto as pacientes com presença de variantes patogênicas germinativas em outros genes não *BRCA1/2* apresentaram 6 (33,3%) eventos. Semelhante a sobrevida global, na sobrevida livre de doença, somente as pacientes *WT* apresentaram um tempo mediano de sobrevida livre de 48,6 meses, visto que, as pacientes com variantes patogênicas não alcançaram os 50% necessários para a medição do tempo de sobrevida.

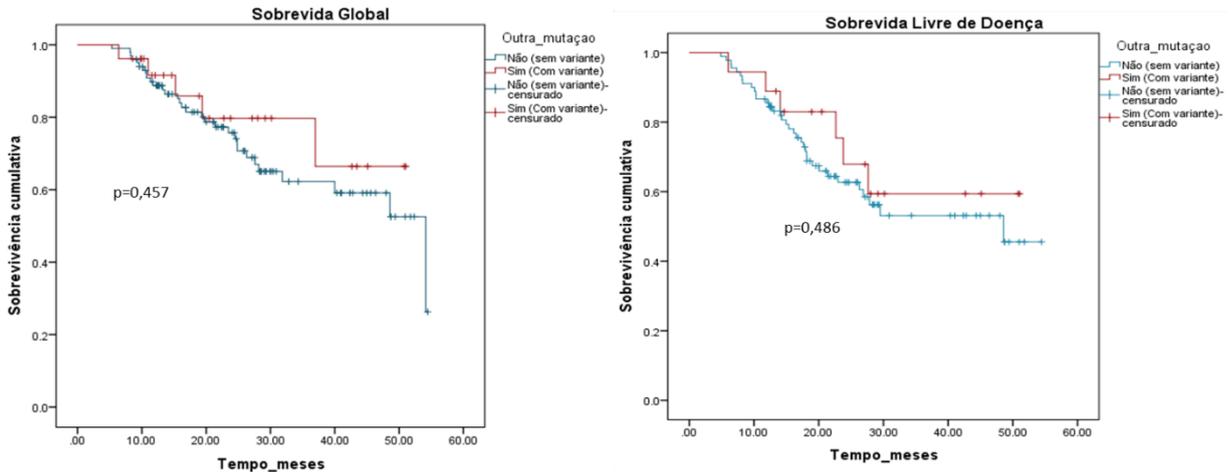


Figura 20: Curvas de SG e SLD das 126 pacientes analisadas molecularmente em relação ao seu perfil mutacional.

10. DISCUSSÃO

No presente estudo foram avaliadas 126 pacientes do sexo feminino, diagnosticadas com câncer de mama triplo negativo. Todas as pacientes foram avaliadas quanto ao seu *status* mutacional em genes associados ao câncer hereditário através do sequenciamento de um painel gênico composto por 298 genes. Estes genes apresentam associação tanto com doenças hereditárias quanto com vias de reparo de danos ao DNA, e com aumento de risco de desenvolvimento de alguns cânceres.

Dentre as pacientes avaliadas, 26 (20,6%) pacientes não aparentadas apresentaram variantes germinativas patogênicas (IV e V), totalizando 27 variantes (21,46%). Do total de pacientes, 85 (67,46%) possuíam ao menos uma variante classe III, resultando em 149 variantes VUS.

O percentual de pacientes com câncer de mama e com variantes germinativas patogênicas varia amplamente nos estudos da literatura, dependendo muito das populações analisadas, dos critérios de inclusão considerados, do tamanho e composição do painel gênico avaliado. Couch e colaboradores, em um estudo multicêntrico, publicado em 2015, avaliaram a presença de variantes germinativas em 17 genes de susceptibilidade ao câncer de mama triplo negativo. Foram incluídas 1.824 pacientes e os autores observaram que somente 3,67% da casuística apresentaram variantes germinativas em genes não *BRCA1* e *BRCA2*.⁶⁵

No entanto, em outro estudo publicado por Couch e colaboradores em 2017, os autores analisaram a presença de variantes germinativas em 21 genes de predisposição ao câncer de

mama através de painéis gênicos customizados, e demonstrou que 6,2% de mulheres com qualquer subtipo de câncer de mama possuíam variantes germinativas em genes não *BRCA1* e *BRCA2*¹⁰⁴.

No entanto, em estudo publicado por Bono e colaboradores em 2021, que buscou analisar variantes patogênicas em outros genes que não *BRCA1* e *BRCA2* em câncer de mama e ovário e também em câncer de pâncreas, os autores mostraram que 24 de 165 (14,5%) das mulheres com câncer de mama apresentavam variantes patogênicas em outros genes de susceptibilidade¹⁰⁵.

Quando avaliamos o perfil mutacional das pacientes do presente estudo que apresentaram variantes germinativas patogênicas, observou-se que para genes considerados de alto risco para o câncer de mama, foram identificadas duas variantes *missenses* no gene supressor tumoral *TP53*, c.524G>A (p.R175H) e c.742C>T (p.R248W). O *TP53* é conhecido como o “guardião do genoma”, responsável por manter o equilíbrio entre a morte e proliferação celular através da regulação do ciclo celular, reparo de DNA, apoptose, metabolismo celular e senescência¹⁰⁶. Em estudo publicado por Li e colaboradores em 2019, os autores destacaram que 96% das variantes germinativas nesse gene em câncer colorretal e outros tumores sólidos ocorrem nos éxons 4,5,6,7 e 8, principalmente nos códons 248, 273, 175, 245, 282 e 249. Os autores também discutem que as variantes encontradas nesse estudo estão intimamente relacionadas com o aumento da proliferação celular, invasão, migração e angiogênese¹⁰⁷.

Variantes germinativas patogênicas em homozigose no gene *TP53*, estão associadas à síndrome de Li-fraumeni, uma síndrome autossômica dominante que apresenta predisposição ao câncer. A Síndrome de Li-fraumeni predispõe a um amplo espectro de neoplasias, incluindo, câncer de mama pré-menopausal, sarcoma de partes moles, sarcoma ósseo, tumores cerebrais, carcinoma adrenocorticais e leucemias¹⁰⁸.

Segundo Han e colaboradores (2017) variantes no gene *TP53* estão associadas a um risco dez vezes maior de desenvolver o câncer de mama e são responsáveis por 2 – 7% dos cânceres de mama em pacientes jovens¹⁰⁹.

Porém, Couch e colaboradores publicou um estudo em 2015, que analisou 17 genes de susceptibilidade ao câncer de mama em uma casuística de 1.824 pacientes com CMTN e encontraram apenas uma variante no gene *TP53*⁶⁵. Mais tarde, Buys e colaboradores em 2017, avaliaram 25 genes através de um painel de genes de predisposição ao câncer hereditário em

um total de 35.000 pacientes com câncer de mama e os autores identificaram que apenas 5 (0,7%) pacientes apresentaram variantes no gene *TP53* no subtipo triplo negativo¹¹⁰. De acordo com Ellsworth e colaboradores, 2019, esses dados sugerem que variantes no gene *TP53* não estão associadas com o aumento no risco do desenvolvimento do câncer de mama triplo negativo⁴⁵.

Outro gene considerado de alto risco para câncer de mama hereditário e com variantes patogênicas identificadas no presente estudo é o supressor tumoral *PALB2*. Foram identificadas duas variantes de perda de função (tipo *frameshift*) em duas pacientes não relacionadas da casuística avaliada (pacientes Fc2878 e Fc3138). O gene *PALB2* (parceiro e localizador do *BRCA2*) também conhecido como *FANCN*, está envolvido no reparo de DNA através da via de recombinação homóloga pela sua interação com o *BRCA1* e *BRCA2*. Embora seja conhecido como o localizador do *BRCA2*, nas próximas etapas da via ele funciona como um mediador proteico entre o *BRCA1* e *BRCA2*, responsável pela formação do complexo *BRCA1/PALB2/BRCA2*. Variantes em homozigose no *PALB2* levam ao fenótipo da anemia de fanconi, enquanto, variantes de perda de função em heterozigose estão associadas com aumento na incidência de câncer de mama¹¹¹.

Antoniou e colaboradores em 2014, destacaram que, pacientes com variantes de perda de função no gene *PALB2* possuem um risco de 8 a 9 vezes maior de desenvolver o câncer de mama até 40 anos e um risco 5 vezes maior de desenvolver o câncer de mama hereditário em qualquer fase da vida¹¹².

Estudos mostram que variantes germinativas em *PALB2* que levam a formação de proteínas truncadas estão altamente associadas com um fenótipo mais agressivo do câncer de mama e 40% dessas variantes ainda podem levar ao subtipo triplo negativo, independentemente da variante específica, concluindo assim, que variantes no gene *PALB2* podem prever um cenário de pior prognóstico em pacientes com câncer de mama¹¹³.

Ainda em genes envolvidos na via de recombinação homóloga, identificamos uma paciente com uma variante *frameshift* no gene *RAD51C*, c.890_899del (p.Leu269Hisfs*2). Essa variante forma um *stop* códon que resulta na perda de 80 aminoácidos na proteína C-terminal¹¹⁴. O gene *RAD51C* é crucial para manter a estabilidade do genoma através da via de recombinação homóloga, pois, liga-se ao DNA de fita simples e forma filamento de nucleoproteínas no local de quebra do DNA. Variantes em homozigose em *RAD51C* (conhecido também como *FANCO*) são associadas à síndrome da anemia de fanconi¹¹⁵. Porém, sabe-se

que variantes em heterozigose nesse gene está associado com predisposição ao câncer de mama e ovário¹¹⁶. LaDuca e colaboradores, demonstraram em seu estudo que variantes patogênicas no gene *RAD51C* possuem de baixo a moderado risco de desenvolver o câncer de mama, enquanto, possuem alto risco de desenvolver o câncer de ovário¹¹⁷.

No gene *RAD51D*, um outro parálogo do gene *RAD51*, foi encontrado uma variante *nonsense* c.694C>T (p.Arg232*). O gene *RAD51D*, assim como o *RAD51C*, desempenha um papel importante na manutenção da integridade do genoma através da via de recombinação homóloga⁴⁵. Shimelis e colaboradores em 2018, mencionaram que apesar da porcentagem de variantes em *RAD51D* em pacientes com CMTN ser baixa (0,3%), o risco de desenvolver o CMTN foi de 6,97, demonstrando assim, que portadoras de variantes germinativas patogênicas no gene *RAD51D* tendem a desenvolver principalmente o subtipo triplo negativo¹¹⁸. Contudo, LaDuca e colaboradores em 2020, demonstraram que variantes em *RAD51D* apresentam risco moderado de duas a cinco vezes tanto para câncer de mama como para câncer de ovário¹¹⁷.

Além de variantes identificadas em genes associados com a via de recombinação homóloga. Foram identificadas variantes em genes envolvidos na via MMR (*mismatch repair*). Duas pacientes apresentam variantes classe IV e V no gene no gene *MLH1* (*MutL homolog 1*), Fc3386, c.94A>G (p.I32V), Fc1874, c.827T>C (p.I276T), respectivamente, e uma paciente Fc2792 (c.2186_2187del, p. Leu729Glnfs*6) apresentou variante *frameshift* no gene *PMS2* (*postmeiotic segregation increased 2*). Variantes germinativas nesses genes levam ao desenvolvimento da síndrome de Lynch¹¹⁹. A síndrome de Lynch caracteriza-se por apresentar um risco cumulativo vital para câncer colorretal (48 – 57% vs 4,5%), câncer de endométrio (43 – 57% vs 2,7%), e outros cânceres como, de estômago (> 13%), ovário (> 24%), intestino delgado, trato hepatobiliar, trato urinário, cérebro e pele¹²⁰.

Roberts e colaboradores publicaram em 2018, um estudo que avaliou o risco de câncer de mama para os genes presentes na via MMR em pacientes submetidas a um painel com genes de câncer hereditário. Os autores observaram que, os genes *PMS2* e *MSH6* conferem duas a três vezes mais chance de desenvolver o câncer de mama em relação a variantes patogênicas encontradas em outros genes da mesma via como o *MLH1* e *MSH2*. Nesse mesmo estudo os autores ressaltam que o *PMS2* e o *MSH6* conferem os maiores riscos cumulativos de desenvolverem câncer de mama até os 60 anos (37,7% e 31,1%, respectivamente), comparados com os outros genes da via (*MLH1* – 16,1% e *MSH2* – 15,5%)¹²¹.

Por outro lado, LaDuca e colaboradores publicaram em 2020, um estudo em que classificaram o gene *PMS2* como de alto risco para câncer colorretal, moderado risco para câncer de ovário e baixo risco para o desenvolvimento do câncer de mama. No entanto, o gene *MLH1* foi classificado como de alto risco para o desenvolvimento de câncer colorretal e câncer de endométrio, sendo classificado como de moderado risco para o câncer de mama¹¹⁷.

Com relação aos genes associados com síndromes hereditárias, foram classificadas como patogênicas duas variantes *missenses* c.536A>G (p.Y179C) e c.1187G>A (p.G396D) no gene *MUTYH* em três pacientes (Fc2000, Fc2111, Fc2650 – anexo 3). Sabe-se, que variantes patogênicas em homozigose nesse gene estão associadas com uma forma recessiva de polipose adenomatosa familiar e predisposição ao câncer colorretal¹²². Variantes em heterozigose no gene *MUTYH* estão associadas com risco moderado de desenvolver câncer colorretal hereditário não-poliposo (HNPPC – *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*)¹²³.

São estimados que variantes em heterozigose corresponde de 1 – 2% e variantes em homozigose no gene *MUTYH* são responsáveis por 0,012% dos cânceres. A maioria das variantes patogênicas encontradas nesse gene são *missenses*¹²⁴.

Estudo publicado por Ruggieri e colaboradores em 2013 demonstrou que a variante p.Y179C causa uma inativação completa da atividade glicosilase *MUTYH*, enquanto que as variantes p.G396D, leva apenas a uma redução da atividade¹²⁵.

Em estudo publicado por Fulk e colaboradores em 2019, os autores analisaram se a presença de variantes em heterozigose no gene *MUTYH* influenciava no risco de desenvolvimento do câncer de mama, contudo, os autores observaram que não houve risco significativo quando associado com as variantes p.G396D (*odds ratio* 1,20) e p.Y179C (*odds ratio* 1,71)¹²⁶. Sendo, essas variantes, as identificadas em nosso estudo.

Corroborando com esses dados, em 2022, Barreiro e colaboradores publicaram um estudo para avaliar se a presença de variantes em heterozigose no gene *MUTYH* apresentavam risco de desenvolver 33 diferentes tipos tumorais, comparando dados do TCGA com coortes do Gnomad. Os autores observaram, que pacientes com essas variantes tinham uma alta taxa de risco de 4,5 de desenvolver carcinoma adrenocortical, 3,4 para carcinoma esofágico, 2,4 para sarcoma, 2,1 para adenocarcinoma de próstata e 1,96 para carcinoma renal de células claras, contudo, não identificaram risco associado com o desenvolvimento do câncer de cólon, assim como, com carcinoma invasivo de mama¹²⁷.

Dentre as variantes classificadas como classe IV e V nesse estudo, os genes na qual encontramos a maioria das variantes foram em genes relacionados com a síndrome da anemia de fanconi, correspondendo à 26,9% de todos os genes com variantes potencialmente patogênicas identificadas.

A anemia de fanconi (AF) é uma doença genética rara resultante de uma deficiência no reparo de dano ao DNA que gera um amplo espectro de características clínicas de penetrância variável, como, falha progressiva da medula óssea (conforme o gene afetado), defeitos congênitos e predisposição ao câncer. É geralmente uma doença autossômica recessiva, contudo, heranças ligadas ao cromossomo X e autossômica dominante já foram descritas na literatura. Essa síndrome causa instabilidade cromossômica e até o momento 22 genes foram associados com o fenótipo de anemia de fanconi (*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1/BRCA2*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG/XRCC9*, *FANCI*, *FANCI/BRIP1*, *FANCL/PHF9*, *FANCM*, *FANCN/PALB2*, *FANCO/RAD51C*, *FANCP/SLX4*, *FANCQ/ERCC4*, *FANCR/RAD51*, *FANCS/BRCA1*, *FANCT/UBE2T*, *FANCU/XRCC2*, *FANCV/REV7* e *FANCW/RFWD3*)^{116, 128}.

Diversos estudos publicados na literatura afirmam que variantes geminativas patogênicas em heterozigose em diversos genes presentes na anemia de fanconi, como, *FANCD1/BRCA2*, *FANCI/BRIP1*, *FANCO/RAD51C* e *FANCN/PALB2*, conferem de moderado a alto risco de desenvolver o câncer de mama e ovário hereditário^{112, 129-131}. No estudo publicado por Neidhardt e colaboradores em 2017, em um estudo caso controle os autores analisaram em uma casuística de 2047 pacientes com câncer de mama familiar bem caracterizado e 628 pacientes com câncer de ovário e observaram que variantes com perda de função em heterozigose no gene *FANCM* levam ao fenótipo triplo negativo do câncer de mama (*odds ratio* de 3,75), contudo, em nosso estudo não foi observado variante nesse gene¹³⁰.

Uma variante *missense* no gene *FANCA* (c.3385G>C; p. Asp1129His) identificada no presente estudo foi classificada como provavelmente patogênica. A proteína *FANCA* é multifuncional e apresenta diversos papéis fisiológicos, principalmente no reparo de ligações cruzadas inter-fita, reparo de dano ao DNA por recombinação homóloga, síntese de translesão de DNA e está presente no reparo de DNA por excisão de nucleotídeo (NER)¹³². O gene *FANCA* faz parte do complexo central de recrutamento da anemia de fanconi e sua principal função é a localização de todos os outros genes membros do complexo¹²⁸.

Estudos publicados na literatura demonstram que variantes em heterozigose no gene *FANCA*, podem apresentar penetrância moderada para o desenvolvimento de câncer de

mama. Devido ao fato, de ele ser supressor tumoral e ter importante papel na via da anemia de fanconi, os autores analisaram variantes nesse gene em diferentes populações^{133, 134}. Contudo, esses dados ainda não são bem consolidados na literatura, necessitando de uma análise mais ampla.

No gene *FANCE*, foi identificada uma variante *missense*, classificada como provavelmente patogênica (IV), e uma variante em sítio de *splicing* c.1114-1G>A, classificada como patogênica (V). O gene *FANCE* também faz parte do complexo central de recrutamento e é responsável pela construção de uma ponte entre os membros do complexo central da anemia de fanconi e o seu alvo¹²⁸.

Em uma revisão publicada por Gianni e colaboradores em setembro 2021, os autores enfatizaram que o *FANCE* é um gene de predisposição ao câncer de esôfago familiar e carcinoma de cabeça e pescoço. A presença de variantes nesse gene não é comum em casos de câncer de mama¹¹¹, no entanto, os autores citam dois estudos publicados, que analisaram a presença de variantes em genes não-*BRCA* em câncer de mama e ovário, na qual, identificaram variantes em genes da via da anemia de fanconi em cânceres hereditários e obtiveram como resultados a identificação de ao menos uma variante em *FANCE*, contudo, são variantes distintas das identificadas nesse estudo^{116, 135}.

Foram encontradas quatro variantes em outro gene importante da anemia de fanconi o *FANCD2*. Uma paciente apresentou variante em sítio de *splicing* c.696-1G>A e outras três pacientes apresentaram a variante c.1278+3_1278+6del (*frameshift*) classificada tanto exônica quanto intrônica devido a sua presença nos dois domínios do gene. O gene *FANCD2* faz parte do complexo de monoubiquitinação ID2 e forma um heterodímero com o gene *FANCI*. Esse complexo é recrutado para o local da cromatina danificada e os mesmos são trifosforilado pelo gene ATR, em seguida, esses genes são monoubiquitinizados pelo complexo central, na qual, é dado a sequência no reparo de dano ao DNA pela via de recombinação homóloga¹²⁸.

A perda do *FANCD2* em modelos de animais leva ao desenvolvimento de câncer epitelial, câncer de fígado, câncer de ovário e câncer de mama¹¹¹. Mantere e colaboradores, em 2017, executaram um estudo caso-controle com pacientes com câncer de mama hereditário e identificaram uma variante patogênica (c.2715+1G>A). Eles observaram que essa variante foi 2,6 vezes mais encontrada em pacientes com o câncer de mama hereditário quando

comparado com o controle, contudo, eles não obtiveram diferença estatística ($p = 0,131$). Por isso, o fator prognóstico desse gene em tumores hereditários ainda vem sendo analisado¹³⁶.

Além desses genes, foi identificada uma variante c.301G>T (p.G101W) no gene *CDKN2A*. O *CDKN2A* (*ciclin-dependent Kinase inhibitor 2A*) é um gene supressor tumoral localizado no braço curto do cromossomo 9 (9q21) e codifica a proteína p16 que desempenha um papel importante na divisão celular durante a fase G1, inibindo a progressão do ciclo celular para a fase S¹³⁷. Sabe-se que essa mutação resulta em perda da função proteica, perdendo a capacidade de inibir a atividade catalítica dos complexos Ciclina D1-CDK4 e ciclina D1-CKD6 *in vitro*¹³⁸.

Variantes no gene *CDKN2A* estão associadas com o alto risco de desenvolver câncer de pele (melanoma), além de câncer de próstata, câncer de cabeça e pescoço, câncer de pulmão não pequenas células, câncer de esôfago, câncer de ovário e renal¹³⁹. Em estudo publicado por Ellsworth e colaboradores em 2019, os autores relataram que a análise de variantes nesse gene em cânceres de mama hereditário é escassa devido ao baixo número de variantes observadas em estudos caso-controle, sendo notado, a frequência de 1,2% em 692 pacientes com CMTN comparado com 0,9% em 2.696 pacientes com tumores não triplo negativo⁴⁵. A variante identificada no presente estudo é comumente encontrada na América Latina e em países mediterrâneos, como França, Itália e Espanha¹⁴⁰.

Uma variante *nonsense* foi identificada c.2272C>T (p.R758X) no gene *cylindromatosis (CYLD)*, gene supressor tumoral. Essa variante resulta em um códon de terminação prematuro causando o truncamento e conseqüentemente a disfunção dessa proteína, essa mutação está localizada em uma região *hotspot* do gene¹⁴¹. O gene *CYLD* é responsável por codificar uma enzima citoplásmica desubiquitinante de 107 kDa (DUB), que remove moléculas de ubiquitina de várias proteínas de sinalização e regulam as atividades de muitos processos celulares¹⁴².

O gene foi descoberto e clonado pela primeira vez em 2000 por Bignell e colaboradores¹⁴³ que analisavam um gene supressor tumoral relacionado a uma doença cutânea (Cilindromatose familiar – desordem autossômica dominante) caracterizada por apresentar múltiplos tumores de cabeça e pescoço. Em seguida, estudos funcionais demonstraram as inúmeras funções do *CYLD*, assim como, na regulação da inflamação, imunidade, progressão do ciclo celular e potencial influência no processo carcinogênico¹⁴².

Em artigo publicado por Deng e colaboradores em 2021, os autores citaram que a

deficiência de *CYLD* está relacionado com vários tipos de doenças entre elas cânceres de cabeça e pescoço, cervical, cólon e próstata¹⁴⁴. Hayashi e colaboradores em 2014, publicaram um estudo sobre a significância clínica da expressão de *CYLD* no câncer de mama esporádico. Os autores observaram que a expressão reduzida de *CYLD* está correlacionada com tumores RE – Negativo e altos índices de Ki67. Nas análises multivariadas, eles destacam que pouca ou nenhuma expressão de *CYLD* mostraram-se um fator independente para sobrevida livre de doença¹⁴⁵. No entanto, não há nada na literatura associando esse gene ao câncer de mama hereditário até o momento.

Nesse estudo, identificamos algumas variantes, nas quais, não foram citadas na literatura . Dentre elas, encontramos uma variante *frameshift* no gene *EPHB2* c.3059del (p. Lys1020Argfs*63). Os receptores de eferina (Ephs), consistem em 16 membros sendo categorizados em dois grupos: EPHA (EPHA1-8, 10) e EPHB (1-4, 6). Os receptores EPHs e suas efrinas ligantes estão ancoradas na membrana e regulam a tumorigênese através da angiogênese. Eles desempenham papéis essenciais nas células cancerosas, como, modulação, migração, proliferação, influenciam no citoesqueleto celular, na adesão e invasão. A superexpressão ou não expressão e variantes nesses receptores estão associadas com a progressão tumoral em câncer de pulmão, mama e cólon¹⁴⁶.

Em relação ao câncer de mama os receptores EPHs mais bem relacionados são os *EPHA2* e *EPHB4*¹⁴⁷, no entanto, em um estudo publicado por Hasa e colaboradores em 2015, os autores investigaram a expressão de *EPHB2* em nível proteico e observaram que altos níveis de expressão de *EPHB2* foi associado com uma pior sobrevida em pacientes com câncer de mama esporádico, sugerindo que esse receptor possa ter um valor prognóstico para esse câncer¹⁴⁸. Porém, há uma escassez na literatura associando esse gene ao câncer de mama hereditário até o momento.

Em relação as variantes ainda não descritas na literatura, identificamos uma *frameshift* no gene *WRN* c.1273_1276del (p.Ser426Profs*11). O gene *WRN* codifica uma enzima DNA helicase altamente conservada da família RECQ que apresenta um papel fundamental no reparo do DNA e manutenção da estabilidade genômica. *WRN* apresenta atividade de helicase e exonuclease e tem sido considerado um protetor do genoma. Variantes em homozigose nesse gene causam a síndrome de Werner (doença autossômica recessiva rara caracterizada por apresentar instabilidade cromossômica, envelhecimento prematuro e uma maior propensão ao desenvolvimento de doenças malignas)^{149, 150}.

Os tumores comumente encontrados em pacientes portadores da síndrome de Werner são: sarcomas de tecidos moles, osteossarcoma, câncer de tireoide, melanoma, câncer de mama, meningioma benigno e distúrbios mielóides. Os tipos de variantes que tem sido observadas na síndrome de Werner são: *nonsense*, em sítios de *splicing* ou *frameshifts*, deleções extensas, inversões e translocações, sendo, variantes *missenses* incomuns de encontrar¹⁴⁹.

O *WRN* está envolvido na estabilidade do genoma através da sua interação com polimerases de translesão que previnem o colapso das forquilhas de replicação. A proteína *WRN* também interage com as helicase Ku70/80 para facilitar o reparo do DNA através da via de reparo de junção não-homóloga (NHEJ)¹⁵¹.

Em estudo publicado por Oliver e colaboradores em 2019, os autores destacaram que variantes patogênicas em heterozigose em *WRN* foram previamente citadas em estudos com câncer de mama hereditário. E por estar envolvido na estabilidade do genoma como gene supressor tumoral, o *WRN* se torna um possível gene de predisposição ao câncer de mama hereditário^{149, 151}. Um desses estudos foi publicado por Lhota e colaboradores em 2016, na qual, os autores identificaram duas variantes *nonsense* no gene *WRN* em 325 pacientes com câncer de mama hereditário negativas para variantes patogênicas nos genes *BRCA1/2* e *PALB2*¹⁵².

Identificamos nesse estudo, variantes em alguns genes, nos quais, não foram ou foram raramente associados com o câncer de mama. Dentre essas encontra-se uma variante *missense* c.247C>T (p.R83C) no gene *G6PC* (Glucose-6-phosphatase), expresso no fígado, rim e intestino delgado. Sua atividade é converter a glicose-6-fosfato em glicose livre, sendo, essa etapa realizada no final da gliconeogênese e glicogenólise¹⁵³. O *G6PC* está localizado na membrana do retículo endoplasmático e variantes nesse gene são comumente conhecidas por causarem doença de armazenamento de glicogênio tipo Ia (GSD Ia- *Glycogen storage disease type Ia*), uma doença autossômica recessiva caracterizada por baixa tolerância ao jejum, retardo de crescimento e hepatomegalia causada devido ao acúmulo de glicogênio e gordura no fígado¹⁵⁴.

Em uma busca pela literatura, pode-se observar uma escassez de estudos que correlacionam esse gene com algum tipo de câncer, contudo, encontrou-se um estudo que correlacionou a presença de GSD Ia e o posterior desenvolvimento de hepato carcinoma e uma suposta terapia gênica, na qual, não reduziu o tumor pré-existente¹⁵⁵. Em estudo

publicado por Abbadi e colaboradores em 2014, os autores demonstraram por estudos funcionais *in vitro* e *in vivo* que células iniciadoras de tumores cerebrais de origem humana quando apresentam baixa expressão de G6PC, conseqüentemente apresentam menor agressividade (redução de migração, proliferação)¹⁵⁶.

Foi encontrada uma variante em sítio de *splicing*, a c.258 +2T>C no gene *SBDS* (*Shwachman-Bodian-Diamond Syndrome*). Pacientes que apresentam variantes nesse gene estão sujeitos a apresentarem SDS (Síndrome de Shwachman-Diamond), uma doença autossômica recessiva, que causa insuficiência da medula óssea, insuficiência pancreática exócrina, defeitos esqueléticos e um elevado risco de desenvolvimento de cânceres hematológicos¹⁵⁷. As variantes comumente encontradas nesse gene são c.258+2C>T e c.183_184del, respectivamente.

Bezzerri e Cipolli demonstram em 2018 que além de participar da biogênese ribossomal, esse gene está envolvido em outros processos celulares, entre eles, apoptose, formação do fuso mitótico e em mecanismos de reparo do DNA¹⁵⁸. Pacientes que possuem variantes germinativas nesse gene, tendem a desenvolver tumores hematológicos. Corroborando com esse dado, um estudo publicado por Mitri e colaboradores em 2021, salientou que até o momento somente quatro casos de tumores sólidos com variantes nesse gene foram descritos, dentre eles esta um caso de câncer de mama hereditário publicado em 2011 por Singh e colaboradores^{159, 160}.

Identificamos uma variante em sítio de *splicing* (c.1154+1G>A) no gene *ALK* (*Anaplastic lymphoma kinase*), um receptor tirosina quinase que pertence à superfamília dos receptores de insulina¹⁶¹. Esse gene é fisiologicamente expresso em células neurais fetais. O gene *ALK* está localizado no braço curto do cromossomo 2 (2p23) e realiza troca de segmentos cromossômicos com outros genes, incluindo Nucleofosmina (*NPM*), gene associado a microtúbulos de equinoderme proteína tipo 4 (*EML4*) e o gene TRK-fundido (*TFG*)¹⁶².

Essas translocações cromossômicas provocam a formação de oncoproteínas de fusão quiméricas X-ALK, devido à ativação constitutiva de *ALK*¹⁶². Essas proteínas contribuem para a patogênese de diversas malignidades hematológicas e tumores sólidos, como, linfoma, câncer de pulmão, tumores miofibroblásticos inflamatórios (IMTs), carcinoma renal, câncer de tireóide, câncer de trato digestivo, câncer de mama, leucemia e carcinoma de ovário¹⁶².

Em uma busca pela literatura, pode-se observar a escassez de estudos desse gene em relação ao câncer de mama hereditário. Artigos publicados demonstram que variantes

patogênicas germinativas em *ALK* tendem a desenvolver principalmente neuroblastoma, câncer de tireóide e câncer de pulmão de células não pequenas. Existem dois sítios *hotspots* nesse gene localizados no códon 1174 e 1275 e correspondem a 85% das mutações^{163, 164}.

Outro gene, o qual, não é comumente relacionado com o câncer de mama hereditário, onde identificamos uma variante *frameshift* (c.37del, p. Val13Tyrfs*5) foi o gene *NTRK1*, um receptor tirosina quinase. A família TRK dos receptores de tirosina quinase é composta por três membros *NTRK1*, *NTRK2* e *NTRK3*, que contribuem para o desenvolvimento neuronal, funcionalidade, sobrevivência e proliferação durante a vida adulta¹⁶⁵. Os receptores tirosina quinase são uma classe que regulam a comunicação célula-célula e controlam uma variedade de funções biológicas complexas. Sua desregulação devido a novos rearranjos, podem levar á formação de oncoproteínas de fusão que são possivelmente iniciadoras da carcinogênese¹⁶⁶.

Fusões no gene *NTRK1*, tem sido identificado em vários tumores sólidos como, câncer de pulmão, câncer no trato gastrointestinal, câncer de tireóide, tumores cerebrais e sarcomas. Tumores hematológicos, como a leucemia mielóide aguda também podem ser causados por fusões. Essas, fusões são definidas como um oncogene *driver* e um marcador de diagnóstico em alguns cânceres, como, carcinoma secretor mamário e fibrossarcoma infantil congênito¹⁶⁵.

Lagadec e colaboradores em 2009, destacaram que tumores de mama esporádicos apresentaram níveis mais elevados de *NTRK1* e *NTRK1* fosforilado, que as células mamárias normais. Os autores destacaram que, a superexpressão de *NTRK1* promoveu a proliferação, invasão, migração e as vias PI3K-AKT, ERK/MAPK foram ativadas por *NTRK1*, promovendo um fenótipo mais agressivo. Os autores ainda analisaram esses resultados *in vivo* e observaram que camundongos com superexpressão de *NTRK1* apresentaram crescimento tumoral acelerado, angiogênese e metástase, salientando a importância desse gene nessas características tumorais^{165, 167}. Não há nada na literatura, até o momento, que associe esse gene com o câncer de mama hereditário.

Uma grande parcela dos pacientes (67,46%) apresentou ao menos uma variante classificada como VUS. Quanto às essas variantes, cabe destacar genes como o *ATM* e *CHEK2*, que são comumente mutados no câncer de mama hereditário e apresentaram altos escores de patogenicidade como REVEL acima de 0,7 (*ATM* – VAF: 56,48% e REVEL: 0,904, *CHEK2* – VAF: 52,89% e REVEL: 0,836). Além disso, eles também são considerados de moderado risco para o câncer de mama¹¹⁷. Em estudo publicado por Dorling e colaboradores em 2021, os autores demonstraram que o *ATM* e *CHEK2*, possuem uma associação mais forte com câncer

de mama com receptores de estrogênio positivo (RE +) e que o gene *CHEK2* em especial apresenta associação com câncer de mama (RE -), porém aqueles não triplo negativos¹⁶⁸. No entanto, não encontramos evidências suficientes para classificar as variantes identificadas no presente estudo como classe IV ou V.

Outro gene classificado em nosso estudo como VUS, mas importante destacar é o *CDH1*, gene relacionado a síndrome do câncer gástrico difuso hereditário. Este gene apresentou VAF de 53,33% e o escore do REVEL foi de 0,732. O *CDH1* é classificado por diversos estudos como de alto risco para o desenvolvimento de câncer de mama^{45, 117}, contudo, em nosso trabalho, não encontramos evidências suficientes para classificá-lo como provavelmente patogênico ou patogênico.

Dada a associação existente na literatura entre prognóstico de câncer de mama triplo negativo e ancestralidade, realizamos a análise do perfil ancestral da nossa casuística, o que nos permitiu observar uma grande miscigenação, com proporção de 57,99% de ancestrais europeus, 22,75% africanos, 9,92% ameríndios e 9,31% asiáticos. Esse resultado corrobora com outros artigos já publicados na literatura que descrevem essa distribuição heterogênea no Brasil devido à sua colonização por europeus e africanos e também às grandes dimensões territoriais^{134, 169, 170}.

Dados presentes na literatura demonstram que pacientes com maior proporção de ancestralidade africana apresentam maior grau histológico e conseqüentemente doença mais avançada ao diagnóstico^{171, 172}, contudo, em nosso estudo, encontramos correlação significativa da ancestralidade ameríndia e o grau histológico do tumor ($p = 0,019$), supondo assim, que pacientes com alta proporção de ancestralidade ameríndia tendem a ser diagnosticados com tumores com grau histológico mais avançado (Grau III). Em estudo publicado por Alvarado-Cabrero e colaboradores em 2021, os autores destacam que na América Latina o câncer de mama é um problema de saúde pública e já ultrapassou o câncer de colo de útero. Os autores mencionam ainda, que a maioria das pacientes são diagnosticadas em estágios avançados ou metastáticos da doença, em razão do pouco investimento na área da pesquisa e na detecção precoce, assim como, no tratamento e manejo dessas pacientes¹⁷³.

Estudos publicados na literatura demonstram que a ancestralidade asiática apresenta maior sobrevida quando comparada com outras ancestralidades^{174, 175}. Nosso resultado corrobora com esses dados, pois, a correlação da ancestralidade asiática com a sobrevida

global das pacientes apresentou significância estatística ($p = 0,001$), sendo que pacientes com ancestralidade asiática tendiam a apresentar uma maior sobrevida, quando comparado com as outras ancestralidades. Contudo, faz-se importante interpretar esses dados com cautela devido ao fato, de o percentual asiático encontrado em nossa casuística ter sido ínfimo.

No que se refere ao tratamento das pacientes avaliadas no estudo, pudemos observar que as pacientes que não possuem nenhuma variante patogênica germinativa (*WT*) apresentaram 2,4 vezes mais chance de responderem ao tratamento com a carboplatina quando comparadas com as pacientes que apresentaram mutações não-*BRCA1/2*, que demonstraram 1,8 vezes mais chances de responder ao tratamento com Paclitaxel. No entanto, importante destacar que não houve diferença estatística entre o tratamento padrão (Paclitaxel) e o tratamento experimental (Paclitaxel e Carboplatina) em relação com a presença ou não de variantes germinativas patogênicas.

Embora tenha sido utilizado neste estudo, um painel gênico amplo com 298 genes, a maioria das pacientes não apresentou variantes patogênicas e podem ter desenvolvido o tumor devido a outros mecanismos ou apresentavam variantes em outros genes, os quais não foram explorados neste estudo, sendo essa uma de nossas limitações. Dentre as outras limitações deste trabalho, está o tempo de seguimento de algumas pacientes, pois, eram excluídas quando possuíam metastáse ou apresentavam recidiva. Ainda, não foram realizados estudos de segregação e análises moleculares como a perda de heterozigosidade no tumor, análises estas importantes para a complementação dos resultados encontrados neste estudo, de forma a avaliar e confirmar se as variantes identificadas possuem associação com o desenvolvimento do tumor.

Porém, apesar de suas limitações, o presente estudo contém informações importantes e singulares que complementam nosso conhecimento acerca de pacientes com câncer de mama triplo negativo com ausência de variantes germinativas patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

11. CONCLUSÃO

Através do trabalho pode-se concluir:

- Foram identificadas 27 variantes patogênicas/provavelmente patogênicas em 26 pacientes totalizando 20,6% da casuística analisada. Somente uma paciente (3,85%), apresentou mais de uma variante patogênica. A maioria dos genes com variante germinativa patogênica identificada integra vias de reparo de danos ao DNA, como a via de recombinação homóloga, via de *mismatch repair*, bem como estão relacionados com algumas síndromes de predisposição hereditária ao câncer de mama.

- Do total, 7 pacientes (26,9%) apresentaram variantes germinativas patogênicas em genes envolvidos em vias de reparo de danos ao DNA.

- As variantes identificadas estão presentes em duas principais vias de reparo ao DNA. A via de *mismatch repair*, onde, três pacientes apresentaram variantes patogênicas (11,5%), seguido pela via de recombinação homóloga, na qual foram identificadas quatro variantes patogênicas (15,4%).

- Em relação ao perfil ancestral da casuística, pode-se observar a grande heterogeneidade da população brasileira, no qual, os ancestrais europeus apresentaram maior proporção com 57,99%, seguido da ancestrais africanos com 22,75%, os ancestrais ameríndios foram responsáveis por 9,92% e os ancestrais asiáticos estavam presentes em apenas 9,31%. Foram identificadas associações estatisticamente significativas entre a ancestralidade ameríndia e o alto grau histológico ao diagnóstico (Grau III) ($p = 0,019$) e uma correlação entre sobrevida e a ancestralidade asiática, com pacientes com alto grau de ancestrais asiáticos tendem a apresentar uma maior sobrevida.

- No que se refere às características clínicas e histopatológicas, as pacientes com variantes germinativas patogênicas apresentaram uma mediana da idade menor (43 anos), quando comparadas com a mediana da idade das pacientes *Wild Type* (46,5 anos). A maioria das pacientes nos dois grupos apresentou tamanho do tumor T3, com status axilar entre N1 e N3 e alto grau histológico ao diagnóstico (Grau III). Em relação à história familiar das pacientes que apresentaram variantes germinativas patogênicas, 20 (76,9%) apresentou história familiar de câncer positiva.

- Com relação ao perfil mutacional das pacientes e a Rpc, pode-se concluir que a presença de variantes germinativas patogênicas não-*BRCA1/2* não influenciou no alcance da Rpc, com isso, o uso do tratamento experimental em relação ao tratamento padrão não

obteve resultado estatisticamente significativo.

Dessa forma, podemos concluir que o presente estudo levou à identificação de 27 variantes potencialmente patogênicas em 26 famílias não relacionadas, resultando em 20,6% da casuística total com uma causa potencialmente identificada para os casos de câncer de mama diagnosticados na probanda ou na família. Os genes identificados neste estudo estão associados com vias de reparo de danos ao DNA, ciclo celular, bem como genes já associados com síndromes de predisposição hereditária ao câncer (*MLH1, PMS2, PALB2, RAD51C, RAD51D, CDKN2A, MUTYH, TP53, FANCA, FANCE, FANCD2*). De forma adicional, foram identificadas variantes em genes cuja associação com síndromes hereditárias de predisposição ao câncer de mama ainda não está estabelecida (*CYLD WRN, SBDS, G6PC, ALK e NTRK1*). Desse modo, faz-se importante identificar novos genes não-*BRCA1/2* em pacientes com câncer de mama, para que sejam aprofundados através de estudos funcionais e futuramente possam ser utilizados, tanto no contexto de prevenção, prognóstico e até mesmo se tornar um alvo terapêutico.

12. REFERÊNCIAS

- 1.IARC. *Latest global cancer data: Cancer burden rises to 19.3 million new cases and 10.0 million cancer deaths in 2020*. 2020;292:3.
- 2.INCA. *Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil*. **INCA**. 2019:120.
- 3.BARRETOS CH. *Hospital de amor - Tumores de mama 2019, infogram*. [Internet] <https://infogram.com/infograficos-do-cancer-2019-1hkv2nv3qqqz6x3?live:> REGISTRO HOSPITALAR DE CÂNCER; 2019 [cited 21/06].
- 4.Élida Lívia Rafael Dantas, Fernando Henrique de Lima Sá, Sionara Melo de Figueiredo de Carvalho, Anderson Pontes Arruda, Evelane Marques Ribeiro, Ribeiro EM. *Genética do câncer hereditário*. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 2009;55:7.
- 5.Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**. 2011;144(5):646-74.
- 6.Elinav E, Nowarski R, Thaïss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. *Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms*. **Nat Rev Cancer**. 2013;13(11):759-71.
- 7.Ma J, Setton J, Lee NY, Riaz N, Powell SN. *The therapeutic significance of mutational signatures from DNA repair deficiency in cancer*. **Nat Commun**. 2018;9(1):3292.
- 8.Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD. *Genomic instability--an evolving hallmark of cancer*. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2010;11(3):220-8.
- 9.Hanahan D. *Hallmarks of Cancer: New Dimensions*. **Cancer Discov**. 2022;12(1):31-46.

10. Hamdi Y, Boujemaa M, Ben Rekaya M, Ben Hamda C, Mighri N, El Benna H, et al. *Family specific genetic predisposition to breast cancer: results from Tunisian whole exome sequenced breast cancer cases.* **J Transl Med.** 2018;16(1):158.
11. Wang Q. *Cancer predisposition genes: molecular mechanisms and clinical impact on personalized cancer care: examples of Lynch and HBOC syndromes.* **Acta Pharmacol Sin.** 2016;37(2):143-9.
12. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, et al. *Breast cancer.* **Nat Rev Dis Primers.** 2019;5(1):66.
13. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. *Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies.* **PLoS Med.** 2010;7(5):e1000279.
14. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. *Molecular portraits of human breast tumours.* **Nature.** 2000;406(6797):747-52.
15. Mo Q, Wang S, Seshan VE, Olshen AB, Schultz N, Sander C, et al. *Pattern discovery and cancer gene identification in integrated cancer genomic data.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2013;110(11):4245-50.
16. Norum JH, Andersen K, Sorlie T. *Lessons learned from the intrinsic subtypes of breast cancer in the quest for precision therapy.* **Br J Surg.** 2014;101(8):925-38.
17. Yarden Y, Sliwkowski MX. *Untangling the ErbB signalling network.* **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2001;2(2):127-37.
18. Sharma P. *Biology and Management of Patients With Triple-Negative Breast Cancer.* **Oncologist.** 2016;21(9):1050-62.

- 19.Sharma P. *Update on the Treatment of Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer*. **Curr Treat Options Oncol**. 2018;19(5):22.
- 20.Marotti JD, de Abreu FB, Wells WA, Tsongalis GJ. *Triple-Negative Breast Cancer: Next-Generation Sequencing for Target Identification*. **Am J Pathol**. 2017;187(10):2133-8.
- 21.Prat A, Cheang MC, Martin M, Parker JS, Carrasco E, Caballero R, et al. *Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer*. **J Clin Oncol**. 2013;31(2):203-9.
- 22.Bravata V, Cammarata FP, Forte GI, Minafra L. *"Omics" of HER2-positive breast cancer*. **OMICS**. 2013;17(3):119-29.
- 23.Harbeck N, Gnant M. *Breast cancer*. **The Lancet**. 2017;389(10074):1134-50.
- 24.KNUDSON JAG. *Mutation and Cancer: Statistical Study of Retinoblastoma*. **pnas**. 1971;68.
- 25.Kobayashi H, Ohno S, Sasaki Y, Matsuura M. *Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (review)*. **Oncol Rep**. 2013;30(3):1019-29.
- 26.Kleibl Z, Kristensen VN. *Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management*. **Breast**. 2016;28:136-44.
- 27.Arpinò G, Pensabene M, Condello C, Ruocco R, Cerillo I, Lauria R, et al. *Tumor characteristics and prognosis in familial breast cancer*. **BMC Cancer**. 2016;16(1):924.
- 28.Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1*. **Science**. 1994;266(5182):66-71.
- 29.Pellegrini L, Yu DS, Lo T, Anand S, Lee M, Blundell TL, et al. *Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex*. **Nature**. 2002;420(6913):287-93.

30. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al. *Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13.* **Science.** 1994;265(5181):2088-90.
31. Chen PL, Chen CF, Chen Y, Xiao J, Sharp ZD, Lee WH. *The BRC repeats in BRCA2 are critical for RAD51 binding and resistance to methyl methanesulfonate treatment.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1998;95(9):5287-92.
32. Bork P, Blomberg N, Nilges M. *Internal repeats in the BRCA2 protein sequence.* **Nat Genet.** 1996;13(1):22-3.
33. Wong AK, Pero R, Ormonde PA, Tavtigian SV, Bartel PL. *RAD51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene brca2.* **J Biol Chem.** 1997;272(51):31941-4.
34. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. *Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers.* **JAMA.** 2017;317(23):2402-16.
35. Fountzilas C, Kaklamani VG. *Multi-gene Panel Testing in Breast Cancer Management.* **Cancer Treat Res.** 2018;173:121-40.
36. Pilarski R. *Cowden syndrome: a critical review of the clinical literature.* **J Genet Couns.** 2009;18(1):13-27.
37. Nusbaum R, Vogel KJ, Ready K. *Susceptibility to breast cancer: hereditary syndromes and low penetrance genes.* **Breast Dis.** 2006;27:21-50.
38. Walsh T, Casadei S, Lee MK, Pennil CC, Nord AS, Thornton AM, et al. *Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2011;108(44):18032-7.

- 39.Santana Dos Santos E, Lallemand F, Petitalot A, Caputo SM, Rouleau E. *HRness in Breast and Ovarian Cancers*. **Int J Mol Sci**. 2020;21(11).
- 40.Camila W, Sara M. *Identifying breast cancer susceptibility genes – a review of the genetic background in familial breast cancer*. **Acta Oncologica**. 2018:13.
- 41.Apostolou P, Fostira F. *Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes*. **Biomed Res Int**. 2013;2013:747318.
- 42.Douglas F. Easton, Paul D.P. Pharoah, Antonis C. Antoniou, Marc Tischkowitz, Sean V. Tavtigian, Nathanson KL, et al. *Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk*. **The New England Journal of Medicine** 2015.
- 43.Peters ML, Garber JE, Tung N. *Managing hereditary breast cancer risk in women with and without ovarian cancer*. **Gynecol Oncol**. 2017;146(1):205-14.
- 44.June Yoo, Insiyah Campwala, Gupta. S. *Relative risk of breast cancer occurrence based upon known genetic mutations* **Journal of Disease and Global Health** 2017.
- 45.Ellsworth DL, Turner CE, Ellsworth RE. *A Review of the Hereditary Component of Triple Negative Breast Cancer: High- and Moderate-Penetrance Breast Cancer Genes, Low-Penetrance Loci, and the Role of Nontraditional Genetic Elements*. **J Oncol**. 2019;2019:4382606.
- 46.Pilie PG, Tang C, Mills GB, Yap TA. *State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2019;16(2):81-104.
- 47.Lodovichi S, Cervelli T, Pellicoli A, Galli A. *Inhibition of DNA Repair in Cancer Therapy: Toward a Multi-Target Approach*. **Int J Mol Sci**. 2020;21(18).

48. Rahimian E, Amini A, Alikarami F, Pezeshki SMS, Saki N, Safa M. *DNA repair pathways as guardians of the genome: Therapeutic potential and possible prognostic role in hematologic neoplasms*. **DNA Repair (Amst)**. 2020;96:102951.
49. Montaser Shaheen, Christopher Allen, Jac A. Nickoloff, Hromas. R. *Synthetic lethality: exploiting the addiction of cancer to DNA repair*. **Blood Journal**. 2011;117:10.
50. Germano G, Amirouchene-Angelozzi N, Rospo G, Bardelli A. *The Clinical Impact of the Genomic Landscape of Mismatch Repair-Deficient Cancers*. **Cancer Discov**. 2018;8(12):1518-28.
51. Rafael Canfield Brianese, Kivvi Duarte de Mello Nakamura, Fernanda Gabriella dos Santos Ramos de Almeida, Rodrigo Fernandes Ramalho, Bruna Durães de Figueiredo Barros, Elisa Napolitano e Ferreira, et al. *BRCA1 deficiency is a recurrent event in early-onset triple-negative breast cancer: a comprehensive analysis of germline mutations and somatic promoter methylation*. **Breast cancer research treatment**. 2018.
52. Sandra E. Filippini, Vega. A. *Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2*. **Frontiers in Bioscience**. 2013;18:13.
53. Hoang LN, Gilks BC. *Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome: Moving Beyond BRCA1 and BRCA2*. **Advances in Anatomic pathology**. 2017;00.
54. Nielsen FC, van Overeem Hansen T, Sorensen CS. *Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways*. **Nat Rev Cancer**. 2016;16(9):599-612.
55. Christopher J. Lord, Ashworth. A. *BRCAness Revisited*. **Nature Perspectiva**. 2016;16:11.
56. Chatterjee N, Walker GC. *Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis*. **Environ Mol Mutagen**. 2017;58(5):235-63.

57. Zhao S, Zuo WJ, Shao ZM, Jiang YZ. *Molecular subtypes and precision treatment of triple-negative breast cancer*. **Ann Transl Med**. 2020;8(7):499.
58. Jiang YZ, Ma D, Suo C, Shi J, Xue M, Hu X, et al. *Genomic and Transcriptomic Landscape of Triple-Negative Breast Cancers: Subtypes and Treatment Strategies*. **Cancer Cell**. 2019;35(3):428-40 e5.
59. Jiagge E, Jibril AS, Chitale D, Bensenhaver JM, Awuah B, Hoenerhoff M, et al. *Comparative Analysis of Breast Cancer Phenotypes in African American, White American, and West Versus East African patients: Correlation Between African Ancestry and Triple-Negative Breast Cancer*. **Ann Surg Oncol**. 2016;23(12):3843-9.
60. Boyle P. *Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations*. **Ann Oncol**. 2012;23 Suppl 6:vi7-12.
61. Hahnen E, Lederer B, Hauke J, Loibl S, Krober S, Schneeweiss A, et al. *Germline Mutation Status, Pathological Complete Response, and Disease-Free Survival in Triple-Negative Breast Cancer: Secondary Analysis of the GeparSixto Randomized Clinical Trial*. **JAMA Oncol**. 2017;3(10):1378-85.
62. Sharma P, Klemp JR, Kimler BF, Mahnken JD, Geier LJ, Khan QJ, et al. *Germline BRCA mutation evaluation in a prospective triple-negative breast cancer registry: implications for hereditary breast and/or ovarian cancer syndrome testing*. **Breast Cancer Res Treat**. 2014;145(3):707-14.
63. Newman LA, Reis-Filho JS, Morrow M, Carey LA, King TA. *The 2014 Society of Surgical Oncology Susan G. Komen for the Cure Symposium: triple-negative breast cancer*. **Ann Surg Oncol**. 2015;22(3):874-82.
64. Lin PH, Kuo WH, Huang AC, Lu YS, Lin CH, Kuo SH, et al. *Multiple gene sequencing for risk assessment in patients with early-onset or familial breast cancer*. **Oncotarget**. 2016;7(7):8310-20.

65. Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, et al. *Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer.* **J Clin Oncol.** 2015;33(4):304-11.
66. Telli ML, Hellyer J, Audeh W, Jensen KC, Bose S, Timms KM, et al. *Homologous recombination deficiency (HRD) status predicts response to standard neoadjuvant chemotherapy in patients with triple-negative or BRCA1/2 mutation-associated breast cancer.* **Breast Cancer Res Treat.** 2018;168(3):625-30.
67. Lee E, McKean-Cowdin R, Ma H, Spicer DV, Van Den Berg D, Bernstein L, et al. *Characteristics of triple-negative breast cancer in patients with a BRCA1 mutation: results from a population-based study of young women.* **J Clin Oncol.** 2011;29(33):4373-80.
68. Valsecchi ME, Kimmey G, Bir A, Silbermins D. *Role of Carboplatin in the Treatment of Triple Negative Early- Stage Breast Cancer.* **Rev Recent Clin Trials.** 2015;10(2):101-10.
69. Yin L, Duan JJ, Bian XW, Yu SC. *Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress.* **Breast Cancer Res.** 2020;22(1):61.
70. He Q, Liang CH, Lippard SJ. *Steroid hormones induce HMG1 overexpression and sensitize breast cancer cells to cisplatin and carboplatin.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2000;97(11):5768-72.
71. Hengstler JG, Lange J, Kett A, Dornhofer N, Meinert R, Arand M, et al. *Contribution of c-erbB-2 and topoisomerase IIalpha to chemoresistance in ovarian cancer.* **Cancer Res.** 1999;59(13):3206-14.
72. Damia G, Brogginini M. *Platinum Resistance in Ovarian Cancer: Role of DNA Repair.* **Cancers (Basel).** 2019;11(1).

73. Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, et al. *Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial*. **Lancet Oncol**. 2014;15:10.
74. Loibl S, O'Shaughnessy J, Untch M, Sikov WM, Rugo HS, McKee MD, et al. *Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrighTNess): a randomised, phase 3 trial*. **Lancet Oncol**. 2018;19(4):497-509.
75. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. *Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes*. **J Clin Oncol**. 2012;30(15):1796-804.
76. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. *Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer*. **J Clin Oncol**. 2008;26(8):1275-81.
77. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. *Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis*. **Lancet**. 2014;384(9938):164-72.
78. Castrellon AB, Pihorecky I, Valero V, Raez LE. *The Role of Carboplatin in the Neoadjuvant Chemotherapy Treatment of Triple Negative Breast Cancer*. **Oncol Rev**. 2017;11(1):324.
79. Diana A, Franzese E, Centonze S, Carlino F, Della Corte CM, Ventriglia J, et al. *Triple-Negative Breast Cancers: Systematic Review of the Literature on Molecular and Clinical Features with a Focus on Treatment with Innovative Drugs*. **Curr Oncol Rep**. 2018;20(10):76.
80. Agostinetti E, Eiger D, Punie K, de Azambuja E. *Emerging Therapeutics for Patients with Triple-Negative Breast Cancer*. **Curr Oncol Rep**. 2021;23(5):57.

81.Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. *Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer*. **N Engl J Med**. 2018;379(22):2108-21.

82.Foulkes D. William, Smith E. Ian, Jorge. R-FS. *Triple Negative Breast Cancer*. **The New England Journal of Medicine**. 2010;363:11.

83.Comen EA, Robson M. *Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in triple-negative breast cancer*. **Cancer J**. 2010;16(1):48-52.

84.Souza AM, Resende SS, Sousa TN, Brito CFA. *A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population*. **Genet Mol Biol**. 2019;42(3):495-508.

85.Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuna-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, Arias W, et al. *Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals*. **PLoS Genet**. 2014;10(9):e1004572.

86.Williams DR, Mohammed SA, Shields AE. *Understanding and effectively addressing breast cancer in African American women: Unpacking the social context*. **Cancer**. 2016;122(14):2138-49.

87.Huo D, Hu H, Rhie SK, Gamazon ER, Cherniack AD, Liu J, et al. *Comparison of Breast Cancer Molecular Features and Survival by African and European Ancestry in The Cancer Genome Atlas*. **JAMA Oncol**. 2017;3(12):1654-62.

88.Dietze EC, Sistrunk C, Miranda-Carboni G, O'Regan R, Seewaldt VL. *Triple-negative breast cancer in African-American women: disparities versus biology*. **Nat Rev Cancer**. 2015;15(4):248-54.

89.Nanda R, Schumm LP, Cummings S, Fackenthal JD, Sveen L, Ademuyiwa F, et al. *Genetic testing in an ethnically diverse cohort of high-risk women: a comparative analysis of BRCA1*

and BRCA2 mutations in American families of European and African ancestry. **JAMA**. 2005;294(15):1925-33.

90. Prakash O, Hossain F, Danos D, Lassak A, Scribner R, Miele L. *Racial Disparities in Triple Negative Breast Cancer: A Review of the Role of Biologic and Non-biologic Factors*. **Front Public Health**. 2020;8:576964.

91. Wang K, Li M, Hakonarson H. *ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data*. **Nucleic Acids Res**. 2010;38(16):e164.

92. *ANNOVAR Documentation* [Internet] 2010-2018 [cited 04/08]; Available from: <https://annovar.openbioinformatics.org/en/latest/>.

93. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. **Genet Med**. 2015;17(5):405-24.

94. Li Q, Wang K. *InterVar: Clinical Interpretation of Genetic Variants by the 2015 ACMG-AMP Guidelines*. **Am J Hum Genet**. 2017;100(2):267-80.

95. Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, et al. *Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database*. **Hum Mutat**. 2017;38(7):751-63.

96. Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alfoldi J, Wang Q, et al. *The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans*. **Nature**. 2020;581(7809):434-43.

97. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, et al. *ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence*. **Nucleic Acids Res**. 2018;46(D1):D1062-D7.

98.Ioannidis NM, Rothstein JH, Pejaver V, Middha S, McDonnell SK, Baheti S, et al. *REVEL: An Ensemble Method for Predicting the Pathogenicity of Rare Missense Variants*. **Am J Hum Genet**. 2016;99(4):877-85.

99.Jagadeesh KA, Wenger AM, Berger MJ, Guturu H, Stenson PD, Cooper DN, et al. *M-CAP eliminates a majority of variants of uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity*. **Nat Genet**. 2016;48(12):1581-6.

100.Ionita-Laza I, McCallum K, Xu B, Buxbaum JD. *A spectral approach integrating functional genomic annotations for coding and noncoding variants*. **Nat Genet**. 2016;48(2):214-20.

101.Lu Q, Hu Y, Sun J, Cheng Y, Cheung KH, Zhao H. *A statistical framework to predict functional non-coding regions in the human genome through integrated analysis of annotation data*. **Sci Rep**. 2015;5:10576.

102.Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Beroud G, Claustres M, Beroud C. *Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals*. **Nucleic Acids Res**. 2009;37(9):e67.

103.Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, dos Santos SE, Amorim A, et al. *Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing*. **PLoS One**. 2012;7(1):e29684.

104.Couch FJ, Shimelis H, Hu C, Hart SN, Polley EC, Na J, et al. *Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer*. **JAMA Oncol**. 2017;3(9):1190-6.

105.Bono M, Fanale D, Incorvaia L, Cancelliere D, Fiorino A, Calo V, et al. *Impact of deleterious variants in other genes beyond BRCA1/2 detected in breast/ovarian and pancreatic cancer patients by NGS-based multi-gene panel testing: looking over the hedge*. **ESMO Open**. 2021;6(4):100235.

106. Manoharan V, Karunanayake EH, Tennekoon KH, De Silva S, De Silva K, Angunawela P, et al. *Nucleotide variants and protein expression of TP53 in a Sri Lankan cohort of patients with head and neck cancer*. **Mol Med Rep**. 2019;19(4):2781-91.
107. Li H, Zhang J, Tong JHM, Chan AWH, Yu J, Kang W, et al. *Targeting the Oncogenic p53 Mutants in Colorectal Cancer and Other Solid Tumors*. **Int J Mol Sci**. 2019;20(23).
108. Sheng S, Xu Y, Guo Y, Yao L, Hu L, Ouyang T, et al. *Prevalence and clinical impact of TP53 germline mutations in Chinese women with breast cancer*. **Int J Cancer**. 2020;146(2):487-95.
109. Han MR, Zheng W, Cai Q, Gao YT, Zheng Y, Bolla MK, et al. *Evaluating genetic variants associated with breast cancer risk in high and moderate-penetrance genes in Asians*. **Carcinogenesis**. 2017;38(5):511-8.
110. Buys SS, Sandbach JF, Gammon A, Patel G, Kidd J, Brown KL, et al. *A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes*. **Cancer**. 2017;123(10):1721-30.
111. Gianni P, Matenoglou E, Geropoulos G, Agrawal N, Adnani H, Zafeiropoulos S, et al. *The Fanconi anemia pathway and Breast Cancer: A comprehensive review of clinical data*. **Clin Breast Cancer**. 2021.
112. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, Barrowdale D, Pylkas K, Roberts J, et al. *Breast-cancer risk in families with mutations in PALB2*. **N Engl J Med**. 2014;371(6):497-506.
113. Nepomuceno TC, De Gregoriis G, de Oliveira FMB, Suarez-Kurtz G, Monteiro AN, Carvalho MA. *The Role of PALB2 in the DNA Damage Response and Cancer Predisposition*. **Int J Mol Sci**. 2017;18(9).
114. Paulo P, Maia S, Pinto C, Pinto P, Monteiro A, Peixoto A, et al. *Targeted next generation sequencing identifies functionally deleterious germline mutations in novel genes in early-onset/familial prostate cancer*. **PLoS Genet**. 2018;14(4):e1007355.

- 115.Fang CB, Wu HT, Zhang ML, Liu J, Zhang GJ. *Fanconi Anemia Pathway: Mechanisms of Breast Cancer Predisposition Development and Potential Therapeutic Targets*. **Front Cell Dev Biol**. 2020;8:160.
- 116.Del Valle J, Rofes P, Moreno-Cabrera JM, Lopez-Doriga A, Belhadj S, Vargas-Parra G, et al. *Exploring the Role of Mutations in Fanconi Anemia Genes in Hereditary Cancer Patients*. **Cancers (Basel)**. 2020;12(4).
- 117.LaDuca H, Polley EC, Yussuf A, Hoang L, Gutierrez S, Hart SN, et al. *A clinical guide to hereditary cancer panel testing: evaluation of gene-specific cancer associations and sensitivity of genetic testing criteria in a cohort of 165,000 high-risk patients*. **Genet Med**. 2020;22(2):407-15.
- 118.Shimelis H, LaDuca H, Hu C, Hart SN, Na J, Thomas A, et al. *Triple-Negative Breast Cancer Risk Genes Identified by Multigene Hereditary Cancer Panel Testing*. **J Natl Cancer Inst**. 2018;110(8):855-62.
- 119.Nikitin AG, Chudakova DA, Enikeev RF, Sakaeva D, Druzhkov M, Shigapova LH, et al. *Lynch Syndrome Germline Mutations in Breast Cancer: Next Generation Sequencing Case-Control Study of 1,263 Participants*. **Front Oncol**. 2020;10:666.
- 120.Piombino C, Cortesi L, Lambertini M, Punie K, Grandi G, Toss A. *Secondary Prevention in Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer Syndromes Other Than BRCA*. **J Oncol**. 2020;2020:6384190.
- 121.Roberts ME, Jackson SA, Susswein LR, Zeinomar N, Ma X, Marshall ML, et al. *MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer*. **Genet Med**. 2018;20(10):1167-74.

- 122.D'Agostino VG, Minoprio A, Torreri P, Marinoni I, Bossa C, Petrucci TC, et al. *Functional analysis of MUTYH mutated proteins associated with familial adenomatous polyposis*. **DNA Repair (Amst)**. 2010;9(6):700-7.
- 123.Kidambi TD, Goldberg D, Nussbaum R, Blanco A, Umetsu SE, Terdiman JP, et al. *Novel variant of unknown significance in MUTYH in a patient with MUTYH-associated polyposis: a case to reclassify*. **Clin J Gastroenterol**. 2018;11(6):457-60.
- 124.Hutchcraft ML, Gallion HH, Kolesar JM. *MUTYH as an Emerging Predictive Biomarker in Ovarian Cancer*. **Diagnostics (Basel)**. 2021;11(1).
- 125.Ruggieri V, Pin E, Russo MT, Barone F, Degan P, Sanchez M, et al. *Loss of MUTYH function in human cells leads to accumulation of oxidative damage and genetic instability*. **Oncogene**. 2013;32(38):4500-8.
- 126.Fulk K, LaDuca H, Black MH, Qian D, Tian Y, Yussuf A, et al. *Monoallelic MUTYH carrier status is not associated with increased breast cancer risk in a multigene panel cohort*. **Fam Cancer**. 2019;18(2):197-201.
- 127.Barreiro RAS, Sabbaga J, Rossi BM, Achatz MIW, Bettoni F, Camargo AA, et al. *Monoallelic deleterious MUTYH germline variants as a driver for tumorigenesis*. **J Pathol**. 2022;256(2):214-22.
- 128.Garcia-de-Teresa B, Rodriguez A, Frias S. *Chromosome Instability in Fanconi Anemia: From Breaks to Phenotypic Consequences*. **Genes (Basel)**. 2020;11(12).
- 129.Easton DF, Pharoah PD, Antoniou AC, Tischkowitz M, Tavtigian SV, Nathanson KL, et al. *Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk*. **N Engl J Med**. 2015;372(23):2243-57.

130. Neidhardt G, Hauke J, Ramser J, Gross E, Gehrig A, Muller CR, et al. *Association Between Loss-of-Function Mutations Within the FANCM Gene and Early-Onset Familial Breast Cancer*. **JAMA Oncol**. 2017;3(9):1245-8.
131. Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, Wappenschmidt B, Niederacher D, et al. *Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene*. **Nat Genet**. 2010;42(5):410-4.
132. Shahid M, Firasat S, Satti HS, Satti TM, Ghafoor T, Sharif I, et al. *Screening of the FANCA gene mutational hotspots in the Pakistani fanconi anemia patients revealed 19 sequence variations*. **Congenit Anom (Kyoto)**. 2020;60(1):32-9.
133. Abbasi S, Rasouli M. *A rare FANCA gene variation as a breast cancer susceptibility allele in an Iranian population*. **Mol Med Rep**. 2017;15(6):3983-8.
134. Solyom S, Winqvist R, Nikkila J, Rapakko K, Hirvikoski P, Kokkonen H, et al. *Screening for large genomic rearrangements in the FANCA gene reveals extensive deletion in a Finnish breast cancer family*. **Cancer Lett**. 2011;302(2):113-8.
135. Bonache S, Esteban I, Moles-Fernandez A, Tenes A, Duran-Lozano L, Montalban G, et al. *Multigene panel testing beyond BRCA1/2 in breast/ovarian cancer Spanish families and clinical actionability of findings*. **J Cancer Res Clin Oncol**. 2018;144(12):2495-513.
136. Mantere T, Tervasmaki A, Nurmi A, Rapakko K, Kauppila S, Tang J, et al. *Case-control analysis of truncating mutations in DNA damage response genes connects TEX15 and FANCD2 with hereditary breast cancer susceptibility*. **Sci Rep**. 2017;7(1):681.
137. Khan R, Aftab A, Tabassum S, Hussain HMJ, Hameed A, Mahmood H, et al. *Identification of CDKN2A variants in breast cancer patients in Pakistan*. **Genes Genet Syst**. 2019;94(3):117-22.

- 138.Ciotti P, Struewing JP, Mantelli M, Chompret A, Avril MF, Santi PL, et al. *A single genetic origin for the G101W CDKN2A mutation in 20 melanoma-prone families.* **Am J Hum Genet.** 2000;67(2):311-9.
- 139.Aftab A, Shahzad S, Hussain HMJ, Khan R, Irum S, Tabassum S. *CDKN2A/P16INK4A variants association with breast cancer and their in-silico analysis.* **Breast Cancer.** 2019;26(1):11-28.
- 140.Puig S, Potrony M, Cuellar F, Puig-Butille JA, Carrera C, Aguilera P, et al. *Characterization of individuals at high risk of developing melanoma in Latin America: bases for genetic counseling in melanoma.* **Genet Med.** 2016;18(7):727-36.
- 141.Farkas K, Deak BK, Sanchez LC, Martinez AM, Corell JJ, Botella AM, et al. *The CYLD p.R758X worldwide recurrent nonsense mutation detected in patients with multiple familial trichoepithelioma type 1, Brooke-Spiegler syndrome and familial cylindromatosis represents a mutational hotspot in the gene.* **BMC Genet.** 2016;17:36.
- 142.Verhoeft KR, Ngan HL, Lui VWY. *The cylindromatosis (CYLD) gene and head and neck tumorigenesis.* **Cancers Head Neck.** 2016;1:10.
- 143.Bignell GR, Warren W, Seal S, Takahashi M, Rapley E, Barfoot R, et al. *Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene.* **Nat Genet.** 2000;25(2):160-5.
- 144.Deng M, Dai W, Yu VZ, Tao L, Lung ML. *Cylindromatosis Lysine 63 Deubiquitinase (CYLD) Regulates NF- κ B Signaling Pathway and Modulates Fibroblast and Endothelial Cells Recruitment in Nasopharyngeal Carcinoma.* **Cancers (Basel).** 2020;12(7).
- 145.Hayashi M, Jono H, Shinriki S, Nakamura T, Guo J, Sueta A, et al. *Clinical significance of CYLD downregulation in breast cancer.* **Breast Cancer Res Treat.** 2014;143(3):447-57.
- 146.Yin J, Li Z, Ye L, Birkin E, Li L, Xu R, et al. *EphB2 represents an independent prognostic marker in patients with gastric cancer and promotes tumour cell aggressiveness.* **J Cancer.** 2020;11(10):2778-87.

147. Anderton M, van der Meulen E, Blumenthal MJ, Schafer G. *The Role of the Eph Receptor Family in Tumorigenesis*. **Cancers (Basel)**. 2021;13(2).
148. Husa AM, Magic Z, Larsson M, Fornander T, Perez-Tenorio G. *EPH/ephrin profile and EPHB2 expression predicts patient survival in breast cancer*. **Oncotarget**. 2016;7(16):21362-80.
149. Savva C, Sadiq M, Sheikh O, Karim S, Trivedi S, Green AR, et al. *Werner Syndrome Protein Expression in Breast Cancer*. **Clin Breast Cancer**. 2021;21(1):57-73 e7.
150. Norouzi M, Shafiei M, Abdollahi Z, Miar P, Galehdari H, Emami MH, et al. *WRN Germline Mutation Is the Likely Inherited Etiology of Various Cancer Types in One Iranian Family*. **Front Oncol**. 2021;11:648649.
151. Oliver J, Quezada Urban R, Franco Cortes CA, Diaz Velasquez CE, Montealegre Paez AL, Pacheco-Orozco RA, et al. *Latin American Study of Hereditary Breast and Ovarian Cancer LACAM: A Genomic Epidemiology Approach*. **Front Oncol**. 2019;9:1429.
152. Lhota F, Zemankova P, Kleiblova P, Soukupova J, Vocka M, Stranecky V, et al. *Hereditary truncating mutations of DNA repair and other genes in BRCA1/BRCA2/PALB2-negatively tested breast cancer patients*. **Clin Genet**. 2016;90(4):324-33.
153. Derks TGJ, Rodriguez-Buritica DF, Ahmad A, de Boer F, Couce ML, Grunert SC, et al. *Glycogen Storage Disease Type Ia: Current Management Options, Burden and Unmet Needs*. **Nutrients**. 2021;13(11).
154. Zheng BX, Lin Q, Li M, Jin Y. *Three novel mutations of the G6PC gene identified in Chinese patients with glycogen storage disease type Ia*. **Eur J Pediatr**. 2015;174(1):59-63.
155. Cho JH, Lee YM, Starost MF, Mansfield BC, Chou JY. *Gene therapy prevents hepatic tumor initiation in murine glycogen storage disease type Ia at the tumor-developing stage*. **J Inherit Metab Dis**. 2019;42(3):459-69.

156. Abbadi S, Rodarte JJ, Abutaleb A, Lavell E, Smith CL, Ruff W, et al. *Glucose-6-phosphatase is a key metabolic regulator of glioblastoma invasion*. **Mol Cancer Res**. 2014;12(11):1547-59.
157. Calado RT, Graf SA, Wilkerson KL, Kajigaya S, Ancliff PJ, Dror Y, et al. *Mutations in the SBDS gene in acquired aplastic anemia*. **Blood**. 2007;110(4):1141-6.
158. Bezzerri V, Cipolli M. *Shwachman-Diamond Syndrome: Molecular Mechanisms and Current Perspectives*. **Mol Diagn Ther**. 2019;23(2):281-90.
159. Bou Mitri F, Beaupain B, Flejou JF, Patient M, Okhremchuck I, Blaise D, et al. *Shwachman-Diamond syndrome and solid tumors: Three new patients from the French Registry for Severe Chronic Neutropenia and literature review*. **Pediatr Blood Cancer**. 2021;68(7):e29071.
160. Singh SA, Vlachos A, Morgenstern NJ, Ouansafi I, Ip W, Rommens JM, et al. *Breast cancer in a case of Shwachman Diamond syndrome*. **Pediatr Blood Cancer**. 2012;59(5):945-6.
161. Golding B, Luu A, Jones R, Vilorio-Petit AM. *The function and therapeutic targeting of anaplastic lymphoma kinase (ALK) in non-small cell lung cancer (NSCLC)*. **Mol Cancer**. 2018;17(1):52.
162. Cao Z, Gao Q, Fu M, Ni N, Pei Y, Ou WB. *Anaplastic lymphoma kinase fusions: Roles in cancer and therapeutic perspectives*. **Oncol Lett**. 2019;17(2):2020-30.
163. Chen L, Humphreys A, Turnbull L, Bellini A, Schleiermacher G, Salwen H, et al. *Identification of different ALK mutations in a pair of neuroblastoma cell lines established at diagnosis and relapse*. **Oncotarget**. 2016;7(52):87301-11.
164. Holla VR, Elamin YY, Bailey AM, Johnson AM, Litzenburger BC, Khotskaya YB, et al. *ALK: a tyrosine kinase target for cancer therapy*. **Cold Spring Harb Mol Case Stud**. 2017;3(1):a001115.

- 165.Lange AM, Lo HW. *Inhibiting TRK Proteins in Clinical Cancer Therapy*. **Cancers (Basel)**. 2018;10(4).
- 166.Tao Z, Liu J, Li T, Xu H, Chen K, Zhang J, et al. *Profiling Receptor Tyrosine Kinase Fusions in Chinese Breast Cancers*. **Front Oncol**. 2021;11:741142.
- 167.Lagadec C, Meignan S, Adriaenssens E, Foveau B, Vanhecke E, Romon R, et al. *TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells*. **Oncogene**. 2009;28(18):1960-70.
- 168.Breast Cancer Association C, Dorling L, Carvalho S, Allen J, Gonzalez-Neira A, Luccarini C, et al. *Breast Cancer Risk Genes - Association Analysis in More than 113,000 Women*. **N Engl J Med**. 2021;384(5):428-39.
- 169.Giolo SR, Soler JM, Greenway SC, Almeida MA, de Andrade M, Seidman JG, et al. *Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture*. **Eur J Hum Genet**. 2012;20(1):111-6.
- 170.Saloum de Neves Manta F, Pereira R, Vianna R, Rodolfo Beuttenmuller de Araujo A, Leite Goes Gitai D, Aparecida da Silva D, et al. *Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels*. **PLoS One**. 2013;8(9):e75145.
- 171.Al-Alem U, Rauscher G, Shah E, Batai K, Mahmoud A, Beisner E, et al. *Association of genetic ancestry with breast cancer in ethnically diverse women from Chicago*. **PLoS One**. 2014;9(11):e112916.
- 172.Roelands J, Mall R, Almeer H, Thomas R, Mohamed MG, Bedri S, et al. *Ancestry-associated transcriptomic profiles of breast cancer in patients of African, Arab, and European ancestry*. **NPJ Breast Cancer**. 2021;7(1):10.

173. Alvarado-Cabrero I, Doimi F, Ortega V, de Oliveira Lima JT, Torres R, Torregrosa L. *Recommendations for streamlining precision medicine in breast cancer care in Latin America. Cancer Rep (Hoboken)*. 2021;4(6):e1400.

174. Ding YC, Steele L, Warden C, Wilczynski S, Mortimer J, Yuan Y, et al. *Molecular subtypes of triple-negative breast cancer in women of different race and ethnicity. Oncotarget*. 2019;10(2):198-208.

175. DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. *Breast cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin*. 2014;64(1):52-62.

ANEXO 1: VARIÁVEIS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS.



Espaço para etiqueta

PES

5

Evolução Clínica

Data / Hora	Departamento de Oncologia – Mama / NAP / UPC	
	Protocolo NACA TriNe Trial	
	Investigador Principal: Dr. Cristiano de Pádua Souza <input type="checkbox"/>	
	Sub-Investigadores: Dr. Domicio Carvalho Lacerda <input type="checkbox"/>	
	Dr. Carlos Eduardo Paiva <input type="checkbox"/>	
	Dra. Marina Moreira Costa Zorzetto <input type="checkbox"/>	
	Dr. Alan Felipe Bello Secco <input type="checkbox"/>	
	Dr. João Carlos Resende Martins Medeiros da Trindade <input type="checkbox"/>	
	Ficha Baseline - Informações do Paciente e da Doença	
	Nº ID no Estudo:	Iniciais do paciente:
	Data de Nascimento: / /	Data de Assinatura TCLE: / /
	Data de admissão: / /	Data da biópsia: / /
	Data da coleta do BRCA: / /	
	INFORMAÇÕES DO PACIENTE:	
	Cidade de Origem:	Estado de Origem:
	Peso: Kg	Altura: cm
	ECOG: 0 <input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/>	MUGA %
	PA:	FC: SatO2:
	2. Raça:¹ Auto-referida	
	() Branco	
	() Negro	
	() Pardo	
	() Amarelos	
	() Outros	
	Histórico Ginecológico	
	Gestação: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
	Quantas?	
	Parto: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
	Quantos?	
	Aborto: <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO	
	Quantos?	
	Idade da menarca?	Anos
	Status menopausal	
	<input type="checkbox"/> Pré <input type="checkbox"/> Peri <input type="checkbox"/> Pós	
	Uso de anticoncepcional:	
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim	
	Quanto tempo?	

	Uso de terapia de reposição hormonal:
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Quanto tempo?
	Cirurgia prévia?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Descrever:
	Comorbidades
	Tabagismo
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Etilismo
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Doenças de cabeça e pescoço (olhos, ouvidos, nariz, cavidade oral e tireoide)
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Se sim, qual?
	Ansiedade?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Depressão?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Outras?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Qual?
	HAC?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	DAC?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Insuficiência Cardíaca?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Vasculopatia periférica?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Arritmias?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Outras?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Qual?
	DPOC?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Asma Brônquica?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Outras?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Qual?
	Colites?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	DRGE?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Gastrites?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Outras?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim Qual?
	Doenças Genito-urinárias?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	Hepatites?
	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim
	HIV?



Espaço para etiqueta

PES

5

Evolução Clínica

	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
Tuberculose?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
Outras?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim Qual?
Diabetes?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
Hipotireoidismo?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
Dislipidemias?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
Outros?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim Qual?
Doenças musculares e/ou esqueléticas?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
Alergias?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
Doenças dermatológicas?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim
Outros?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim Qual?
Medicação Concomitante		
Indicação para HAS?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> N.A. Qual?
Indicação para Diabetes?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> N.A. Qual?
Indicação para Cardiopatia?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> N.A. Qual?
Indicação para dor?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> N.A. Qual?
Indicação para ansiedade/depressão?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> N.A. Qual?
Outra Indicação?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim Qual?
INFORMAÇÕES DA DOENÇA		
Estadio Inicial – T:	<input type="checkbox"/> 1a	<input type="checkbox"/> 1b <input type="checkbox"/> 1c <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> 4a <input type="checkbox"/> 4b <input type="checkbox"/> 4c <input type="checkbox"/> 4d <input type="checkbox"/> N.A.
Estadio Inicial – N:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1 <input type="checkbox"/> 2 <input type="checkbox"/> 3 <input type="checkbox"/> N.A.
Estadio Inicial – M:	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> N.A.
Estadiamento Clínico:	<input type="checkbox"/> IIa	<input type="checkbox"/> IIb <input type="checkbox"/> IIIa <input type="checkbox"/> IIIb <input type="checkbox"/> IIIc <input type="checkbox"/> N.A. <input type="checkbox"/> Ignorado

Grau Histológico:	<input type="checkbox"/> Grau I	<input type="checkbox"/> Grau II	<input type="checkbox"/> Grau III	<input type="checkbox"/> Indisponível	<input type="checkbox"/> Ignorado
KI 67:	<i>em porcentagem</i>				
Histórico Familiar					
Câncer de mama medular e/ou fenótipo triplo negativo?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Ignorado		
Câncer de ovário?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Ignorado		
Dois casos de câncer de mama na família?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Ignorado		
Três casos de câncer de mama na família?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Ignorado		
Quatro casos de câncer de mama na família com qualquer idade (pelo menos dois familiares de primeiro grau)?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Ignorado		
Câncer de mama masculino e outro caso de câncer de mama?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Ignorado		
Câncer de mama bilateral?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Ignorado		
Câncer de mama e ovário em uma mesma pessoa?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Ignorado		
Dois casos de câncer de pâncreas e/ou próstata (Gleason>7) em qualquer idade?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Ignorado		
Câncer de mama?	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Ignorado		
Exame Físico					
Medida do tumor:	Cm				
Linfonodos Palpáveis:	<input type="checkbox"/> Não	<input type="checkbox"/> Sim	<input type="checkbox"/> Ignorado		
Tamanho do maior linfonodo palpável na axila:	Cm				
Visita					
Ciclo: C ___ D ___					
Superfície Corpórea:	m2				
Dose de Doxorrubicina:	mg				
Dose de Ciclofosfamida:	mg				
ECOG	<input type="checkbox"/> 0	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/> 2	<input type="checkbox"/> 3	<input type="checkbox"/> 4 <input type="checkbox"/> 5

ANEXO 2: PORCENTAGENS DE COBERTURAS DE 30X, 50X, 100X E COBERTURA MÉDIA DAS AMOSTRAS.

Corrida 1				
Amostras	30x	50x	100x	Média
Fc1856	99,04	97,57	66,80	125,6
Fc1874	99,06	97,79	79,38	150,5
Fc1946	99,24	98,35	85,28	165,2
Fc1958	99,24	98,42	86,12	171,2
Fc1965	99,10	97,77	76,91	142,9
Fc2000	99,21	98,47	87,14	175,9
Fc2099	99,20	98,38	85,26	164,4
*Fc2111	2,93	0,35	0	13,1
Fc2141	99,18	98,68	87,53	162,5
Fc2142	99,26	98,84	91,59	182,9
Fc2147	99,22	98,63	85,11	158,9
Fc2155	99,06	97,75	64,65	122,2
*Foi repetida no sequenciamento final, devido as baixas coberturas obtidas.				
Corrida 2				
Amostras	30x	50x	100x	Média
*Fc1731	95,69	66,83	8,57	62,9
*Fc1763	65,06	18,41	0,13	38,0
*Fc1765	98,42	88,54	20,71	80,6
Fc1776	99,05	96,81	59,87	117,4
*Fc1777	98,51	89,97	24,53	84,4
Fc1787	99,00	97,07	58,83	115,6
Fc1805	98,94	96,94	62,17	120,1
Fc1810	98,74	95,64	52,71	110,1
Fc1826	99,04	98,31	82,68	149,8
*Fc1827	97,65	79,43	13,32	70,9
Fc1845	99,07	98,06	74,97	136,8
Fc1851	99,21	98,71	87,72	162,4

*Foram repetidas no sequenciamento final, devido as baixas coberturas obtidas.

Corrida 3

Amostras	30x	50x	100x	Média
Fc1897	99,29	98,98	94,02	210,2
Fc1903	99,21	98,84	93,76	205,7
Fc1926	98,6	92,54	40,24	98,6
Fc1939	98,86	94,46	40,75	99,5
Fc2074	99,23	98,88	94,34	216,2
Fc2086	99,31	99,18	98,03	272,8
Fc2121	99,24	98,84	86,40	151,8
Fc2163	99,18	98,35	77,47	141,9
Fc2176	99,30	98,85	90,04	183,5
Fc2177	99,29	98,80	86,41	164,8
Fc2182	99,28	99,14	97,97	268,2
Fc2199	99,29	99,18	97,52	247,6

Corrida 4

Amostras	30x	50x	100x	Média
Fc2520	99,37	99,26	98,78	309,7
Fc2528	99,34	99,23	98,18	259,4
Fc2543	99,34	99,25	98,62	300,6
Fc2552	99,37	99,32	99,10	405,5
Fc2553	99,32	99,23	98,54	268,6
Fc2560	99,23	99,04	97,60	284,1
Fc2562	99,33	99,25	98,76	325,3
Fc2563	99,36	99,27	98,83	313,4
Fc2571	99,31	99,15	97,59	229,1
Fc2572	99,31	99,16	97,96	264,3
Fc2573	99,32	99,24	98,34	262,4
Fc2617	99,16	98,52	79,92	142,3

Corrida 5

Amostras	30x	50x	100x	Média
----------	-----	-----	------	-------

Fc2618	99,21	98,97	97,17	234,5
Fc2621	99,24	98,99	96,96	258,1
Fc2642	99,24	99,01	97,33	231,1
Fc2646	99,13	98,72	95,03	207,2
Fc2650	98,86	98,42	95,32	210,5
Fc2654	98,87	97,44	67,76	126,2
Fc2655	99,19	98,93	96,86	222,4
Fc2656	98,77	96,80	75,63	146,3
Fc2662	99,11	98,77	95,76	208,4
Fc2663	98,75	97,18	64,97	122,9
Fc2671	98,90	97,85	73,89	135,3
Fc2679	98,92	98,25	86,44	159,3

Corrida 6

Amostras	30x	50x	100x	Média
Fc2684	99,27	99,01	93,63	189,9
Fc2695	99,19	98,86	88,61	165,4
Fc2727	99,20	98,89	91,50	177,4
Fc2731	99,27	99,01	93,82	191,5
Fc2735	99,20	98,64	82,02	151,4
Fc2739	99,12	98,52	83,05	151,2
Fc2783	98,92	98,22	86,60	171,3
Fc2791	99,12	98,27	75,40	136,8
Fc2792	99,25	98,86	87,63	162,2
Fc2810	99,18	98,57	83,19	152,8
Fc2877	99,10	98,19	73,70	134,4
Fc2878	99,12	97,59	64,08	122,3

Corrida 7

Amostras	30x	50x	100x	Média
Fc2917	99,13	98,79	94,12	207,1
Fc2927	98,97	98,36	90,44	187,3
Fc2941	99,10	98,61	91,36	181,5

Fc2958	98,96	98,27	86,76	164,4
Fc2959	99,06	98,46	87,40	163,1
Fc2989	99,04	98,28	84,15	156,5
Fc3021	98,97	98,02	78,32	143,5
Fc3040	99,06	98,61	92,32	188,6
Fc3041	99,06	98,69	93,68	201,3
Fc3066	98,82	97,78	77,04	140,6
Fc3074	99,08	98,61	92,92	196,4
Fc3077	99,10	98,62	90,39	175,2

Corrida 8

Amostras	30x	50x	100x	Média
Fc3078	99,06	98,62	94,78	205,4
Fc3079	99,19	98,86	95,73	215,4
Fc3082	99,00	98,53	93,56	195,5
Fc3086	99,13	98,60	87,71	167,2
Fc3090	99,21	98,80	91,81	176,2
Fc3091	99,10	98,58	90,21	171,6
Fc3097	99,05	98,43	89,46	170,4
Fc3099	99,19	98,61	88,42	163,5
Fc3114	99,13	98,77	93,97	192,0
Fc3117	99,00	98,48	90,59	176,0
Fc3120	99,13	98,54	87,83	164,2
Fc3121	98,98	97,92	75,10	137,0

Corrida 9

Amostras	30x	50x	100x	Média
Fc3124	99,36	99,27	98,82	387,5
Fc3130	99,23	99,04	97,44	260,9
Fc3134	99,25	99,04	97,29	253,4
Fc3135	99,21	98,98	97,52	264,6
Fc3138	99,11	98,74	96,87	251,0
Fc3139	99,03	98,50	91,62	191,6

Fc3148	99,00	98,61	94,78	217,0
Fc3164	98,96	98,71	95,92	222,8
Fc3196	99,06	98,72	96,16	231,4
Fc3230	98,95	98,42	92,67	191,6
Fc3232	99,10	98,65	94,50	208,1
Fc2186	99,00	98,61	93,82	203,2

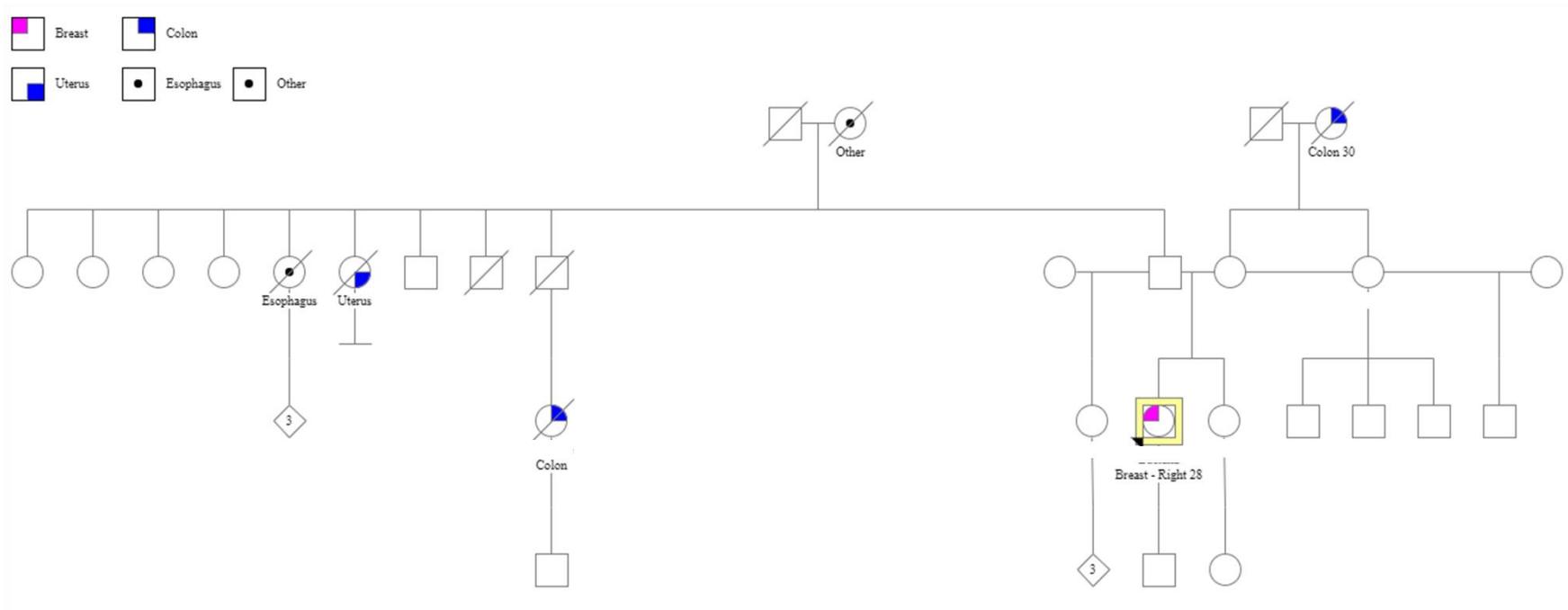
Corrida 10

Amostras	30x	50x	100x	Média
Fc1733	99,08	98,61	91,59	178,5
Fc3256	98,78	97,57	72,84	133,6
Fc3286	98,93	98,18	80,30	146,6
Fc3296	98,82	98,01	80,25	147,2
Fc3301	98,73	97,16	64,87	122,0
Fc3302	98,86	97,42	67,34	125,9
Fc3320	98,77	97,45	65,18	122,8
Fc3340	98,80	97,63	70,35	129,9
Fc3382	98,89	97,80	74,72	137,0
Fc3383	98,78	97,54	71,27	131,1
Fc3384	99,05	98,54	91,37	180,3
Fc3386	98,85	97,11	63,16	120,8

Corrida 11

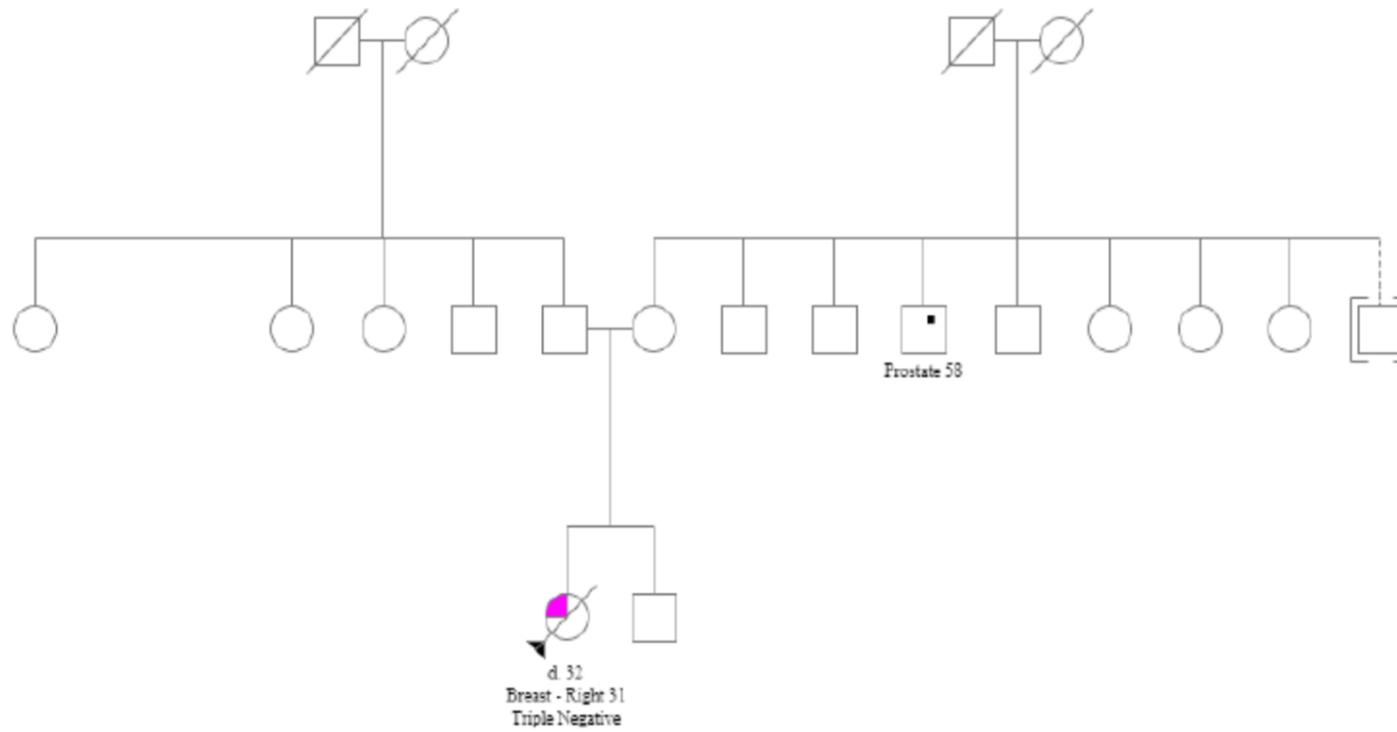
Amostras	30x	50x	100x	Média
Fc1700	99,21	98,46	81,27	151,8
Fc1731	99,25	98,92	90,01	173,7
Fc1763	99,12	97,65	73,04	136,1
Fc1765	99,31	99,05	92,96	189,8
Fc1777	99,27	98,91	90,82	178,6
Fc1827	99,14	98,56	88,07	173,4
Fc1987	99,21	98,85	89,89	173,6
Fc2111	99,30	99,06	92,98	190,2
Fc2135	99,31	99,08	92,32	182,8

Fc2529	99,28	98,96	91,13	181,5
Fc2936	99,26	98,70	83,92	155,9
Fc3398	99,24	98,59	85,41	164,1

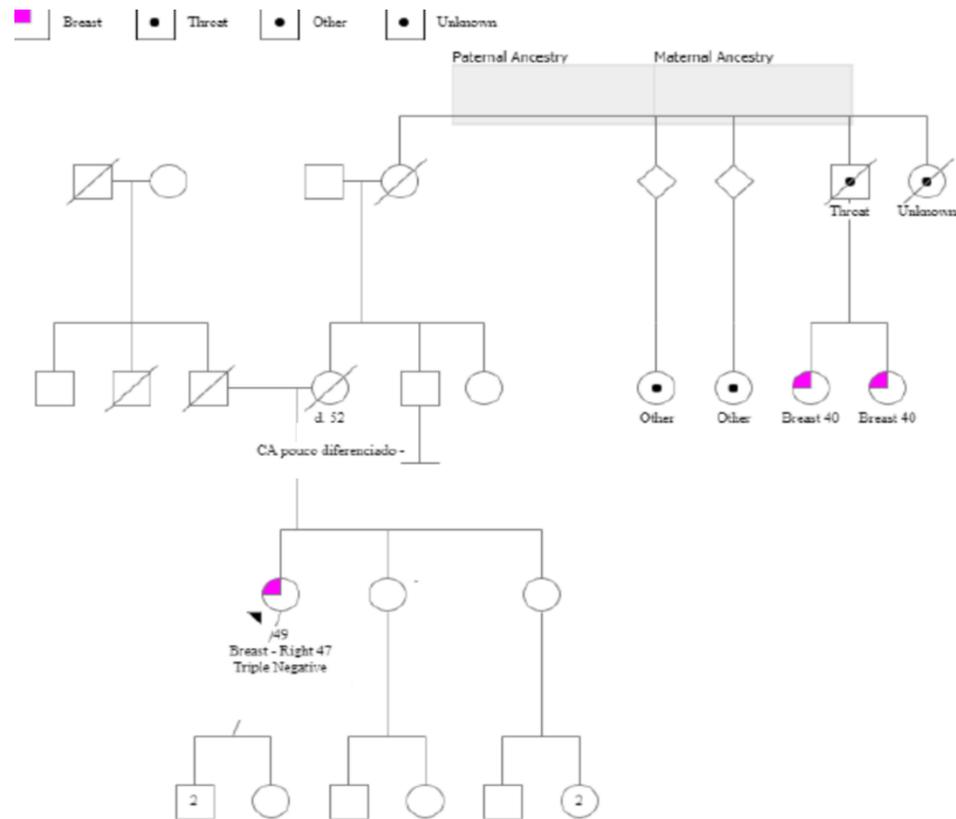
ANEXO 3: HEREDOGRAMAS DAS PACIENTES COM VARIANTES PROVAVELMENTE PATOGÊNICAS E PATOGÊNICAS.**Fc3301 – ALK - c.1154+1G>A**

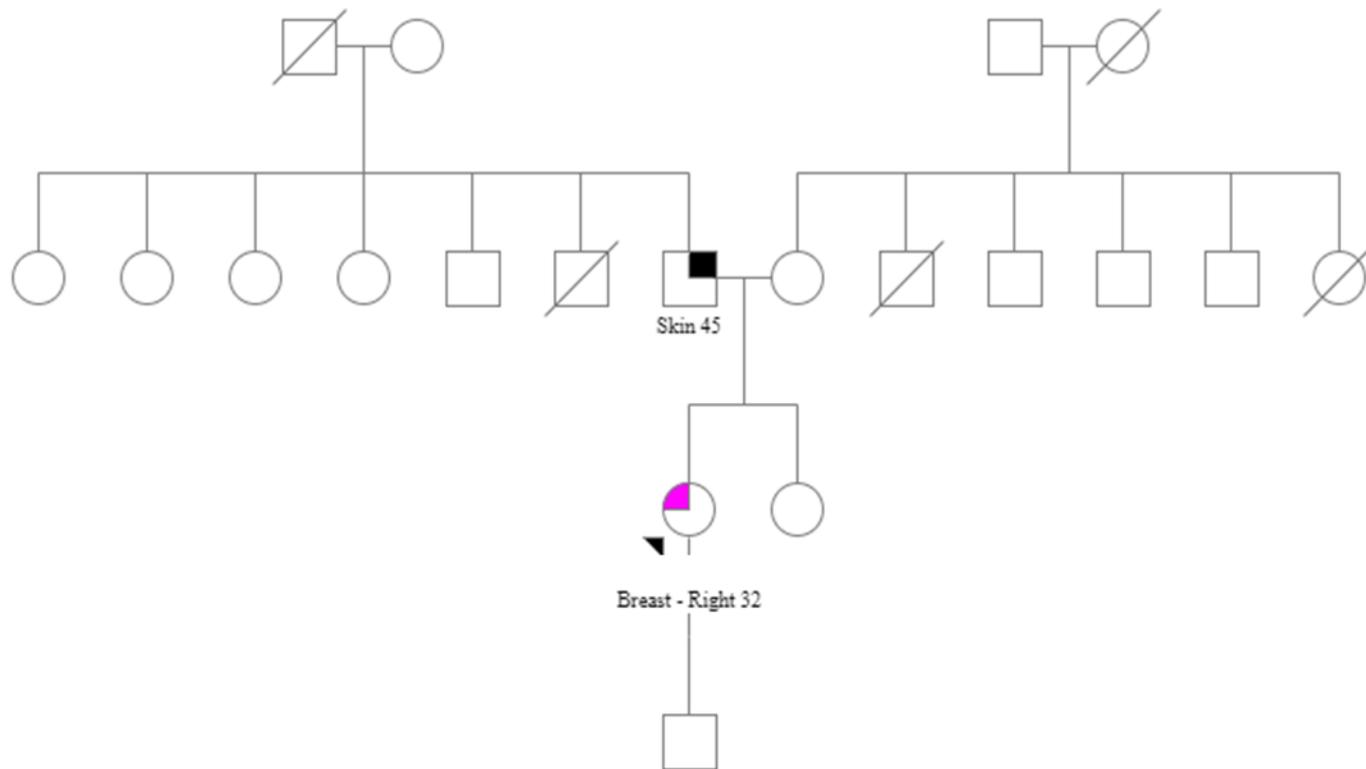
Fc2121 – *CDKN2A* – c.301G>T – p.Gly101Trp

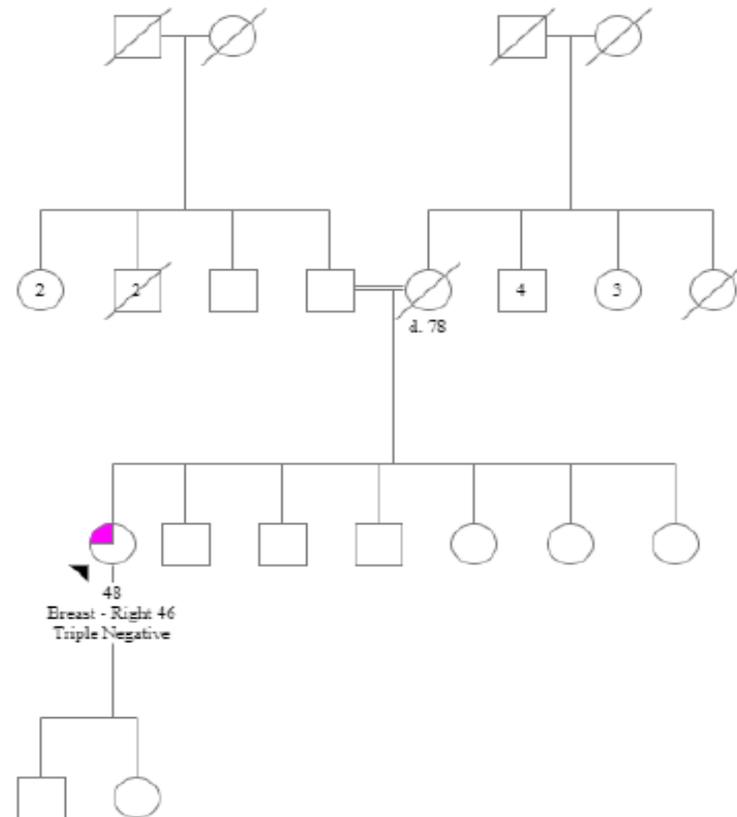
■ Breast ■ Prostate



Fc2562 – CYLD – c.2272C>T – p.Arg758*

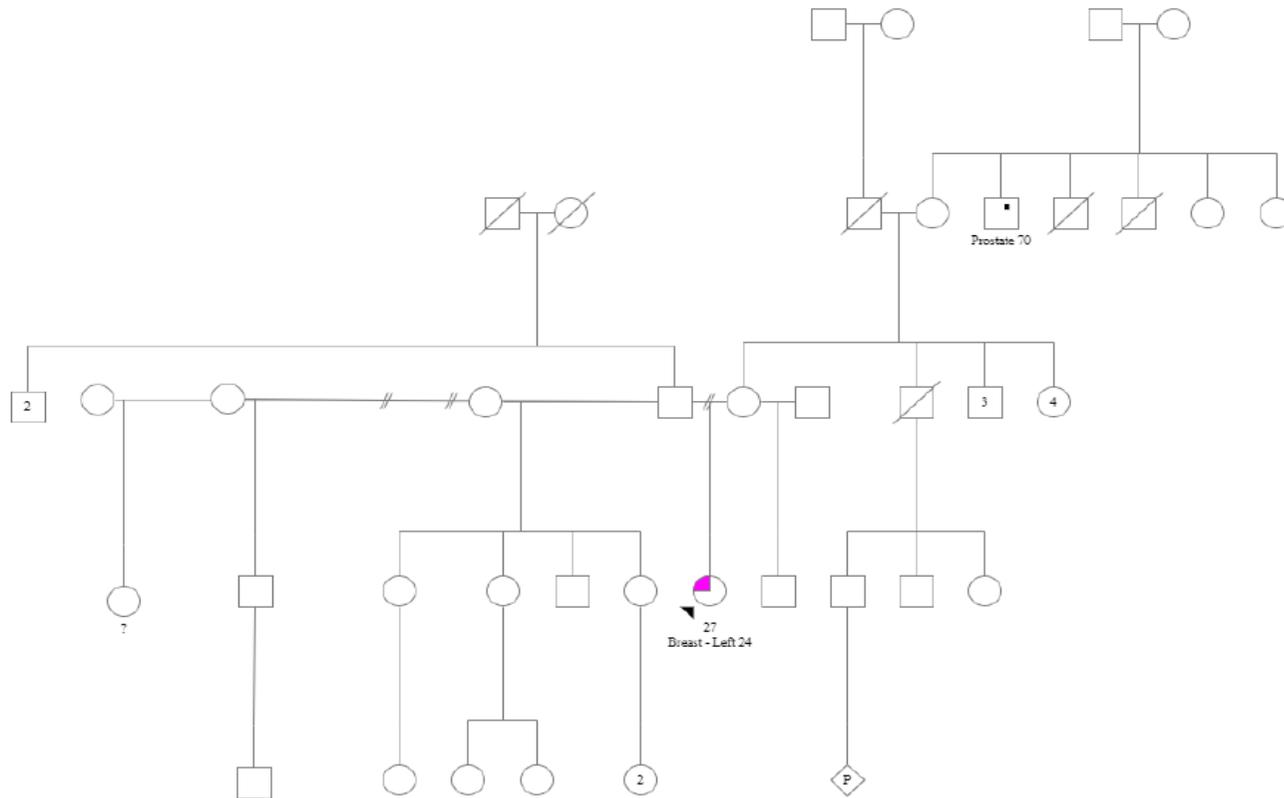


Fc3256 – EPHB2 – c.3059del – p.Lys1020Argfs*63

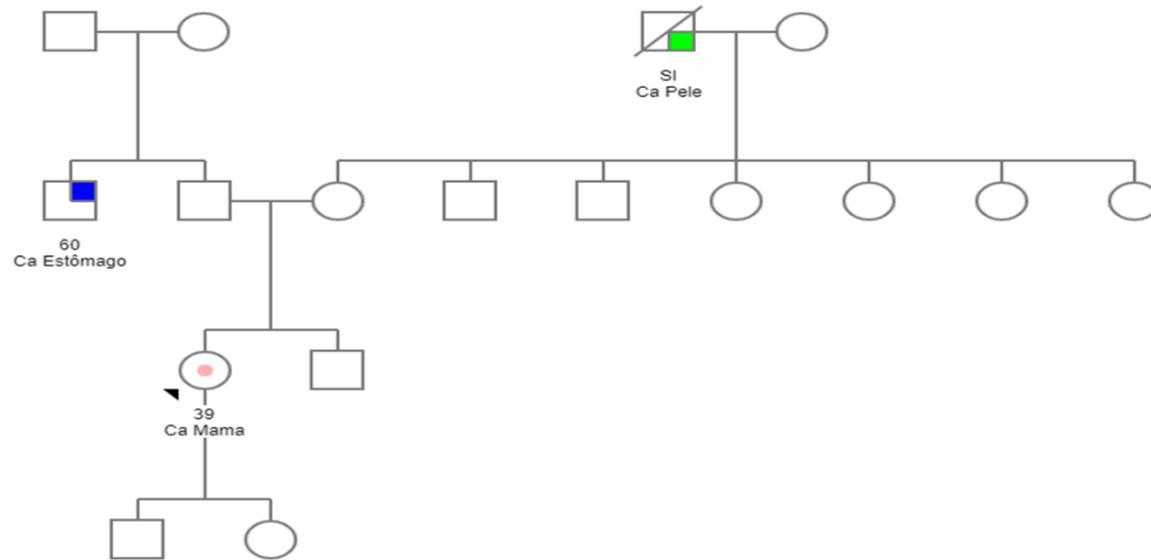
Fc2727 – FANCA – c. 3385G>C – p.Asp1129His Breast

Fc2163 – FANCD2 – c.696-1G>A

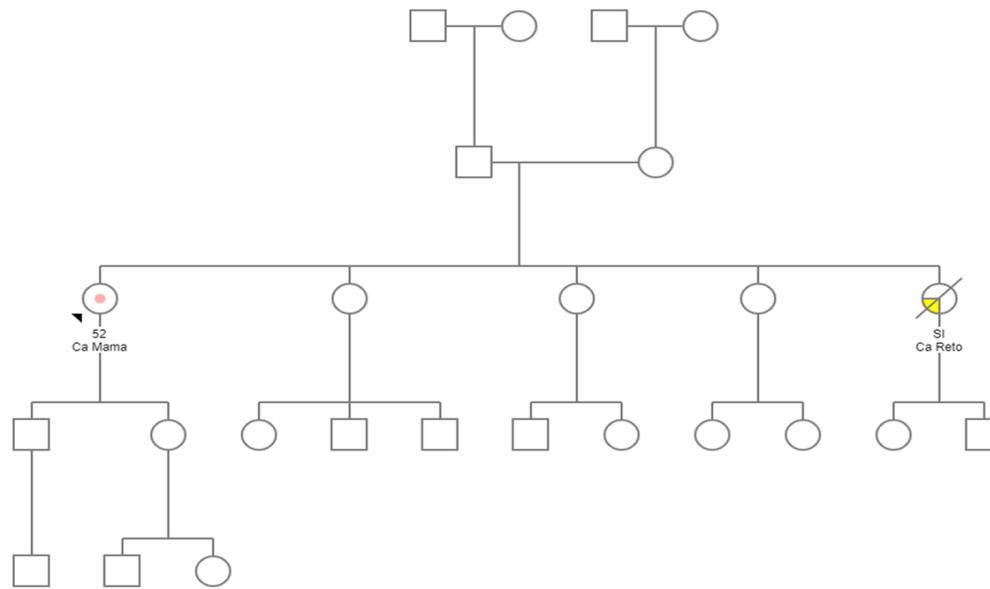
■ Breast ■ Prostate



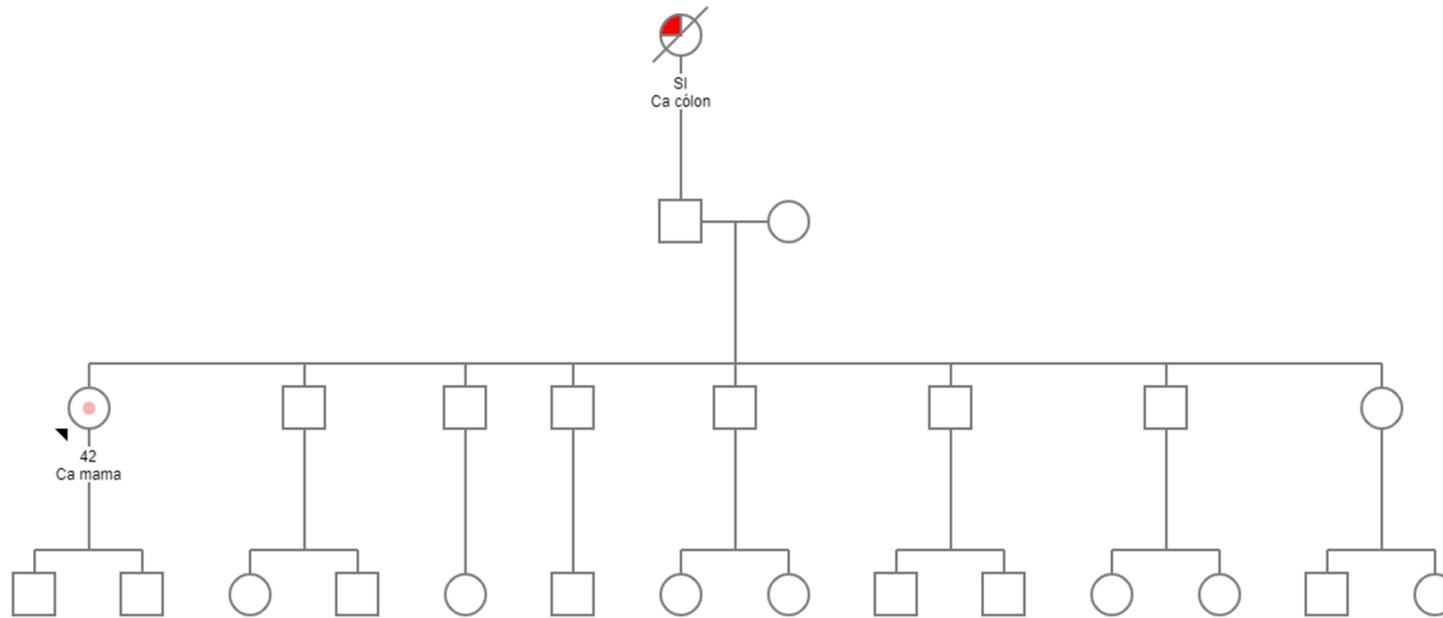
Fc2936: *FANCD2* – c. 1278+3_1278+6del, p. Val427Phefs*20



Fc3286: *FANCD2* – c.1278+3_1278+6del, p. Val427Phefs*20

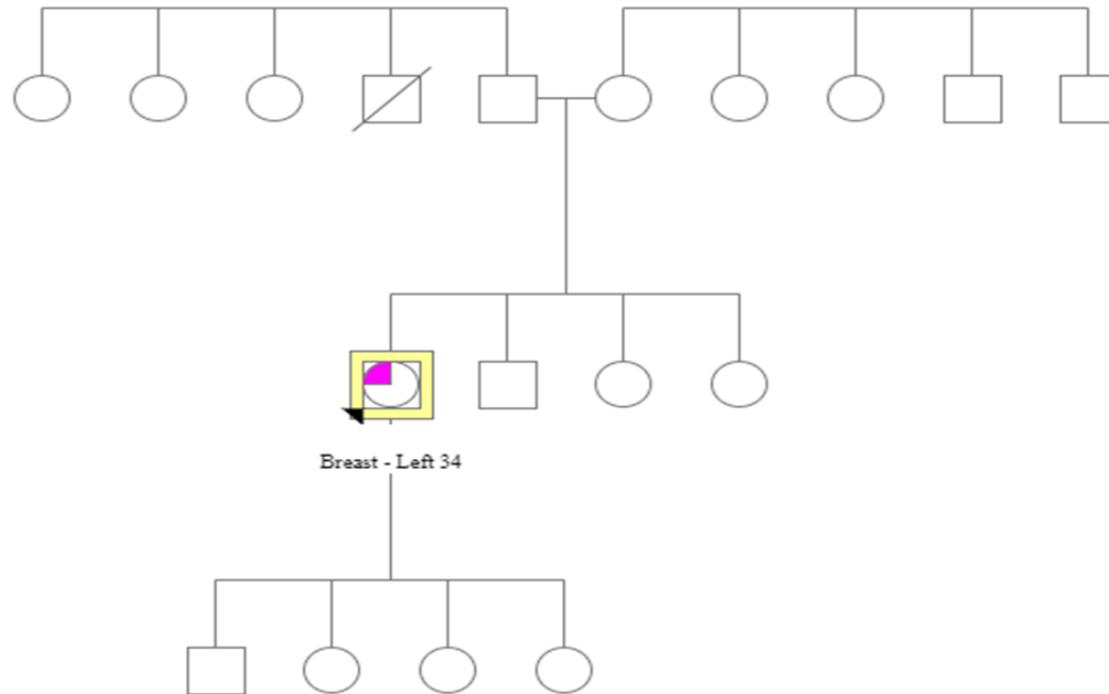


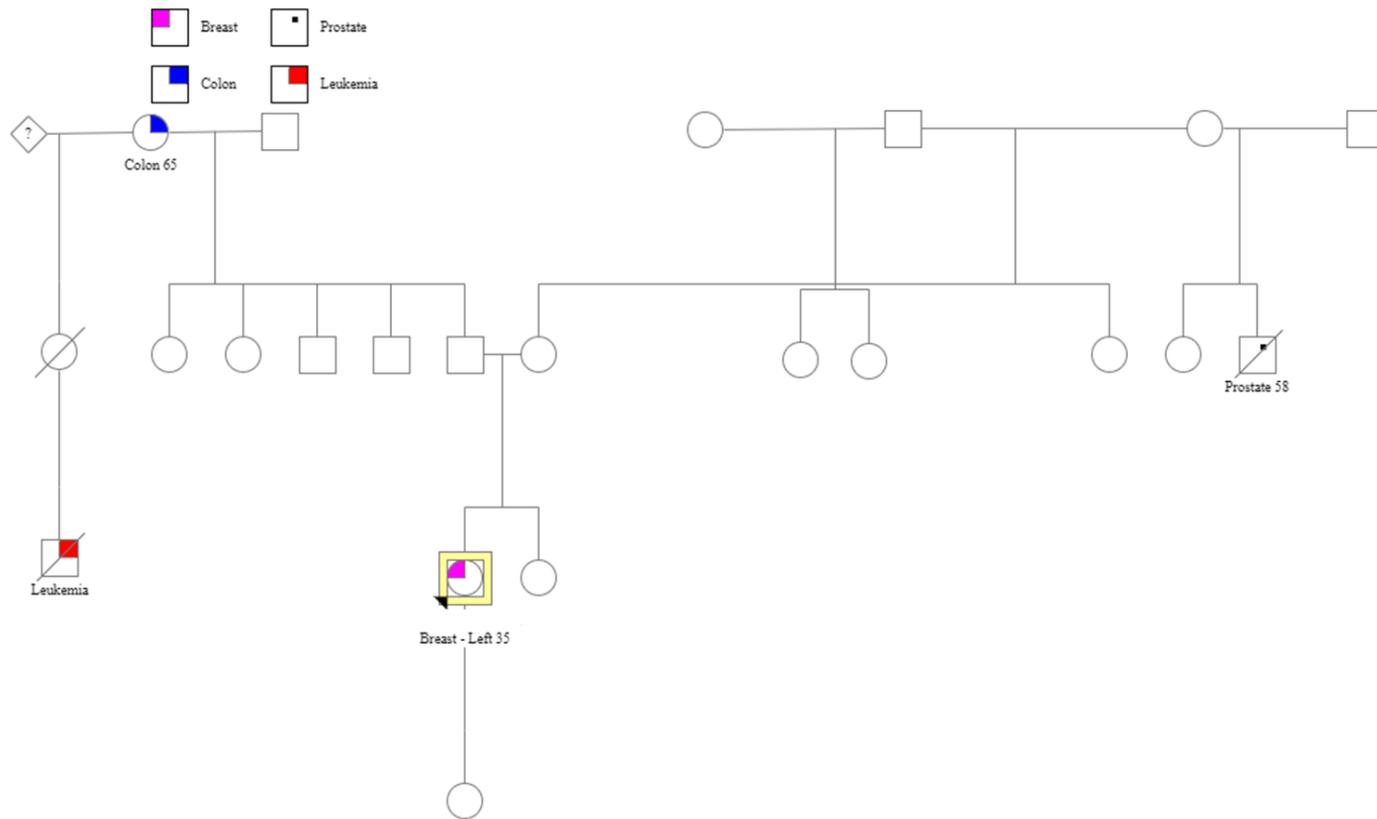
Fc3320: *FANCD2* – c. 1278+3_1278+6del, p. Val427Phefs*20



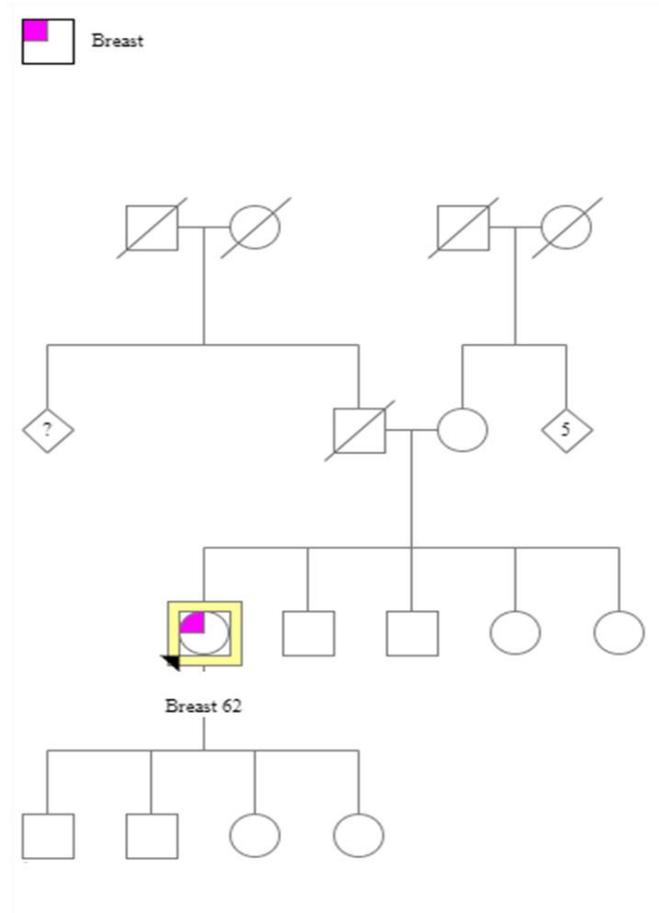
Fc2959 – FANCE – c.1114-1G>A

 Breast

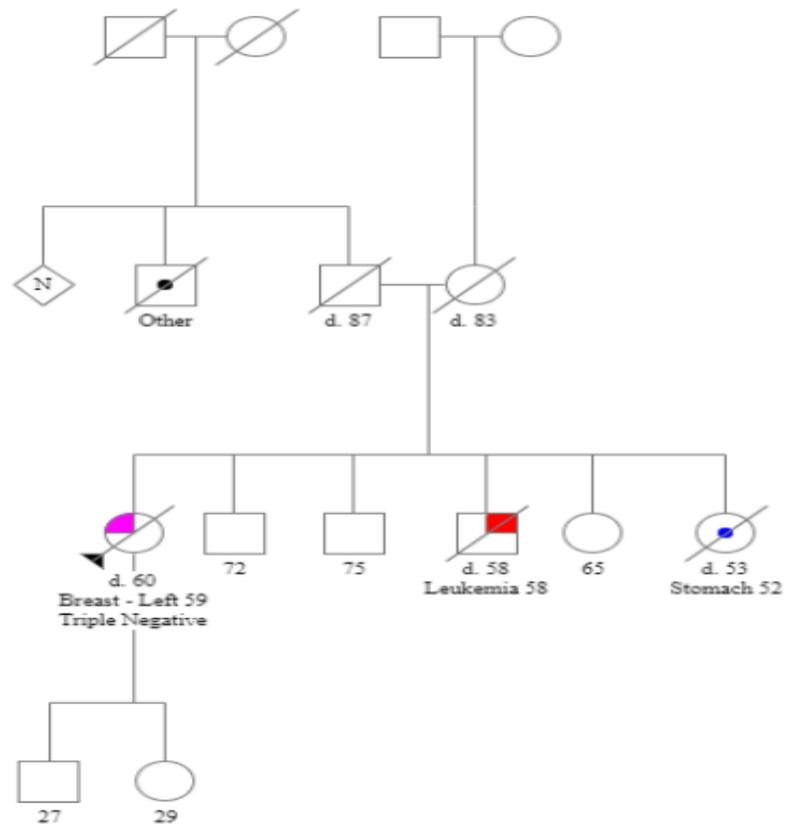


Fc3074 – FANCE – c.1114-1G>A

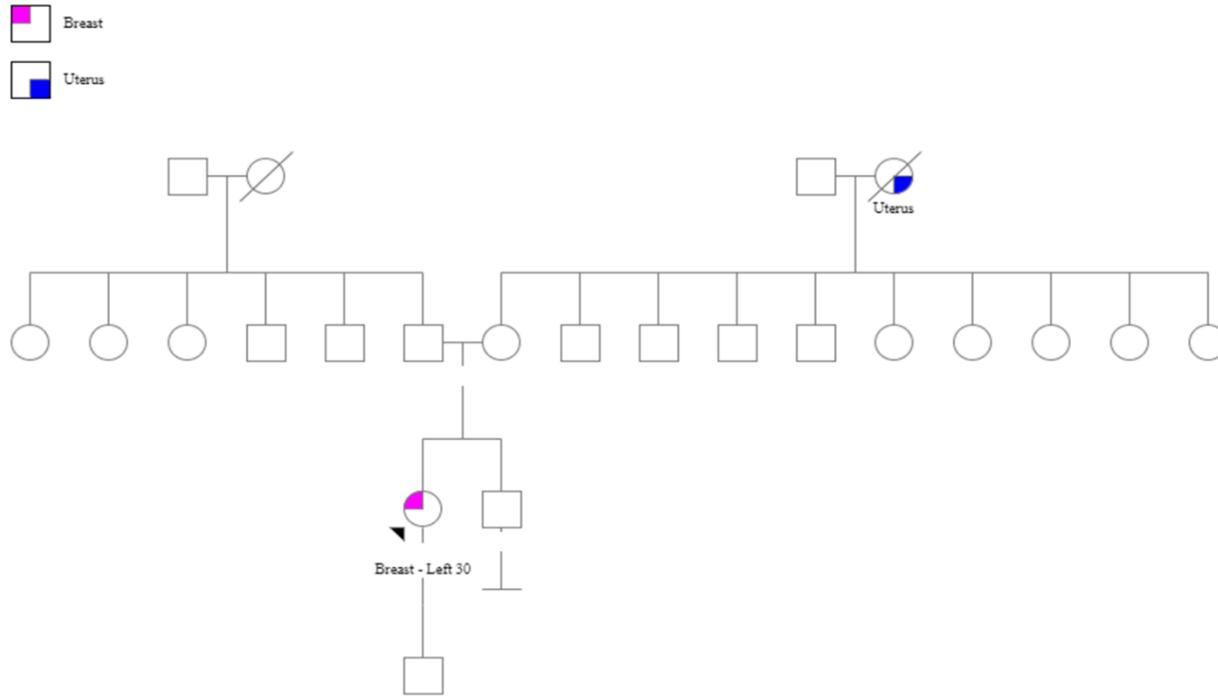
Fc3232 – G6PC – c.247C>T - p. Arg83Cys

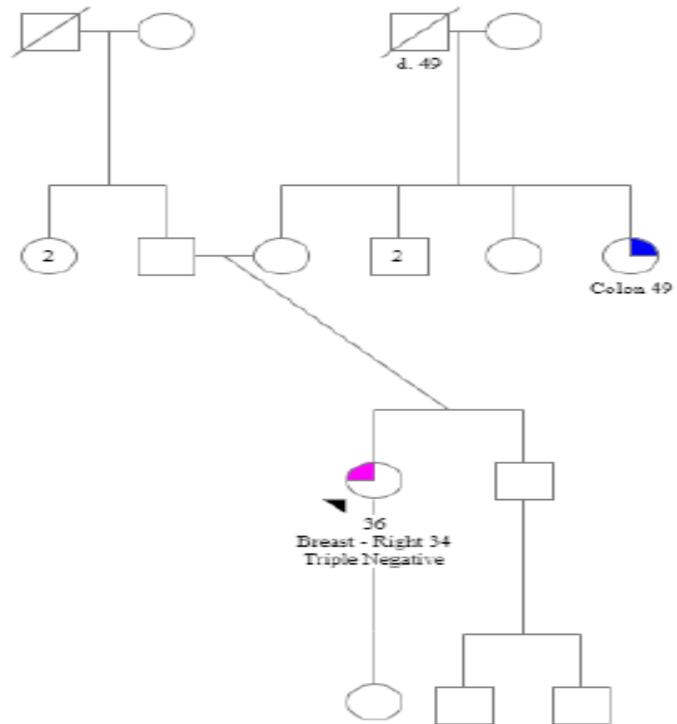
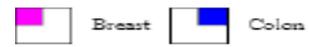


Fc1874 – MLH1 – c.827T>C – p.Ile726Thr

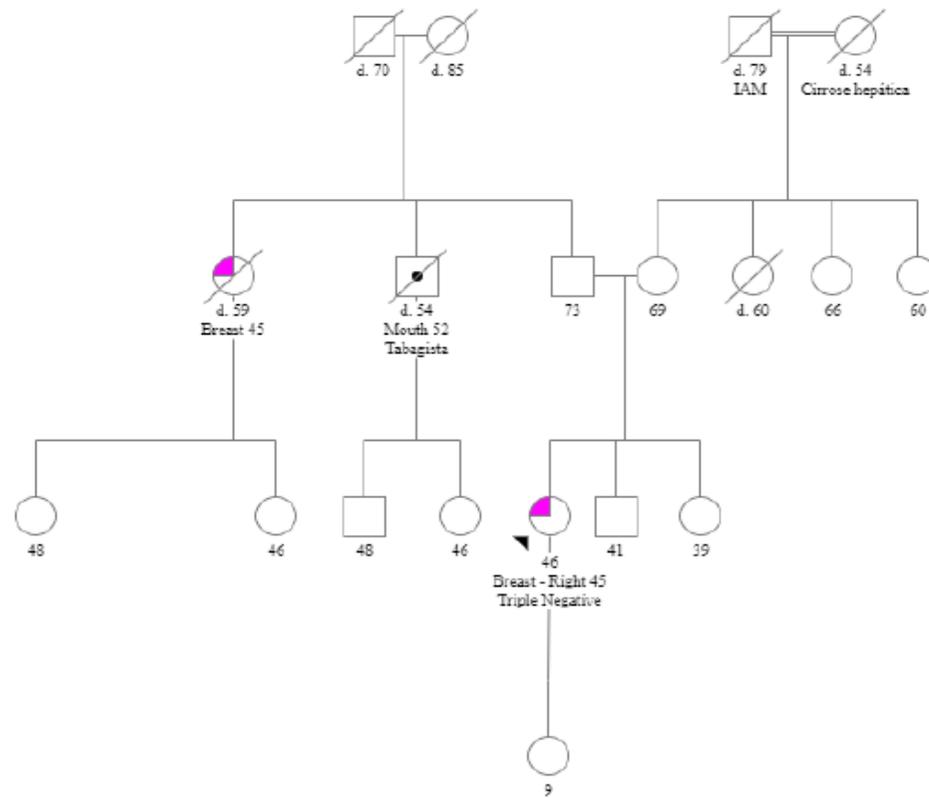
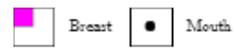


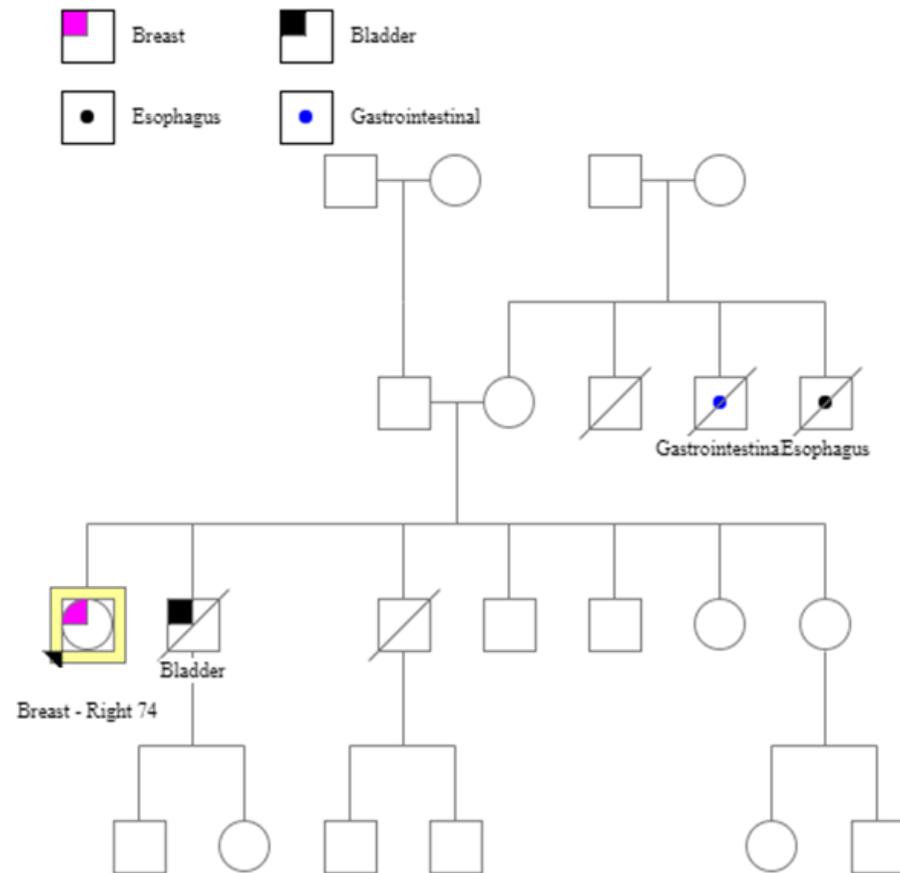
Fc3386 – MLH1 - c.94A>G – p. Ile32Val



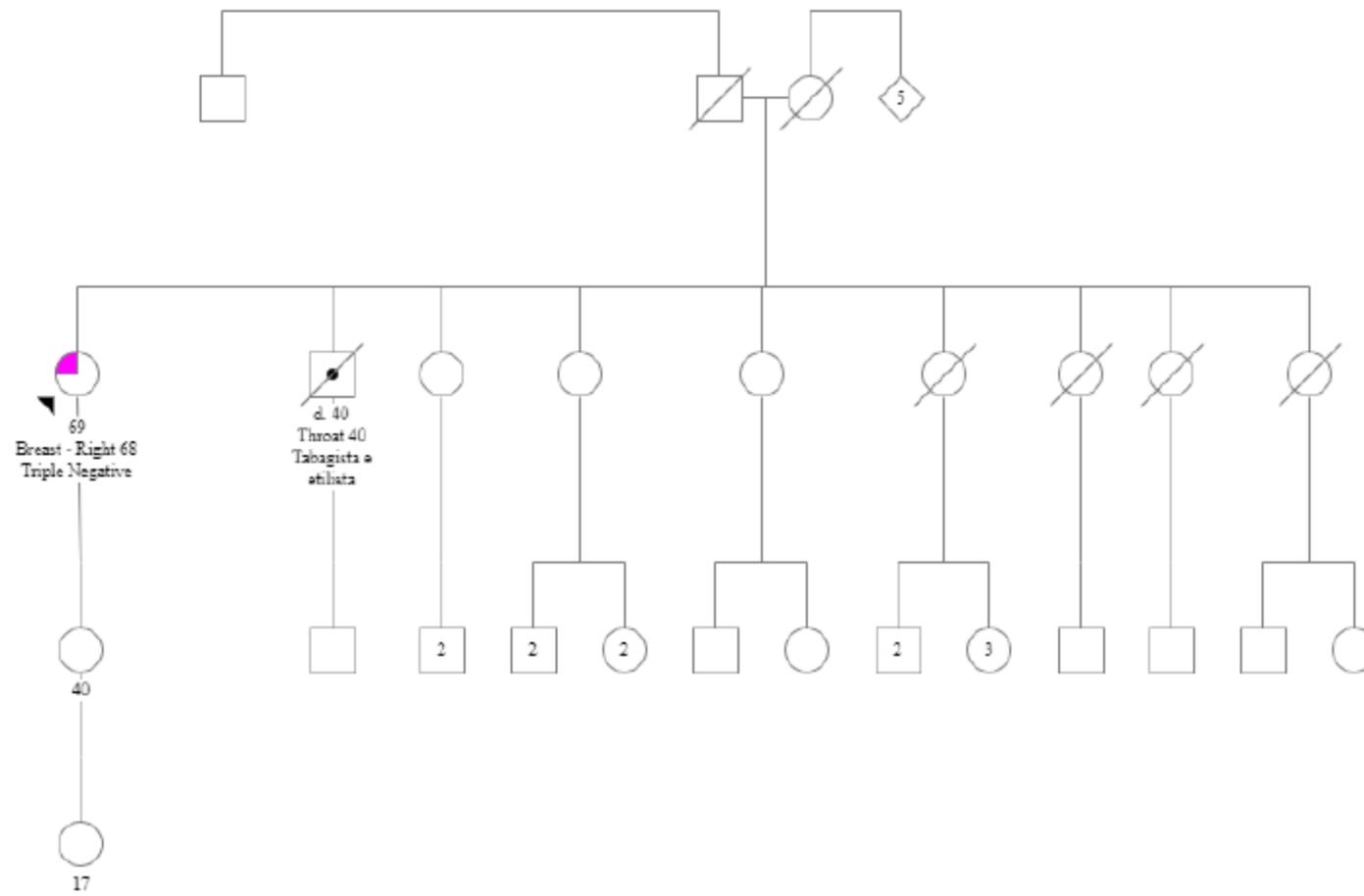
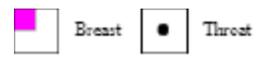
Fc2650 – *MUTYH* – c.1187G>A – p.Gly396Asp

Fc2878 – *PALB2* – c.840delC – p.Asn280Lysfs*3

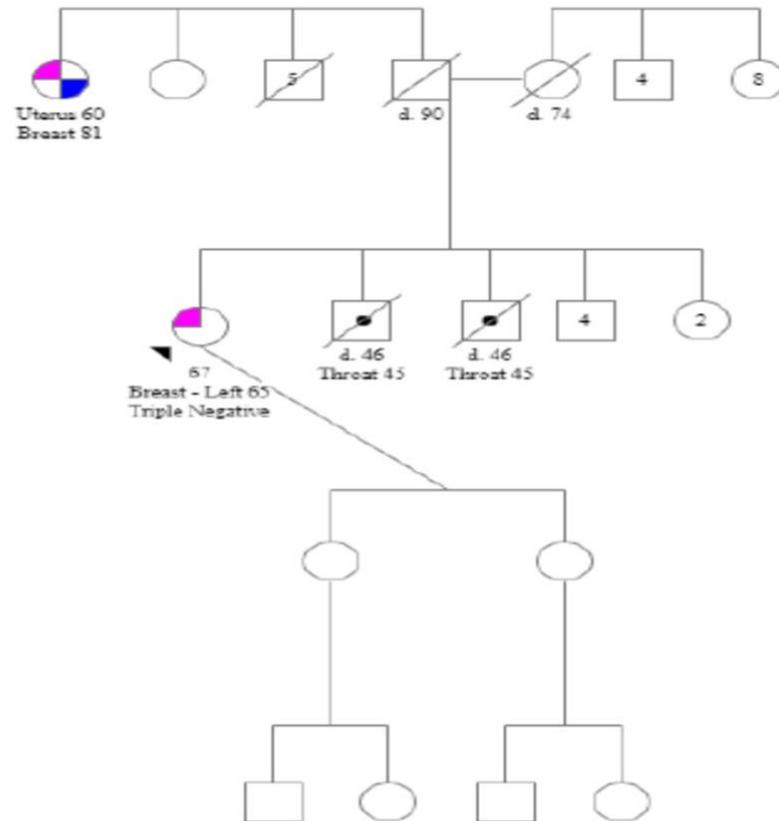


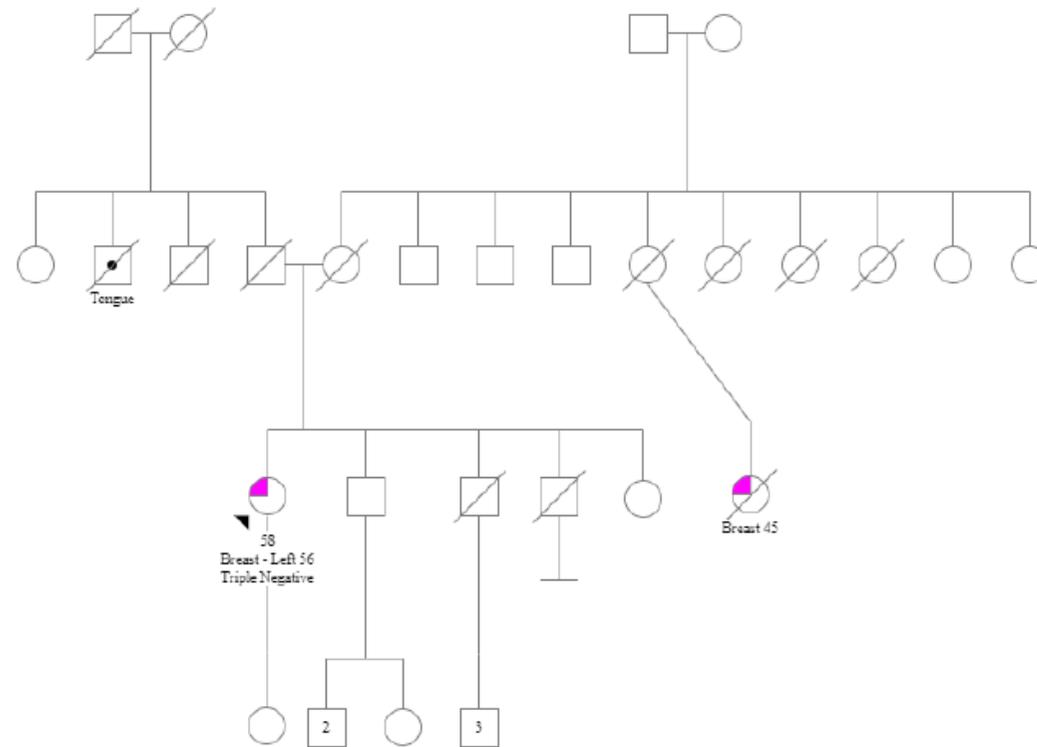
Fc3138 – PALB2 – c.240del – p.Cys824Valfs*3

Fc2792 – PMS2 – c.2186_2187delTC – p. Leu279Glnfs*6



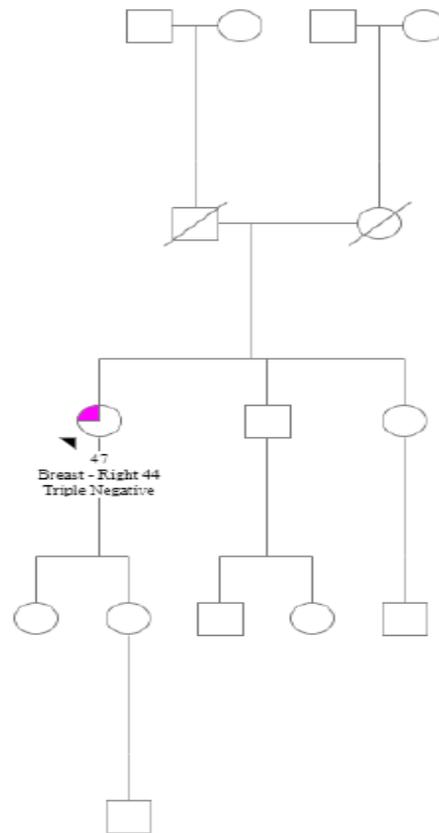
Fc2528 – RAD51C – c.890_899del – p. Leu296Hisfs*2

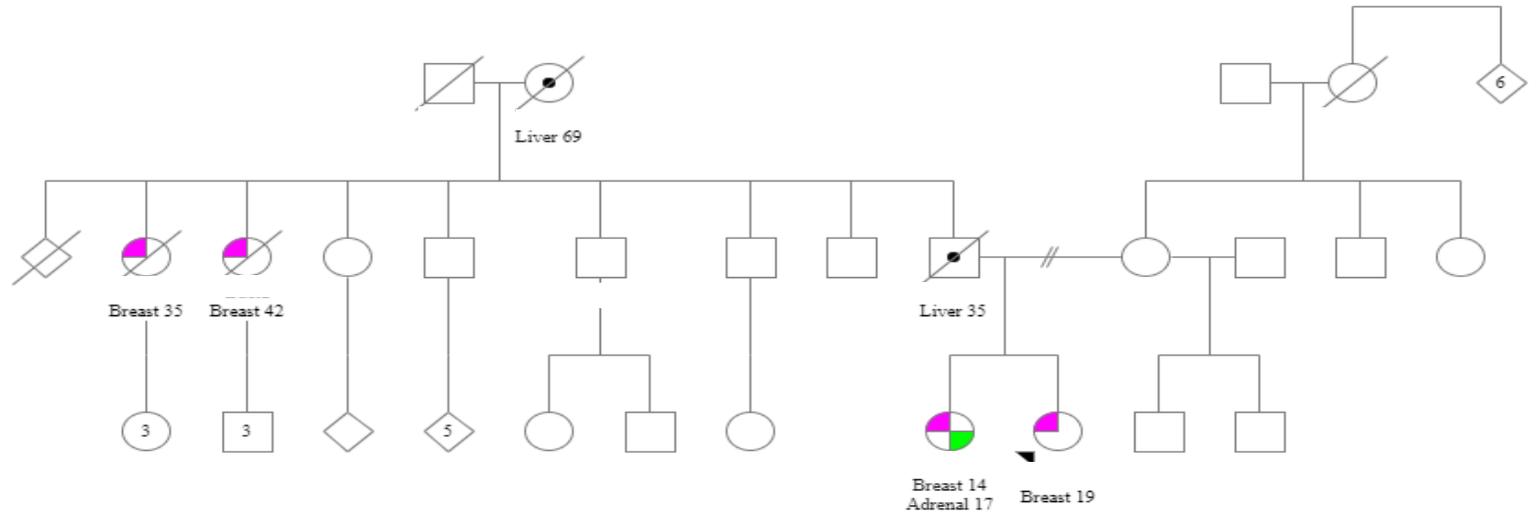
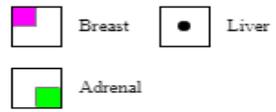


Fc2791 – RAD51D – c.694C>T – p.Arg232*

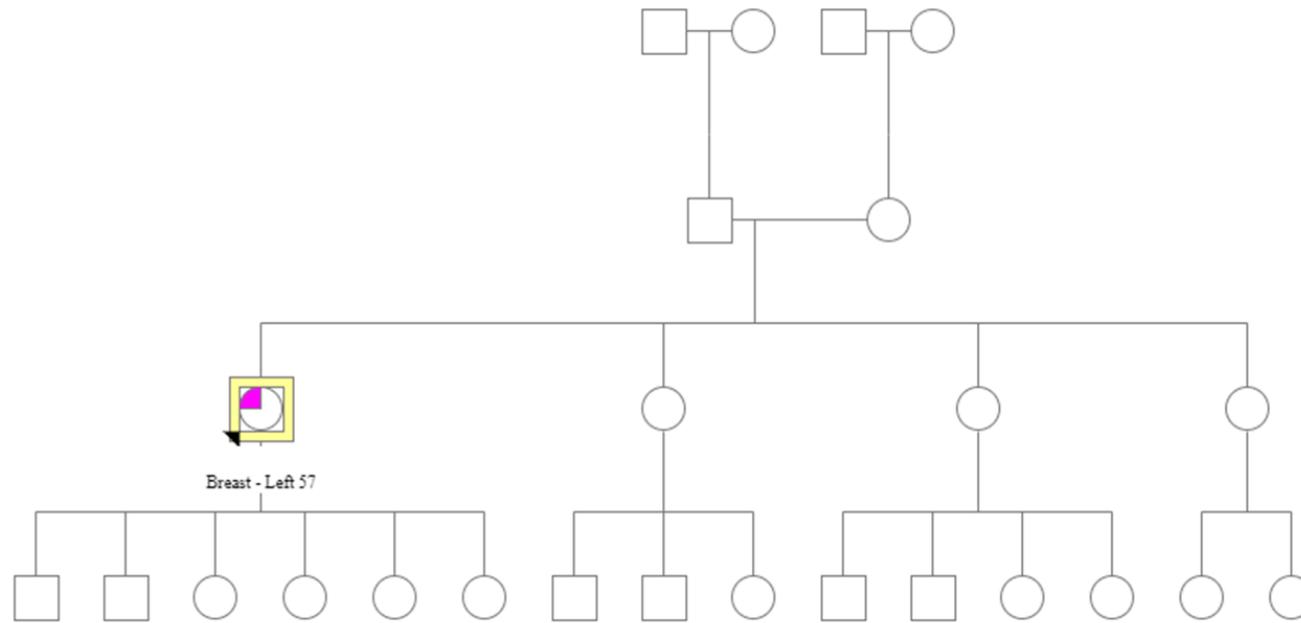
Fc1958 – SBDS – c.258+2T>C

 Breast

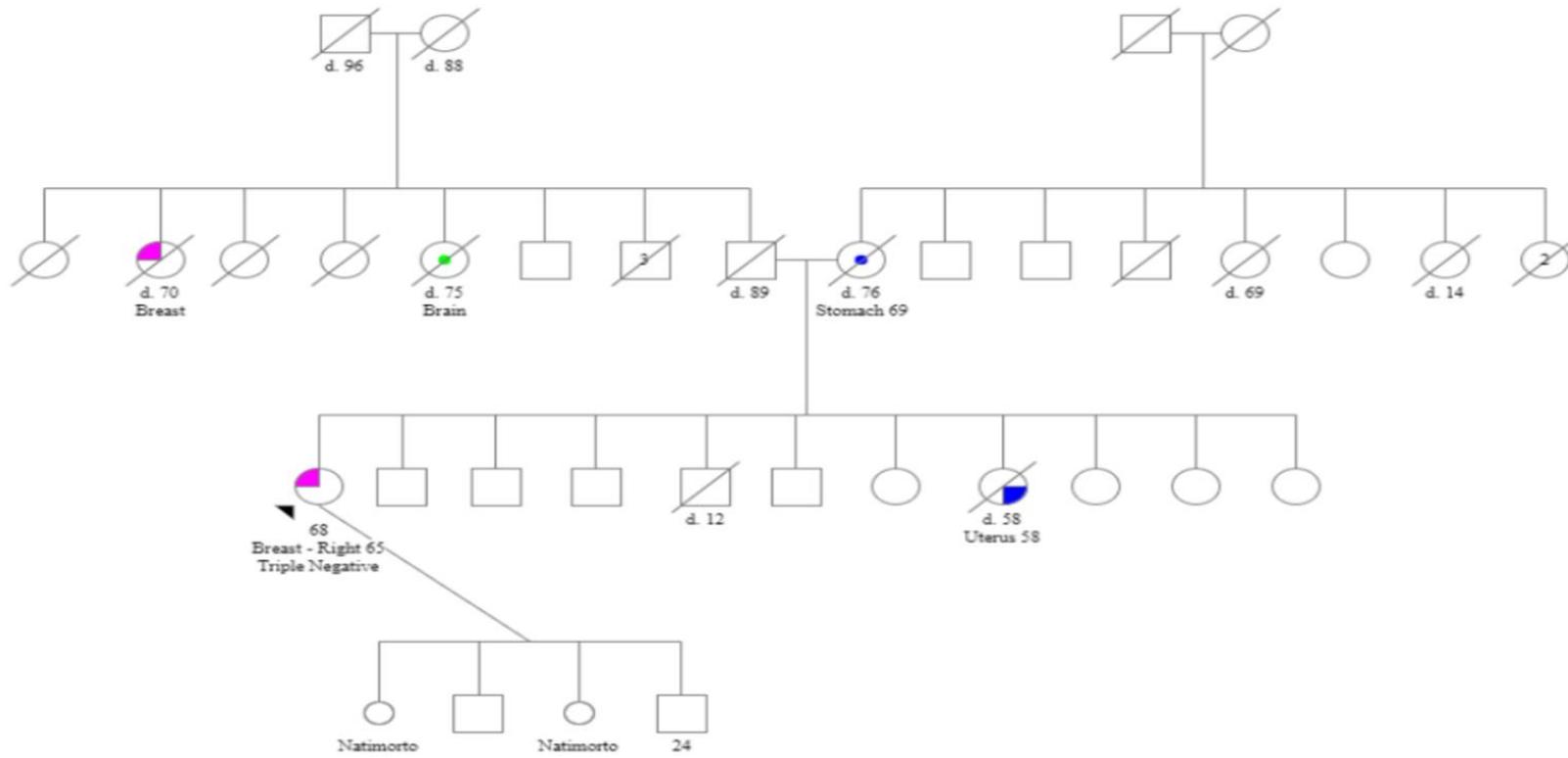


Fc2186 – TP53 - c.524G>A – p. Arg175His

Fc3296 – *TP53* – *c.742C>T* – *p.Arg248Trp*



Fc1903 – WRN – c.1273_1276delTTAT – p.Ser426Profs*11



ANEXO 4: VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO INCERTO (VUS)

ID	Gene	cDNA- HGVS	p. HGVS	VAF	ACMG (revisão manual)	REVEL	gnomAD (ALL)	AbraOM
Fc3134	<i>AIP</i>	c.940C>T	<i>p. Arg314Trp</i>	52,82	PM2, PP3, BS2, BP1	0,527	0,0000204	NC
Fc1810	<i>ALK</i>	c.347C>A	<i>p. Ala116Asp</i>	36	PM2, BP4	0,046	NC	NC
Fc2099	<i>AKT1</i>	c.521G>A	<i>p. Arg174His</i>	56,1224	PM2, BP4	0,146	0,00000796	NC
Fc3091	<i>APC</i>	c.4594G>A	<i>p. Asp1532Asn</i>	48,59	PM2	0,392	0,00000799	0,000427
Fc2958	<i>APC</i>	c.8524T>G	<i>p. Ser2842Ala</i>	47,58	PM2, PP3	0,394	0,0000120	NC
Fc1763	<i>ATM</i>	c.1595G>A	<i>p.Cys532Tyr</i>	48,42	PM2, PP3	0,578	0,000245	0,002989
Fc2111	<i>ATM</i>	c.1703G>T	<i>p.Arg568Ile</i>	47,2	PM2	0,139	0,000198	0,000854
Fc3256	<i>ATM</i>	c.7552C>T	<i>p. Pro2518Ser</i>	58,56	PM2, PP3	0,759	0,0000425	0,00854
Fc3232	<i>ATM</i>	c.8560C>T	<i>p. Arg2854Cys</i>	46,21	PM1, PM2, PP3, BP6	0,904	0,000173	0,000427
Fc3041	<i>ATM</i>	c.3240C>A	<i>p. Asp1080Glu</i>	49,3	PM2, BP4	0,521	0,0000239	0,001281
Fc2529	<i>ATM</i>	c.6268G>A	<i>p.Asp2090Asn</i>	46,82	PM2	0,202	NC	NC
Fc2671	<i>ATM</i>	c.6503C>T	<i>p.Ser2168Leu</i>	45,5782	PM2, PP3	0,674	NC	NC
Fc2135	<i>BARD1</i>	c.1376A>G	<i>p.His459Arg</i>	53,94	PM2	0,223	0,00000369	NC

Fc1926	<i>BARD1</i>	c.1603G>C	<i>p. Asp535His</i>	56,3089	PM2	0,321	NC	NC
Fc1939	<i>BARD1</i>	c.1603G>C	<i>p. Asp535His</i>	55,0495	PM2	0,321	NC	NC
Fc2642	<i>BARD1</i>	c.1981A>G	<i>p. Arg661Gly</i>	42,9348	PM2, PP3	0,385	NC	NC
Fc2735	<i>BARD1</i>	c.1603G>C	<i>p. Asp535His</i>	28,8043	PM2	0,321	NC	NC
Fc2958	<i>BARD1</i>	c.2210C>T	<i>p. Ile737Thr</i>	52,94	PM2, PP3	0,468	NC	NC
Fc2142	<i>BRCA1</i>	c.5429T>C	<i>p. Val1810Gly</i>	50,7143	PM2, BS3	0,343	NC	NC
Fc2662	<i>BRCA1</i>	c.5189A>G	<i>p. Asn1730Ser</i>	48,855	PM2, PM5	0,344	NC	NC
Fc3124	<i>BRCA1</i>	c.5006C>T	<i>p. Ala1669Val</i>	46,46	PM2, PP3	0,603	NC	NC
Fc3082	<i>BRIP1</i>	c.2220G>T	<i>p. Gln740His</i>	52,16	PM1, PM2, BS3, BP4, BP6	0,429	0,000524	0,002989
Fc2642	<i>CDH1</i>	c.2471C>A	<i>p. Ala824Asp</i>	51,6304	PM2, PP3	0,703	NC	NC
Fc1733	<i>CDH23</i>	c.3230C>T	<i>p.Pro1077Leu</i>	44,44	PM2	0,188	NC	0,000821
Fc1765	<i>CDH23</i>	c.3482G>A	<i>p.Arg1161Gln</i>	54,14	PM2, PP3	0,377	NC	NC
Fc1810	<i>CDH23</i>	c.3029G>A	<i>p. Arg1010His</i>	55,2885	PM2, BP6	0,334	NC	0,000854
Fc2671	<i>CDH23</i>	c.5113G>A	<i>p.Gly1705Ser</i>	50	PM2, PP3	0,36	NC	NC
Fc2810	<i>CDH23</i>	c.3134T>C	<i>p. Val1045Ala</i>	55,3333	PM2, PP3	0,745	NC	0,001281

Fc3086	<i>CDH23</i>	c.3295C>T	<i>p. Arg1099Trp</i>	42,15	PM2, PP3	0,447	NC	NC
Fc3398	<i>CDH23</i>	c.3295C>T	<i>p.Arg1099Trp</i>	54,78	PM2	0,447	NC	NC
Fc3196	<i>CDH23</i>	c.8407G>A	<i>p. Val2803Ile</i>	44,83	PM1, PM2	0,134	NC	0,001281
Fc3230	<i>CDH23</i>	c.3688G>A	<i>p. Val1230Met</i>	48,84	PM1, PM2, PP3	0,385	NC	0,000854
Fc2520	<i>CHEK1</i>	c.601A>G	<i>p.Met201Val</i>	53,5714	PP3	0,526	0,0000691	0,001708
Fc3041	<i>DDB2</i>	c.1120G>A	<i>p. Val374Met</i>	52,31	PM2,BP4	0,045	0,000103	NC
Fc1987	<i>DICER1</i>	c.3185A>G	<i>p.His1062Arg</i>	44,26	PM2, PP3	0,542	NC	NC
Fc2810	<i>DICER1</i>	c.830C>T	<i>p. Ala277Val</i>	44,4444	PM1, PM2	0,198	0,00000398	0,000427
Fc2528	<i>DIS3L2</i>	c.1970G>A	<i>p. Arg657His</i>	47,2803	PM2, BP4	0,105	0,0000286	NC
Fc1777	<i>EHBP1</i>	c.802A>T	<i>p. Asn268Tyr</i>	55,7	BS1	0,51	0,000138	NC
Fc1965	<i>EHBP1</i>	c.2303A>G	<i>p. Tyr768Cys</i>	43,4783	PM2	0,266	0,0000213	0,001708
Fc1987	<i>EPHB1</i>	c.2995C>T	<i>p.Arg999Cys</i>	53,89	BS1	0,472	NC	0,000427
Fc2562	<i>EPCAM</i>	c.809C>T	<i>p. Ala270Val</i>	48,5106	PM2, PP3	0,665	NC	NC
Fc2163	<i>EPHB2</i>	c.835G>T	<i>p.Ala279Ser</i>	49,4186	PM2, BP4, BP6	0,029	0,00136	0,001281
Fc2563	<i>ERCC2</i>	c.47A>G	<i>p.Tyr16Cys</i>	52,54989	PM2, PP3, BP6	0,766	0,000499	NC

Fc2941	<i>ERCC3</i>	c.847C>T	<i>p. Arg283Cys</i>	48,06	PM2, PP3,	0,525	0,000905	NC
Fc2739	<i>ERCC4</i>	c.1031A>T	<i>p. Tyr344Phe</i>	54,9645	PM2	0,181	0,000117	0,001281
Fc2135	<i>ERCC4</i>	c.1852C>T	<i>p.Arg618His</i>	45,6	PM2, PP3	0,389	0,0000141	NC
Fc2727	<i>ERCC5</i>	c.56C>T	<i>p. Pro19Leu</i>	52,5114	BP4, PM2	0,312	0,000573	0,001708
Fc2141	<i>ERCC6</i>	c.2819C>T	<i>p. Thr940Met</i>	58,4507	PM1, PM2, PP3	0,761	0,0000319	NC
Fc2727	<i>ERCC6</i>	c.143G>A	<i>p. Arg48His</i>	52,795	PM1, PM2, BP4	0,062	0,0000199	NC
Fc3196	<i>EXT1</i>	c.2072G>A	<i>p. Arg691His</i>	46,28	PM1, PM2, PP3	0,482	0,0000160	0,002135
Fc3090	<i>EXT2</i>	c.608C>T	<i>p. Thr203Ile</i>	50	PM2, PP3, BS2	0,753	0,0000924	0,000427
Fc3066	<i>FANCA</i>	c.1868A>G	<i>p. Gln623Arg</i>	52,63	PM2, BP4	0,169	NC	NC
Fc1777	<i>FANCC</i>	c.668T>C	<i>p. Val223Ala</i>	50	PM2,BP1	0,457	0,0000873	NC
Fc1787	<i>FANCD2</i>	c.1436C>T	<i>p. Thr479Ile</i>	33,3333	PM2	0,293	NC	NC
Fc1827	<i>FANCD2</i>	c.3493C>T	<i>p. Arg1165Trp</i>	54,79	PM2	0,336	0,0000199	NC
Fc1827	<i>FANCI</i>	c.3309G>T	<i>p. Ile1103Met</i>	49,74	PM2, PP3	0,624	NC	0,000427
Fc2543	<i>FANCI</i>	c.3812C>T	<i>p. Ser1271Phe</i>	41,4966	PM2, PP3	0,628	0,0000716	0,000854
Fc3320	<i>FANCI</i>	c.2543A>G	<i>p. Gln848Arg</i>	48,79	PM1, PM2, BP1	0,191	0,0000578	0,000427

Fc2877	<i>FANCI</i>	c.1573A>G	<i>p. Met525Val</i>	57,7465	PM2, BP6	0,487	0,000229	0,002135
Fc2121	<i>FANCL</i>	c.1112_1115del	<i>p. Thr372fs</i>	44,02985	PM2, BP6	NC	NC	0,005124
Fc2958	<i>FANCM</i>	c.1742G>A	<i>p. Arg581His</i>	47,47	PM2, PP3	0,495	0,0000248	0,000821
Fc2662	<i>FLCN</i>	c.1029A>C	<i>p. X343Cys</i>	50	PM4, BP4	NC	NC	0,000854
Fc2656	<i>GLMN</i>	c.1646T>C	<i>p. Met549Thr</i>	50	PM2, BP1	0,42	NC	NC
Fc2573	<i>GPC3</i>	c.1019A>G	<i>p. Lys340Arg</i>	51,0638	PM2, BP1	0,061	NC	NC
Fc2739	<i>KDR</i>	c.1990C>T	<i>p. Arg664Cys</i>	45,9184	PM2	0,485	0,0000239	NC
Fc1777	<i>KDR</i>	c.2359C>T	<i>p. Arg787Trp</i>	48,25	PP3	0,779	0,0000566	0,000427
Fc2571	<i>KDR</i>	c.52C>T	<i>p. Arg18Trp</i>	50,8696	BP1, BP4, PM2	0,226	0,0000408	NC
Fc2731	<i>KIF1B</i>	c.3211G>A	<i>p. Glu1071Lys</i>	49,0272	BP1, PM2, PP3	0,274	NC	0,015371
Fc3232	<i>LIG4</i>	c.1739G>A	<i>p. Arg580Gln</i>	48,99	PM1, PM2, PP3	0,82	0,0000849	0,002562
Fc3124	<i>MC1R</i>	c.569T>C	<i>p. Leu190Pro</i>	50,15	PM1, PM2, PP3, BP1	0,381	0,0000638	0,000854
Fc1926	<i>MET</i>	c.3272C>T	<i>p. Pro1091Leu</i>	55,0898	PM1, PM2, BP4	0,28	0,000121	0,002135
Fc3398	<i>MLH3</i>	c.3676G>A	<i>p. Ala1226Thr</i>	57,73	PM2, PP3	0,739	0,00000796	NC

Fc2735	<i>MRE11</i>	c.476T>C	<i>p. Val159Ala</i>	49,359	PM2	0,532	0,0000212	NC
Fc1765	<i>MRE11</i>	c.1124C>A	<i>p.Pro375His</i>	51,8	PM2, BP1	0,375	0,0000319	NC
Fc3301	<i>MSH2</i>	c.2785C>T	<i>p. Arg929Ter</i>	44,96	PM2, PP3, BP6	NC	0,0000893	0,000854
Fc2783	<i>MSH6</i>	c.2107A>G	<i>p. Met703Val</i>	48,3871	PM1, PM2, PP3	0,66	0,000012	0,000427
Fc1939	<i>MSR1</i>	c.1228G>T	<i>p. Gly410Cys</i>	56,0976	PM2, PP3	0,528	NC	0,002562
Fc2141	<i>MSR1</i>	c.103+1G>T		55,0725	PP3, BP6	NC	NC	NC
Fc2621	<i>MTAP</i>	c. 830C>T	<i>p. Ser277Phe</i>	51,5982	PM2, PP3	0,764	NC	NC
Fc3296	<i>NBN</i>	c.1405G>T	<i>p. Asp469Tyr</i>	45,45	PM2	0,149	0,0000616	NC
Fc1874	<i>NF1</i>	c.4963G>A	<i>p. Ala1655Thr</i>	52,7559	PM1, PM2, PP2, BP4	0,311	NC	NC
Fc1731	<i>NF1</i>	c.2374C>T	<i>p. Leu792Phe</i>	27,98	PM2, PM5, PP2	0,177	NC	NC
Fc1946	<i>NF1</i>	c.2374C>T	<i>p. Leu792Phe</i>	24,5161	PM2, PM5, PP2	0,177	NC	NC
Fc2552	<i>NF1</i>	c.2374C>T	<i>p. Leu792Phe</i>	25,8152	PM2, PM5, PP3	0,177	NC	NC
Fc2573	<i>NF1</i>	c.2374C>T	<i>p. Leu792Phe</i>	26,4368	PM2, PM5, PP2	0,177	NC	NC
Fc2111	<i>NF1</i>	c.2896G>A	<i>p. Ala966Thr</i>	46,84	PM2, PP2	0,137	NC	NC
Fc2917	<i>NF1</i>	c.5843A>T	<i>p. Gln1969Leu</i>	54,17	PP2, PM2, BS2	0,287	0,0000778	NC

Fc3040	<i>NF1</i>	c.2032C>A	<i>p. Pro678Thr</i>	44,92	PM2, PP2, BS2	0,134	0,0000279	NC
Fc1827	<i>PDGFRA</i>	c.3179T>A	<i>p. Ile1060Asn</i>	48,74	BS1	0,28	0,0000495	0,000427
Fc2671	<i>POLD1</i>	c.934G>T	<i>p. Val312Leu</i>	45,2555	PM2	0,238	NC	NC
Fc2121	<i>POLE</i>	c.6493C>T	<i>p. Arg2165Cys</i>	50,3448	PM2, PP3	0,329	0,0000287	NC
Fc2656	<i>POLE</i>	c.1591G>A	<i>p. Gly531Arg</i>	52,1505	PM2, PP3	0,603	NC	NC
Fc2959	<i>POLE</i>	c.2039G>A	<i>p. Arg680His</i>	44,85	PM1, PM2, PP3, BP1	0,382	0,0000112	NC
Fc2941	<i>PTCH1</i>	c.4235C>T	<i>p. Pro1412Leu</i>	45,92	PM2, PP3, BP1	0,77	0,0000141	NC
Fc2958	<i>P3H1</i>	c.1072C>A	<i>p. Pro358Thr</i>	45,38	PM2, BP1	0,182	0,0000358	NC
Fc2989	<i>P3H1</i>	c.1208T>C	<i>p. Leu403Ser</i>	50,75	PM2, BP1	0,337	0,0000636	NC
Fc2663	<i>RAD51B</i>	c.1037-1G>A	-	62,71	PP3, BP4	NC	NC	0,050942
Fc2877	<i>RAD51B</i>	c.1037-1G>A		62,71	BP4, PP3	NC	NC	0,050942
Fc3066	<i>RAD51B</i>	c.1037-1G>A		62,71	BP4, PP3	NC	NC	0,050942
Fc2791	<i>RAD51D</i>	c.715C>T	<i>p. Arg239Trp</i>	45,6897	PM2, PP3	0,287	NC	0,001281
Fc2810	<i>RAD51D</i>	c.26G>C	<i>p. Cys9Ser</i>	47,5248	PM1, PM2, PP3	0,218	0,000405	0,000427
Fc2074	<i>RECQL4</i>	c.1684C>T	<i>p. Arg562Trp</i>	53,4653	BP1, PM2	NC	0,000266	NC

Fc2074	<i>RET</i>	c.1423C>T	<i>p. Arg475Trp</i>	45,815	PM2, PP2, PP3	0,615	0,0000212	NC
Fc2618	<i>RET</i>	c.2371T>A	<i>p. Tyr791Asn</i>	50,1961	PM2, PM5, PP3	0,745	0,000046	NC
Fc2618	<i>RET</i>	c.3314C>T	<i>p. Ala1105Val</i>	48,4536	PM2	0,397	0,0000239	NC
Fc3077	<i>RET</i>	c.1462A>T	<i>p. Thr488Ser</i>	54,93	PM2, PP2, BP4	0,156	0,0000212	NC
Fc3091	<i>RET</i>	c.785T>C	<i>p. Val262Ala</i>	47,1	PM2, PP2, PP3, BP6	0,748	0,000248	NC
Fc2573	<i>RNASEL</i>	c.793G>T	<i>p. Glu265X</i>	47,2222	PVS1, BP6	NC	0,00356	0,002135
Fc3041	<i>RECQL4</i>	c.2425G>A	<i>p. Gly809Arg</i>	41,33	PM2, PP3, BP1	NC	0,000125	NC
Fc3301	<i>RECQL4</i>	c.2351G>A	<i>p. Arg784Gln</i>	45,1	PM1, PM2, PP3, BP1	NC	0,000140	0,000427
Fc1776	<i>RTEL1</i>	c.3629G>A	<i>p. Arg1210Lys</i>	57,971	BP4, PM2	0,137	NC	NC
Fc2199	<i>RTEL1</i>	c.781G>A	<i>p. Ala261Thr</i>	51,4286	PM2	0,318	0,0000295	NC
Fc2727	<i>RTEL1</i>	c.3676G>A	<i>p. Ala1226Thr</i>	46,7391	BP4, PM2	0,072	0,0000217	0,000427
Fc2642	<i>SBDS</i>	c.428C>T	<i>p. Ser143Leu</i>	52,1429	PM2, PP2, PP3	0,948	0,00000795	NC
Fc3138	<i>SDHD</i>	c.331G>A	<i>p. Val111Ile</i>	52,16	PM1, PM2, PP3	0,572	NC	0,000427
Fc2074	<i>SLX4</i>	c.3448G>A	<i>p. Glu1150Lys</i>	44,6328	PM2, BP1	0,062	0,00000398	0,002135

Fc2520	<i>SLX4</i>	c.2273C>T	<i>p. Ala758Val</i>	51,5789	PM2, PP3, BP1	0,351	0,0000165	
Fc2654	<i>SLX4</i>	c.4766G>A	<i>p. Arg1589His</i>	54,1176	PM2, BP1	0,169	0,0000278	0,000427
Fc2663	<i>SLX4</i>	c.1584C>G	<i>p. Ser528Arg</i>	53,2258	PM2, BP4	0,035	0,000167	0,000854
Fc2000	<i>SMARCA4</i>	c.3976G>A	<i>p. Glu1326Lys</i>	52,1008	PM2, PP3	0,608	NC	NC
Fc3286	<i>TERT</i>	c.3169G>A	<i>p. Gly1057Arg</i>	56,32	PM2	0,333	NC	NC
Fc3077	<i>TERT</i>	c.3268G>A	<i>p. Val1090Met</i>	52,85	PM2, PP5, BP4	0,539	0,0000499	0,000427
Fc1897	<i>TP53</i>	c.1120G>C	<i>p. Gly374Arg</i>	51,2881	BP6, PM2, PP2	0,368	0,00000707	NC
Fc2121	<i>TSC1</i>	c.1139C>T	<i>p.</i> <i>Thr380Ile</i>	50,7246	PM2, PP3	0,446	NC	NC
Fc3077	<i>TSC1</i>	c.503A>C	<i>p. Lys168Thr</i>	46,94	PM1, PM2, PP3, BP1, BP6	0,509	NC	0,000854
Fc1903	<i>TSC2</i>	c.1096G>A	<i>p. Glu366Lys</i>	54,0426	PM2, PP3	0,391	0,0000177	NC
Fc2642	<i>TSC2</i>	c.2986A>G	<i>p. Thr996Ala</i>	44,8718	BS2	0,541	0,0000355	NC
Fc1733	<i>WRN</i>	c.587G>A	<i>p. Arg196His</i>	48,87	PM2, PP3	0,483	0,0000248	NC
Fc1946	<i>WT1</i>	c.361T>G	<i>p. Tyr116Asp</i>	47,561	PM2, PP2, PP3	0,554	NC	0,000427

Fc1856	<i>XPC</i>	c.437A>T	<i>p. Asp146Val</i>	54,878	BP4, PM2	0,119	NC	NC
Fc1903	<i>XPC</i>	c.2438T>C	<i>p. Val813Ala</i>	55,2727	PM2, PP3, BP1	0,421	NC	NC
Fc2563	<i>XPC</i>	c.506C>T	<i>p. Thr169Met</i>	55,4896	PM2	0,272	0,00005	0,000427
Fc3384	<i>XPA</i>	c.820T>G	<i>p. X274Gly</i>	50,45	PM2, PM4	NC	NC	NC
Fc2529	<i>XPA</i>	c.680G>A	<i>p. Arg227Gln</i>	44,91	PM2, PP3	0,637	0,0000159	0,000427
Fc1827	<i>XRCC3</i>	c.382C>T	<i>p. Arg128Trp</i>	46,51	BS1	0,058	0,0000746	NC

NC = Não consta

ANEXO 5: HISTÓRIA FAMILIAR DAS PACIENTES INCLUÍDAS NO PROJETO DE MESTRADO

ID	Idade ao diagnóstico (anos)	História Familiar
Fc1856	36	Câncer de fígado (M, 60), Câncer Cerebral (M, 50), Câncer ósseo (M, 50)
Fc1946	68	Câncer de pele (M, SI)
Fc1965	35	Câncer de Mama (F, 65)
Fc2099	47	Câncer de Próstata (M, 74)
Fc2111	32	Sem história familiar de câncer
Fc2141	48	Câncer de Garganta (M, 60)
Fc2142	45	Câncer de ovário (F,54), Câncer de Pele (M, 50), Câncer de Bexiga (M, 81)
Fc2147	35	Câncer de Pele e câncer de próstata (M,65), Câncer de mama (F, 44)
Fc2155	44	Câncer de Pele (F, 60), Câncer de Pele (F, SI), Câncer de Pele (M, 28)
Fc1700	36	Câncer de Fígado (M, 56), Câncer de Mama (F, SI)
Fc1731	49	Sem história familiar de câncer
Fc1733	51	Câncer de Pulmão (M, 65), Câncer de Mama (F, +/- 55 anos), Câncer de abdômen (M, >70), Câncer colorretal (F, 65)
Fc1763	37	Câncer de Próstata (M, 61) e câncer de testículos (M, 32)
Fc1765	57	Câncer de Próstata (M, SI)
Fc1776	45	Câncer de Útero (F, 50), Câncer de Útero (F, 50)
Fc1777	57	Sem história familiar de câncer

Fc1787	48	Sem história familiar de câncer
Fc1805	32	Câncer de Próstata (M, 74)
Fc1810	54	Câncer de Pele (F, 59)
Fc1826	45	Câncer de mama (F, 50)
Fc1827	34	Câncer de Próstata (M, SI)
Fc1845	62	Câncer de Próstata (M, 62), Câncer de Pele (M, SI), Câncer de Fígado (M, SI), Câncer de Fígado (F, 50)
Fc1851	41	Câncer de Próstata (M, 61), Câncer de Útero (F, 60), Câncer de Fígado (F, 86)
Fc1897	46	Câncer de Mama (F, SI), Câncer de Próstata (M, SI)
Fc1926	47	Câncer de Pulmão (M, SI), Câncer de Cólon (F, SI), Câncer de Fígado (M, SI)
Fc1939	46	Sem história familiar de câncer
Fc1987	44	Câncer de Esôfago (M, 75)
Fc2074	55	Sem história familiar de câncer
Fc2086	46	Câncer de Ovário (F, 50), Câncer de mama (F, 50; F, SI; F,38)
Fc2135	28	Câncer de rim (M, 70), Câncer de Cólon (M, SI), Câncer de Mama (F, 48)
Fc2176	62	Câncer de Mama (F, 60)
Fc2177	33	Câncer de Pele (F, 67), Câncer de Pele (M, 84)
Fc2182	30	Câncer de Mama (F, 58), Câncer de Pâncreas (M, 46)
Fc2199	35	Sem história familiar de câncer
Fc2520	34	Lipossarcoma (M, 32), Câncer de Orofaringe (M, 70), Câncer de Próstata (M, 84), Câncer de Intestino (F, 44)
Fc2529	56	Câncer de Ovário (F, 39), Câncer de boca (M, SI), Câncer de Mama (F, SI)

Fc2543	48	Sem história familiar de câncer
Fc2552	49	Câncer de Cólon (M, SI)
Fc2553	52	Câncer ósseo (F, SI), Câncer de cabeça e pescoço (F, SI)
Fc2560	38	Câncer de Ovário (F, 40), Câncer de Garganta (M, SI)
Fc2563	57	Câncer de Mama (F, SI)
Fc2571	64	Sem história familiar de câncer
Fc2572	40	Câncer de Boca (F, SI)
Fc2573	39	Câncer de Próstata (M, 60), Câncer de Garganta (M, 78), Câncer de Esôfago (F, 82)
Fc2617	36	Câncer de Mama (F, SI; F, SI; F, SI; F, SI)
Fc2618	43	Sem história familiar de câncer
Fc2621	33	Câncer de mama (F, 51) Câncer de Mama (F, 39 e 54), Câncer de Pulmão (F, SI)
Fc2642	43	Câncer de Próstata (M, SI)
Fc2646	53	Câncer de Próstata (M, SI), Câncer de Pele (F, SI), Câncer Ósseo (F, SI) Leucemia (F, SI), Câncer de Mama (F, 64)
Fc2654	67	Câncer de Mama e Tireoide (F, 54 e 56), Câncer de Garganta (M, 57), Câncer de Útero (F, 49)
Fc2655	46	Câncer de Garganta (M, SI; M, SI), Câncer de Mama (F, 54)
Fc2656	62	Câncer de Mama (F, 55), Câncer Gastrointestinal (F, SI), Câncer de Pulmão (M, SI)
Fc2662	34	Câncer de Mama (F, SI; F, SI)
Fc2663	61	Sem história familiar de câncer
Fc2671	38	Câncer de Pâncreas (F, 89)

Fc2679	46	Câncer de Pulmão (M, SI), Câncer de Esôfago (M, SI), Câncer de Estômago (M, SI)
Fc2684	54	Leucemia (F, SI), Câncer de Tireoide (F, SI)
Fc2695	50	Sem história familiar de câncer
Fc2731	77	Câncer de Cólon (F, SI)
Fc2735	51	Câncer de Mama (F, 48), Câncer de Cólon (M, 33), Câncer de Útero (F, 35)
Fc2739	41	Câncer de Mama (F, 50), Câncer de Garganta (M, 60), Câncer de Próstata (M, 60)
Fc2783	36	Sem história familiar de câncer
Fc2810	60	Câncer de Pele (F, SI)
Fc2877	37	Câncer de Rim (M, 56), Câncer Gastrointestinal (F, 36)
Fc2917	56	Câncer de Útero (F, 71), Câncer de Pele (M, SI)
Fc2927	34	Sem história familiar de câncer
Fc2936	39	Câncer de estômago (M, 60), Câncer de Pele (M, SI)
Fc2941	48	Sem história familiar de câncer
Fc2958	34	Sem história familiar de câncer
Fc2989	56	Sem história familiar de câncer
Fc3021	60	Câncer de cabeça e pescoço (M, SI)
Fc3040	38	Câncer de Fígado (M, 47), Câncer Colorretal (M, 56)
Fc3041	27	Câncer Ósseo (F, >50)
Fc3066	49	Câncer de Mama (F, SI)

Fc3077	31	Câncer de Tireoide (F, 55), Câncer de Mama (F, 49),
Fc3078	60	Sem história familiar de câncer
Fc3079	70	Sem história familiar de câncer
Fc3082	39	Sarcoma e retinoblastoma (M, 30 e SI), Câncer de Pulmão (F, SI)
Fc3086	37	Câncer no Sistema Nervoso Central (F, 49), Câncer de Próstata (M, 70), Câncer de Intestino (M, SI) e câncer de Útero (F, SI)
Fc3090	74	Sem história familiar de câncer
Fc3091	67	Sem história familiar de câncer
Fc3097	29	Sem história familiar de câncer
Fc3099	33	Sem história familiar de câncer
Fc3114	57	Câncer de Próstata (M, SI), Câncer de Estômago (M, 70), Câncer de Mama (F, 40), Câncer de Esôfago (M, 70)
Fc3117	26	Câncer de Pele (Melanoma) (F, 85)
Fc3120	48	Câncer de Intestino (F, SI)
Fc3121	34	Sem história familiar de câncer
Fc3124	59	Sem história familiar de câncer
Fc3130	61	Leucemia (F, 8), Câncer de Mama (F, 45), Câncer de Garganta (M, SI)
Fc3134	43	Câncer de Mama (F, 68), Câncer de Fígado (M, SI), Câncer de Mama (F, 64), Câncer de Pulmão (M, SI), Câncer de Intestino (F, SI)
Fc3135	46	Câncer de Intestino (F, SI; F, SI), Câncer de Colo de Útero (F, 70), Câncer nas cordas vocais (F, 60)
Fc3139	43	Sem história familiar de câncer

Fc3148	23	Câncer de Mama (F, 70)
Fc3164	48	Câncer de Próstata e rim (M, 74), Câncer de Útero (F, 68)
Fc3196	63	Retinoblastoma (M, 3), Câncer de Pulmão (F, 63)
Fc3230	56	Câncer de Fígado (F, 67), Câncer de Útero (F, 65)
Fc3286	52	Câncer de Reto (F, SI)
Fc3302	75	Câncer de Útero (F, 51), Linfoma (F, 40), Câncer de Cólon e Pulmão (M, 52 e 53)
Fc3320	42	Câncer de Cólon (F, SI)
Fc3340	79	Câncer de Garganta (M, 75)
Fc3382	72	Sem história familiar de câncer
Fc3383	51	Câncer de Cólon (F, 75), Câncer de Pulmão (M, SI), Câncer de Mama e Útero (F, SI), Câncer de mama (F, 70)
Fc3384	53	Câncer de esôfago (M, 60), Câncer de Cólon e Cabeça e pescoço (M, 60 e 62), Câncer de Mama (F, 47)
Fc3398	62	Sem história familiar de câncer

M = Masculino, F = Feminino, SI = Sem Idade

ANEXO 6: LISTA DE PRIMERS SINTETIZADOS PARA A CONFIRMAÇÃO DAS VARIANTES, PROTOCOLO E CLICAGENS PARA O SEQUENCIAMENTO

Gene	Éxon	Foward	Reverse
<i>CYLD</i>	17	CTGCGATCATGAGCCACTTG	TTGCCTTGGGAAATACTGTGTC
<i>NTRK1</i>	2	CTAAGATACAGGGTGGGGGT	CCAGTTCTGGACAGGAGACC
<i>FANCA</i>	34	GCCAAGCCTTAGCGAGTGTT	GTCAGCGGTTTGTGAGGACC
<i>WRN</i>	10	CATTAGGGAAGAGGAAGTTGTC	GCAATTCATTGTGGTAGAACC
<i>RAD51D</i>	8	TGGTTGTGGACTCGGTCACT	TGGGGTTCAGAAGCTGACATTT
<i>G6PC</i>	2	CTTGAAGGTGTAGGCTTTGG	GTCCCCTCAAGGTCAGTTT
<i>FANCD2</i>	9	GTCTGCCAGCTCTGTTCAA	ACACTTGTTCTGGGAGGTTG
<i>FANCE</i>	5	AGTTGCTTGAGACAGCCTAG	CAGTTGCTCTTCCCCATTGT
<i>FANCE</i>	6	TGATAAATGCTGTTGAAATGAAG	TGAAGGATGCTGAGAACACTG
<i>FANCD2</i>	15	AGCTGCTGTTTCATTGTAGCA	TGGGTTTGAACAATGGACTGA

Os primers para a confirmação das variantes presentes nos genes não listados, foram gentilmente cedidos pela equipe da Oncogenética do Centro de diagnóstico do Hospital de amor de Barretos.

Protocolo de PCR

Reagentes	Volumes
Multiplex Master Mix	7,2 µl
MgCl₂ (5mM)	0,6 µl
H₂O Ultra Pura	5,6 µl
Primer Foward (10 pM)	0,3 µl
Primer Reverse (10 pM)	0,3 µl
DNA	1 µl
Total	15 µl

Condição de Ciclagem para todos os genes exceto *EPHB2* e *CDKN2A*:

Etapa	Temperatura	Tempo	Repetições
Desnaturação	95 °C	15 minutos	1 X
Desnaturação	95 °C	45 segundos	
Anelamento	62 °C	45 segundos	3 X
Extensão	72 °C	45 segundos	
Desnaturação	95 °C	45 segundos	
Anelamento	60 °C	45 segundos	5 X
Extensão	72 °C	45 segundos	
Desnaturação	95 °C	45 segundos	
Anelamento	58 °C	45 segundos	27 X
Extensão	72 °C	45 segundos	
Extensão Final	72 °C	10 minutos	1 X
Temperatura Final	4 °C	“Infinito”	

Condição de Ciclagem do gene *EPHB2*:

Etapa	Temperatura	Tempo	Repetições
Desnaturação	95 ° C	15 minutos	1 X
Desnaturação	95 ° C	45 segundos	
Anelamento	66 ° C	45 segundos	3 X
Extensão	72 ° C	45 segundos	
Desnaturação	95 ° C	45 segundos	
Anelamento	64 ° C	45 segundos	5 X
Extensão	72 ° C	45 segundos	
Desnaturação	95 ° C	45 segundos	
Anelamento	62 ° C	45 segundos	27 X
Extensão	72 ° C	45 segundos	
Extensão Final	72 ° C	10 minutos	1 X
Temperatura Final	4 ° C	"Infinito"	

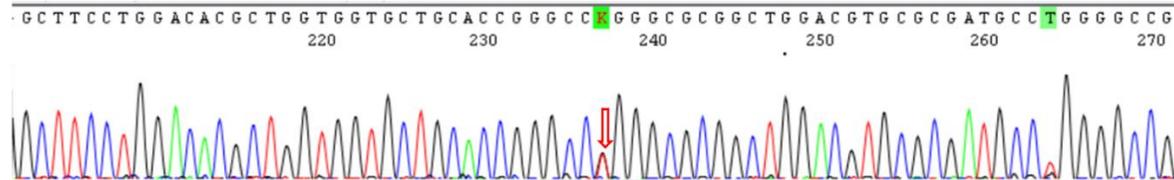
Condição de ciclagem do gene *CDKN2A*:

Etapa	Temperatura	Tempo	Repetições
Desnaturação	95 ° C	15 minutos	1 X
Desnaturação	95 ° C	45 segundos	3 X
Anelamento	60 ° C	45 segundos	
Extensão	72 ° C	45 segundos	
Desnaturação	95 ° C	45 segundos	5 X
Anelamento	58 ° C	45 segundos	
Extensão	72 ° C	45 segundos	
Desnaturação	95 ° C	45 segundos	
Anelamento	56 ° C	45 segundos	27 X
Extensão	72 ° C	45 segundos	
Extensão Final	72 ° C	10 minutos	1 X
Temperatura Final	4 ° C	"Infinito"	

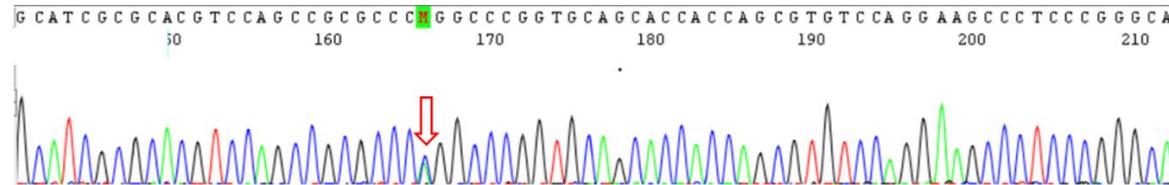
ANEXO 7: ELETROFEROGRAMAS DO SEQUENCIAMENTO DE SANGER.

Fc2121: *CDKN2A* – c.301G>T

Forward:

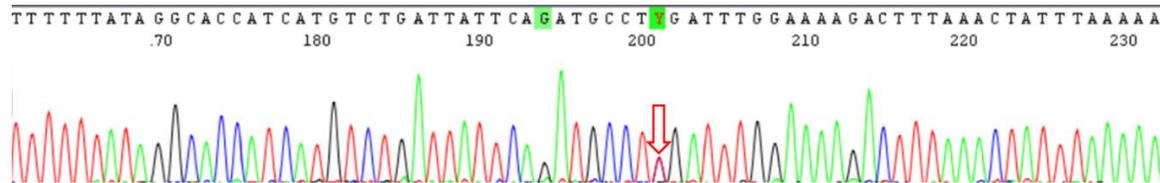


Reverse:

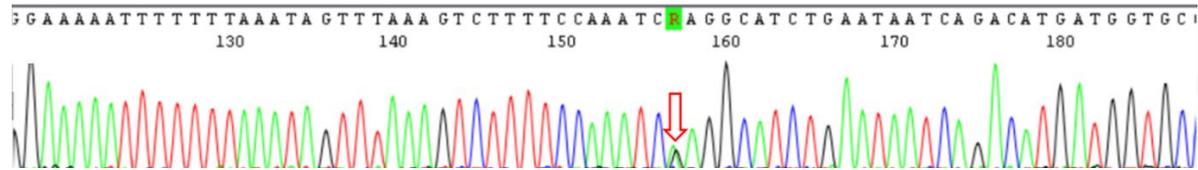


Fc2562: *CYLD* – c. 2272C>T

Foward:

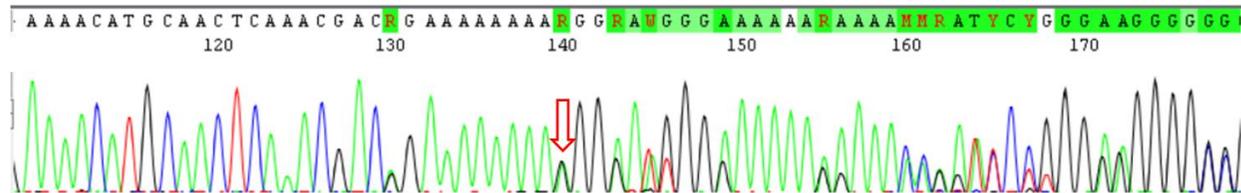


Reverse:

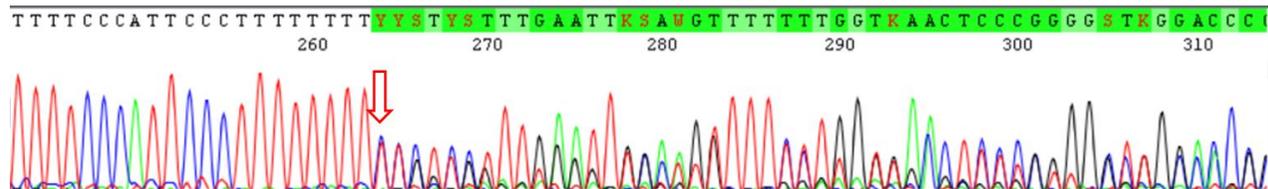


Fc3256: *EPHB2* – c.3059del

Foward:

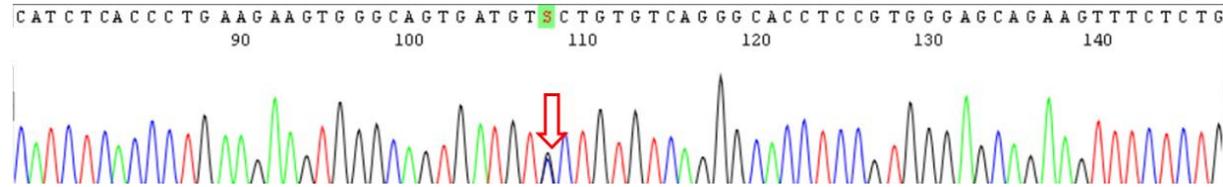


Reverse:



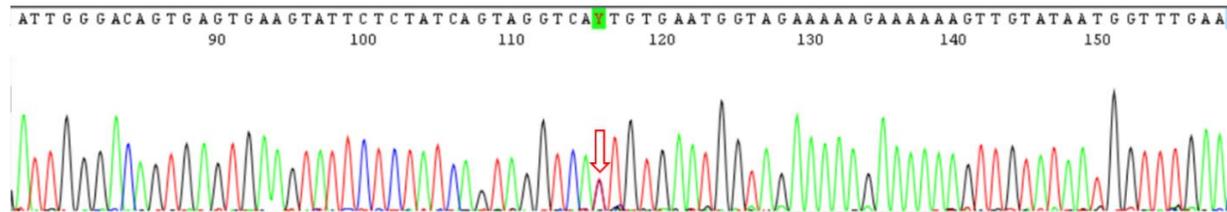
Fc2727: *FANCA* – c.3358G>C

Reverse:



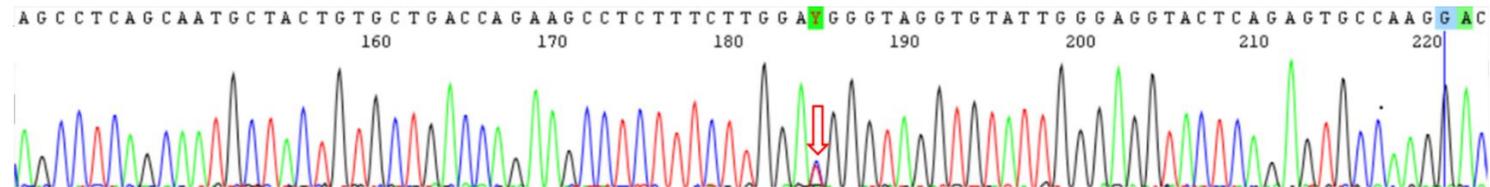
Fc2163: *FANCD2* – c.696-1G>A

Reverse:



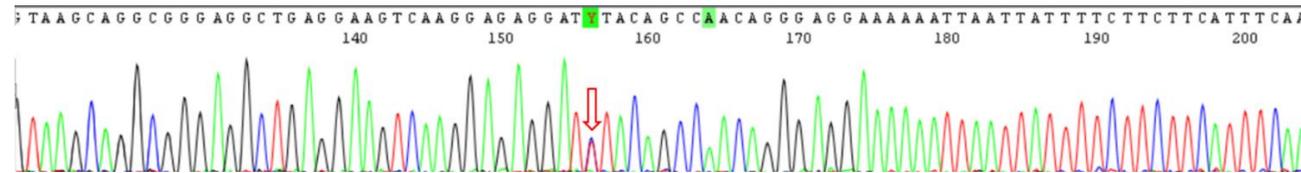
Fc3074: *FANCE* – c.1111C>T

Forward:



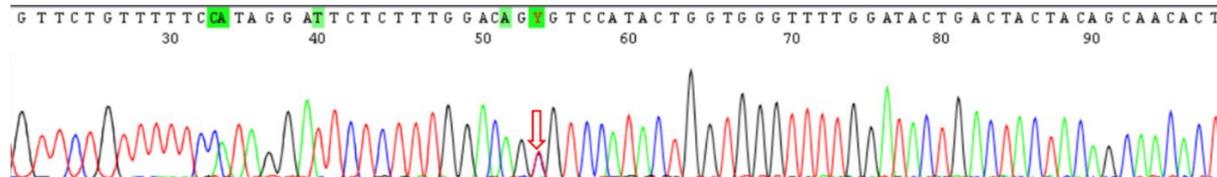
Fc2959: *FANCE* – c.1114-1G>A

Reverse:

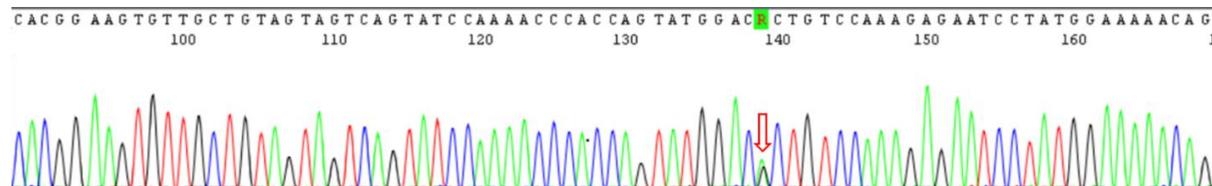


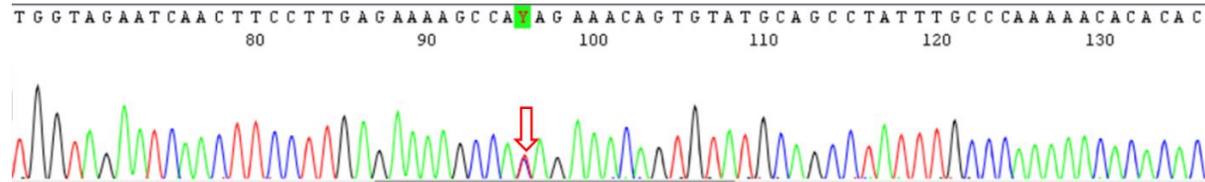
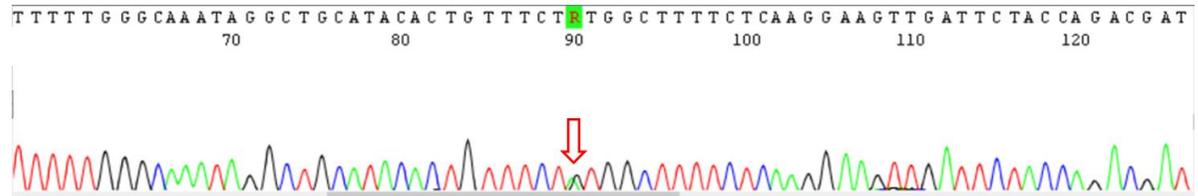
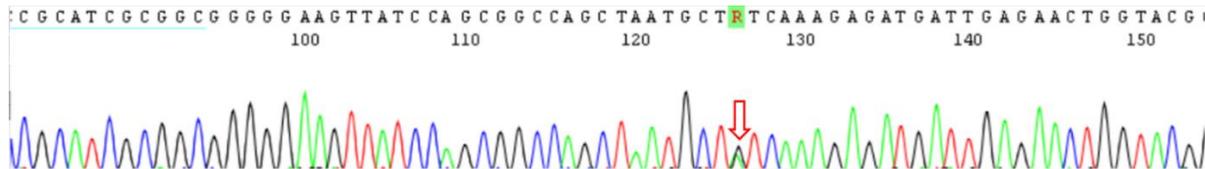
Fc3232: *G6PC* – c.247C>T

Foward:

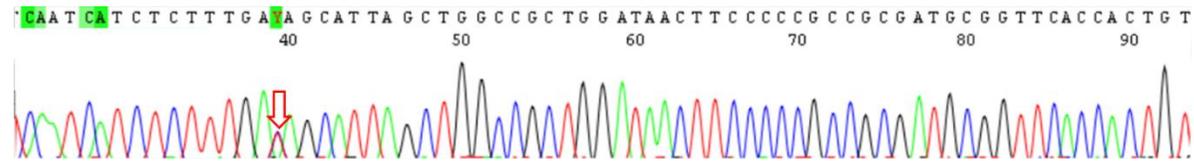


Reverse:



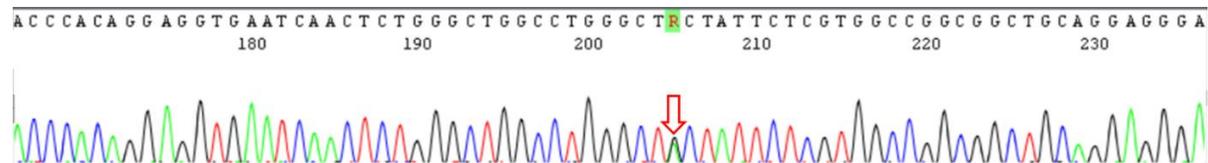
Fc1874: *MLH1* – c.827T>C**Foward:****Reverse:****Fc3386: *MLH1* – c.94A>G****Foward:**

Reverse:

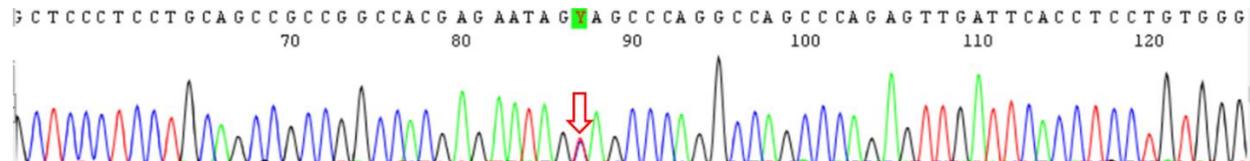


Fc2000: *MUTYH* – c.536A>G

Forward:

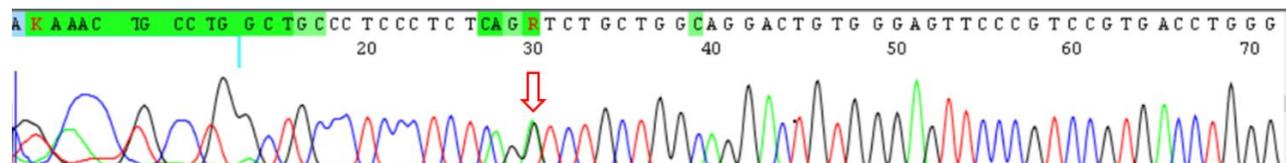


Reverse:

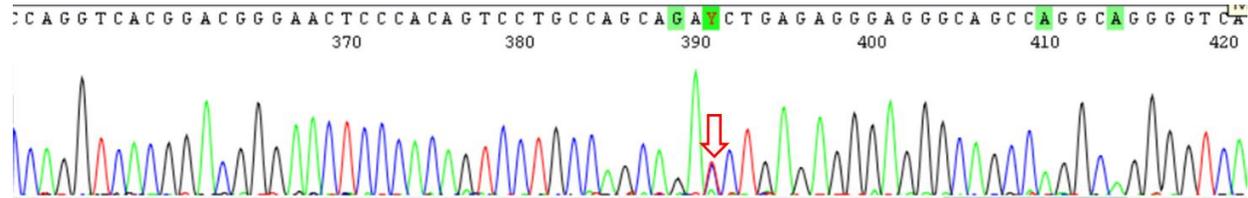


Fc2650: *MUTYH* - c.1187G>A

Forward:

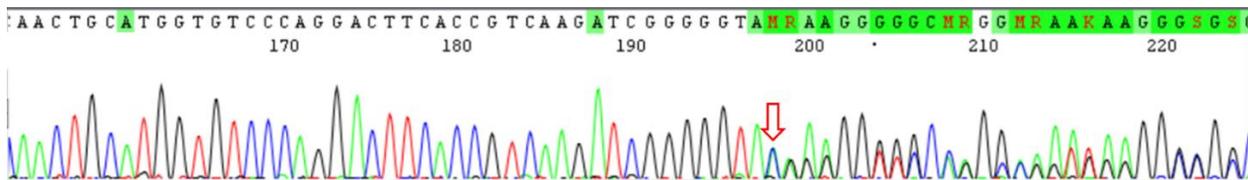


Reverse:



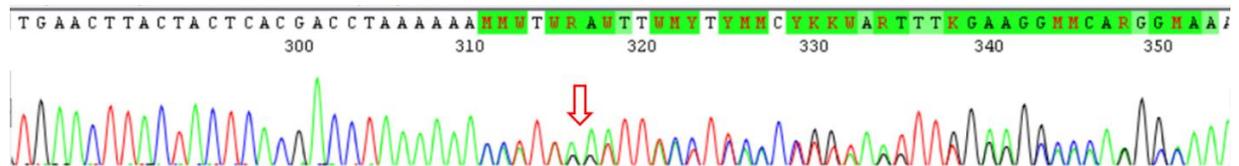
Fc2000: *NTRK1*: c.37delG

Reverse:

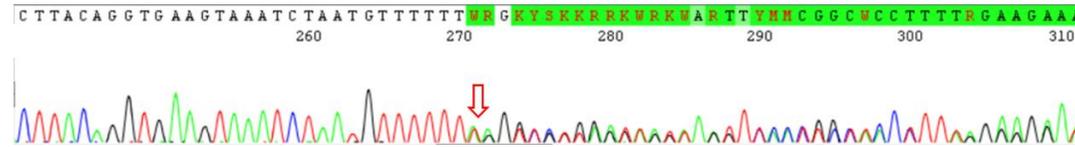


Fc2878: *PALB2* – c. 840del

Foward:

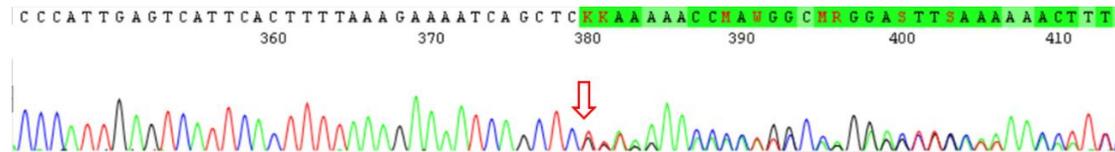


Reverse:

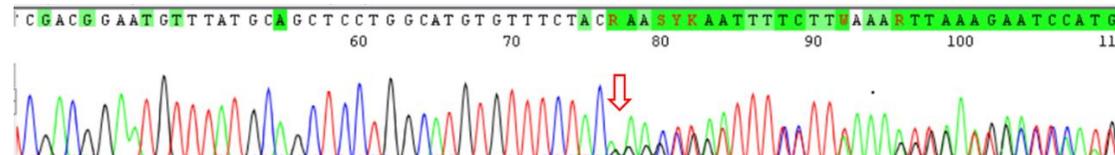


Fc3138: *PALB2* -c.2470del

Forward:

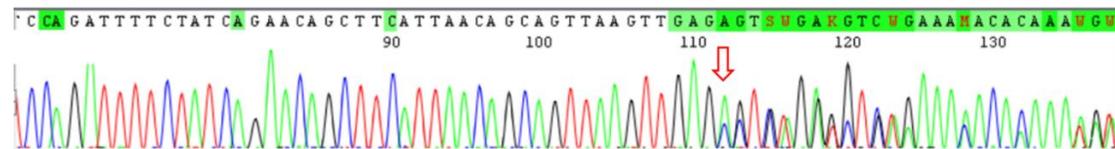


Reverse:



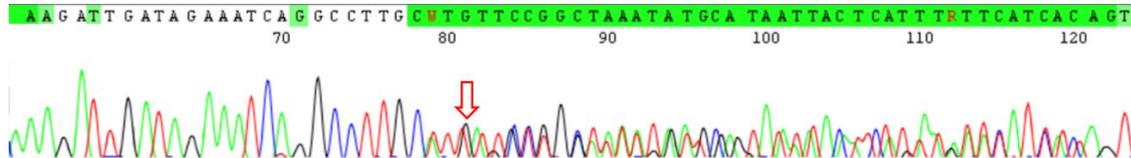
Fc2792: *PMS2* – c.2186_2187del

Reverse:



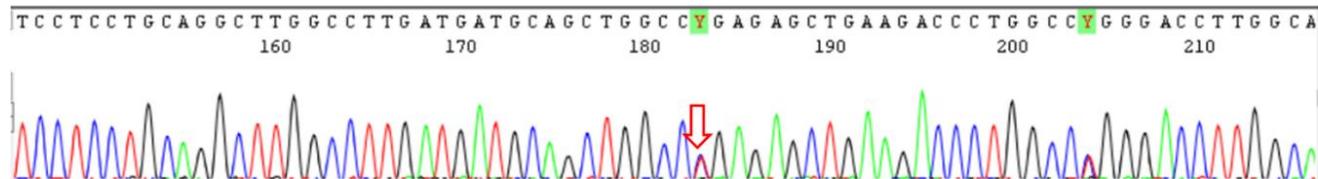
Fc2528: *RAD51C* – c.890_899del

Foward:

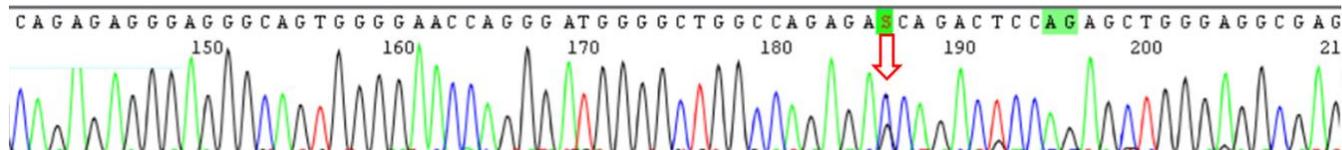


Fc2791: *RAD51D* – c.694C>T

Foward:

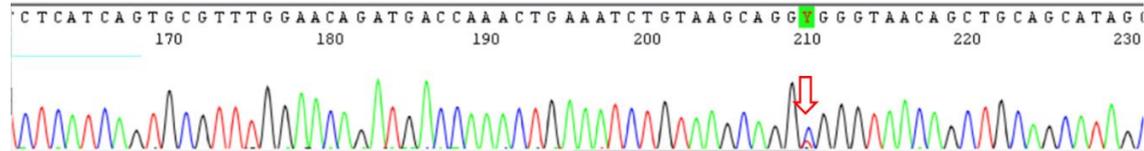


Reverse:

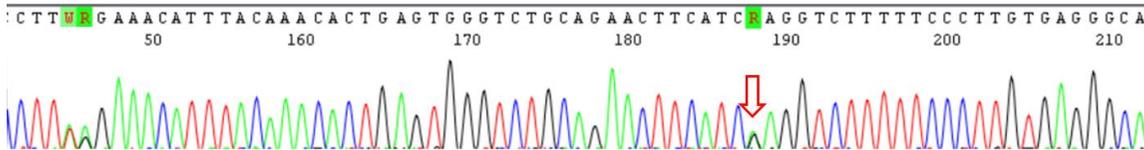


Fc1958: *SBDS* – c.258+2C>T

Foward:

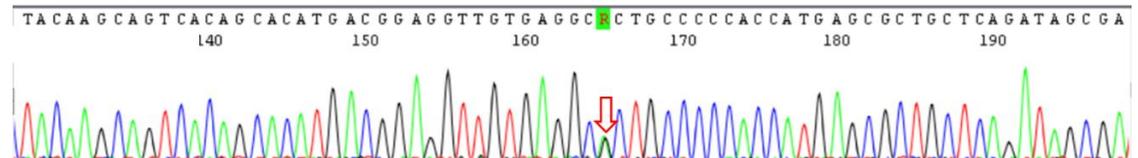


Reverse:

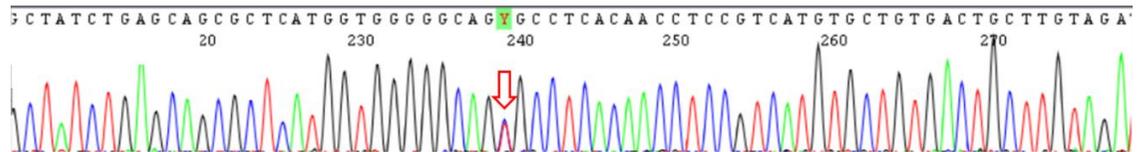


Fc2186: *TP53* – c. 524G>A

Foward:

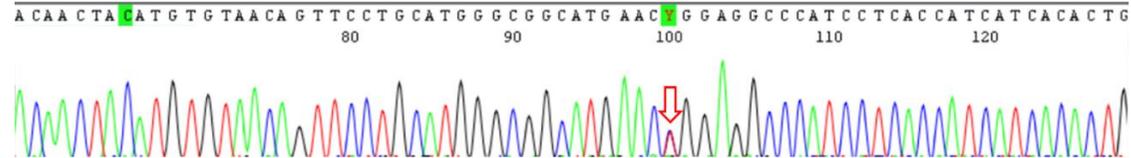


Reverse:

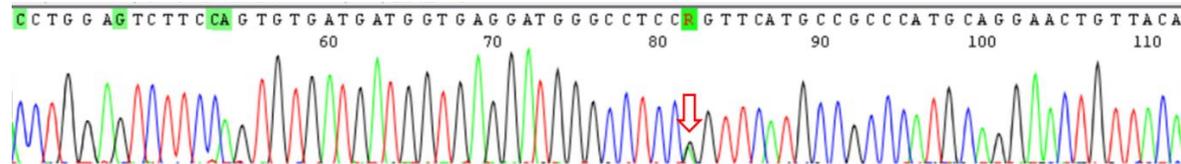


Fc3296: *TP53* – c.742C>T

Foward:

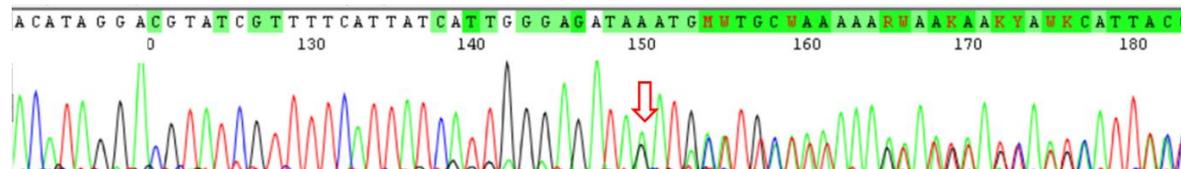


Reverse:



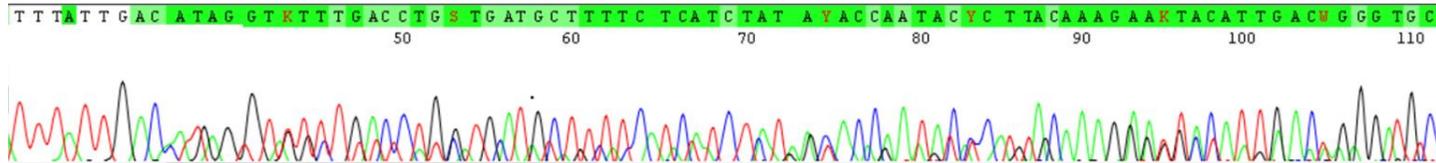
Fc1903: *WRN* – c.1273_1276del

Reverse:



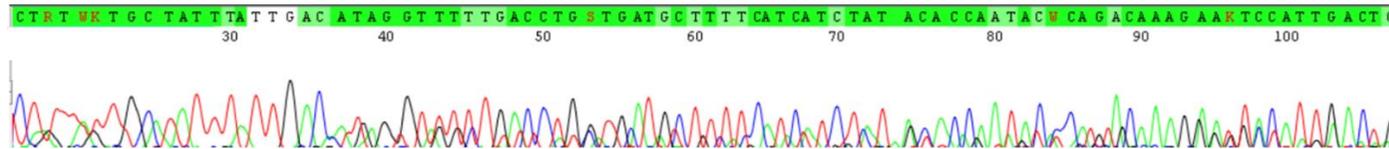
Fc2936: *FANCD2* – c.1278+3_1278+6del

Foward:



Fc3286: *FANCD2*: c.1278+3_1278+6del

Foward:



Fc3320: *FANCD2*: c.1278+3_1278+6del

Foward:

