

**Ariane Stéfani Pereira**

**IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES GERMINATIVAS EM HOMENS DIAGNOSTICADOS COM  
CÂNCER DE MAMA E AVALIAÇÃO DO SEU IMPACTO BIOLÓGICO *IN VITRO***

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Edenir Inêz Palmero

Co-orientadores: Dr. Matias Eliseo Melendez,  
Dra. Viviane Aline Oliveira Silva, Dr. Renato José da Silva Oliveira e Dra. Lídia Maria Rebolho Arantes

Barretos, SP  
2024

Ariane Stéfani Pereira

IDENTIFICAÇÃO DE VARIANTES GERMINATIVAS EM HOMENS DIAGNOSTICADOS COM  
CÂNCER DE MAMA E AVALIAÇÃO DO SEU IMPACTO BIOLÓGICO *IN VITRO*

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Edenir Inêz Palmero  
Co-orientadores: Dr. Matias Eliseo Melendez,  
Dra. Viviane Aline Oliveira Silva, Dr. Renato José da Silva Oliveira e Dra. Lídia Maria Rebolho Arantes

Barretos, SP  
2024

P436i Pereira, Ariane Stéfani.

Identificação de variantes germinativas em homens diagnosticados com câncer de mama e avaliação do seu impacto biológico in vitro. / Ariane Stéfani Pereira. - Barretos, SP - 2024.

202 f. : il.

Orientador(a): Edenir Inêz Palmero.

Coorientador(a): Matias Eliseo Melendez.

Viviane Aline Oliveira Silva.

Renato José da Silva Oliveira / Lídia Maria Rebolho

Arantes.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos - 2024.

1. câncer de mama em homens. 2. câncer de mama hereditário. 3. síndromes de predisposição ao câncer hereditário. 4. sequenciamento completo do exoma. 5. classificação de variantes. 6. análises funcionais. I. Autor(a). II. Título.

CDD 616.994 49

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada por Nayara Bernardo de Mattos CRB 8/10172  
Biblioteca da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos

## **FOLHA DE APROVAÇÃO**

**Ariane Stéfani Pereira**

**Identificação de variantes germinativas em homens diagnosticados com câncer de mama e avaliação do seu impacto biológico in vitro**

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

Data da aprovação: 20/06/2024

### **Banca Examinadora:**

Dra. Ana Paula Carneiro Brandalize

Instituição: Universidade Federal do Paraná

Dr. Tomás Reinert

Instituição: Centro de Pesquisa da Serra Gaúcha

Dr. Fernando Regla Vargas

Instituição: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Edenir Inêz Palmero

Orientadora

Dr. Cristiano de Pádua Souza

Presidente da Banca

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – processo número 200476/2022-0.

O trabalho também recebeu apoio do Ministério da Saúde, através do Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON – processo número 25000.056766/2015-64), e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Auxílio à Pesquisa – Regular (processo número 18/25118-8).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão do Ministério da Saúde, através do PRONON, CNPq, CAPES ou FAPESP.

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

Dedico este trabalho ao meu tio Jorge, que nos deixou lutando contra o câncer, e a tantas pessoas que não tiveram a oportunidade de um diagnóstico precoce e/ou um tratamento eficaz.

## AGRADECIMENTOS

Quando desenvolvemos um estudo, não é possível fazermos nada sozinhos, são muitas mãos e mentes envolvidas para que possamos entregar resultados de qualidade e que possam, futuramente, impactar vidas. Ao longo desses mais de quatro anos, muitas pessoas passaram pela minha vida, me ajudando, tanto no âmbito profissional, quando pessoal, para que eu pudesse desenvolver este trabalho pelo qual tenho imensa gratidão e orgulho. Esse é o momento de reconhecer – e agradecer – todos os esforços aqui empenhados.

Primeiramente, agradeço aos meus pais, Edinéia e Nelson, meu irmão, Rafael, e minha avó, Maria, que são as pessoas mais importantes da minha vida. Aqueles que sempre estão ao meu lado, me apoiando e dando o suporte necessário para que eu possa desempenhar meu trabalho da melhor forma possível. Eles compreenderam todas as ausências – quando necessárias – e as mudanças, seja de estado ou país, em detrimento da minha carreira. Sempre estiveram ao meu lado, ainda que com o coração apertado. Esse agradecimento também se estende (*in memoriam*) aos meus avós Nelson, Luzia e João, e meu tio Silvio, que me protegem de outro plano.

Em seguida, gostaria de agradecer à Dra. Edenir, que não só me orientou durante os períodos de mestrado e doutorado, mas confiou no meu trabalho e na minha capacidade para conduzir um estudo com tamanhas responsabilidades. Acreditou na minha capacidade para encarar todos os desafios que enfrentaríamos e para vencer os obstáculos que surgiriam ao longo do caminho. Ela foi essencial para o meu crescimento profissional, formação científica e técnica, bem como para o desenvolvimento do meu criticismo. Da mesma maneira, agradeço aos meus coorientadores, Dra. Lidia, Dr. Matias, Dr. Renato e, especialmente, Dra. Viviane. Vivi (me permitam a intimidade neste momento), você foi essencial para que o meu sonho de desenvolver uma parte do meu doutorado fora do país se tornasse realidade. Esteve ao meu lado desde a escolha do laboratório/grupo de pesquisa, até a escrita do projeto e confecção do relatório final. Ao meu time de coorientadores: meu muito obrigada por todo apoio técnico, por auxiliar nos momentos burocráticos, e por todas as conversas e discussões sobre o andamento do estudo, cada qual com sua expertise, para que eu pudesse concluí-lo da melhor forma possível.

Como dito anteriormente, ao ingressar no doutorado, existia um sonho: realizar um período fora do país, para que pudesse agregar não só experiência de outro laboratório, e técnicas diferentes, mas a vivência de uma cultura e o desenvolvimento da segunda língua.

Portanto, não poderia deixar de agradecer aos profissionais da *Queen's University of Belfast*, ao *Patrick G Johnston Centre for Cancer Research* e ao grupo de pesquisa conduzido pelo Dr. Nick Orr. Aqui, deixo meus agradecimentos em especial para o Dr. Nick Orr, Dr. Kyle Thompson, e à Dra. Sarah Gallagher, que foram essenciais para que o estudo progredisse e que me ajudaram a contornar todas as dificuldades encontradas. Sarah ainda me proporcionou experiências culturais inesquecíveis, como assistir a um jogo de Rugby, que está para norte-irlandeses como o futebol está para os brasileiros. Eles me receberam de braços abertos e me auxiliaram em todo o processo para a chegada no país e encontro de moradia. Entre as pessoas que foram suporte durante meu período na Irlanda do Norte, não poderia esquecer do James, um dos meus *roommates*, com quem tinha longas conversas sobre a pós-graduação durante os jantares, com quem bebi várias *baby guinness*, e para quem contei várias coisas do Brasil, quando batia a saudade. Também deixo meu carinho para a Izabella e para a Renata, que me apoiaram quando mais precisei, me oferecendo um teto, acolhimento e companhia para as *pints* irlandesas. Elas foram fundamentais para que meu último mês naquele país fosse tão especial, me acompanhando em todas as aventuras, desde *tours* nas filmagens de séries famosas, até a escalada da maior montanha da Irlanda do Norte (Obrigada Bella e Gabriel, *we conquered the Slieve Donard!*). O período no país foi de extrema importância para que eu entendesse o quanto o crescimento profissional está atrelado ao pessoal.

É importante ressaltar que só é possível realizar um estudo com uma rede de apoio, seja ela financeira ou de pessoas. Diante disso, agradeço ao apoio financeiro de todos os órgãos de fomento que viabilizaram a compra de reagentes e a realização de técnicas de alto custo, como a FAPESP, ao Ministério da Saúde (via PRONON), além da CAPES, que financiou minha bolsa de doutorado, e o CNPq, que proporcionou a bolsa do doutorado no exterior. Também agradeço às pessoas e aos setores envolvidos no consentimento e atendimento dos pacientes, além do auxílio às questões burocráticas. Aqui, deixo meu agradecimento especial a todos que trabalham no setor de Oncogenética, sejam médicos, enfermeiros ou auxiliares administrativos. Agradeço ao Instituto de Ensino e Pesquisa e à secretaria da Pós-Graduação por todo suporte durante a realização do estudo. Meu agradecimento se estende ao EPIT, em especial à Maria Alice e ao Dorion, que facilitaram a aquisição de reagentes, as participações em congressos e auxiliaram na submissão de projetos e relatórios.

Agradeço a um setor de extrema importância para que meu estudo fosse realizado, seja pela utilização de equipamentos, apoio científico, discussões ricas sobre diversos projetos ou pelas amizades ali criadas e cultivadas, sempre regadas a cafés na copa: o Centro de Pesquisa em Oncologia molecular, meu querido CPOM. Me permitam gastar mais espaço nos agradecimentos, já que foi o local onde passei a maior parte do meu tempo nos últimos anos. Sou extremamente grata por encontrar pessoas receptivas e de grande competência ao longo da minha jornada. Com eles aprendi muito sobre ciência, mas também aprendi sobre amizade. Muito obrigada aos biólogos, sempre dispostos a ajudar, principalmente à Izabela e à Marcela, que me socorreram sempre que necessário, que me ofereceram uma palavra amiga nos momentos em que o desânimo era maior do que a motivação: vocês foram essenciais no meu desenvolvimento profissional. Também agradeço àqueles que passaram pelo setor, mas que já tomaram caminhos diferentes, como a Renata e a Natália, que participaram da idealização e do desenvolvimento no início do projeto. Pessoas que levo pra vida, que mantenho contato e que sempre que preciso de um conselho científico (ou um ombro amigo) sei que posso contar. Também agradeço à Edilene, que conduziu as análises de bioinformática iniciais, tornando possível a realização do projeto. E por falar em bioinformática, agradeço ao Felipe, que, mais do que um colega de grupo, se tornou um grande amigo, com quem sei que sempre posso contar (mesmo quando estava a 9 mil km de distância). É para ele que eu envio mensagens todas as vezes em que acontece algo de errado com meu computador, ou que tenho dúvidas sobre *pipelines* e ferramentas de bioinformática (e continuarei enviando dúvidas e memes, de onde quer que eu esteja).

Ainda falando sobre pessoas que dividiram seus dias comigo durante todo esse período no CPOM, mas com quem também cultivei grandes amizades, deixo meu muito obrigada às minhas amigas Ana Laura, Ana Julia e Cíntia. Elas formam minha família, foram quem enxugaram minhas lágrimas, quem comemoraram minhas vitórias e para quem eu dava as notícias em primeira mão. Ana Laura, obrigada por partilhar sua vida e sua família comigo, assim como partilhei minha família com você, por fazer meus dias mais leves. Ana Julia, obrigada pela parceria nos congressos, pelos desabafos, pelos abraços e pelos choros, sejam eles de tristeza ou felicidade. Cíntia, obrigada por dividir o fardo da pós-graduação e pelas inúmeras tentativas de me fazer uma surpresa de aniversário. Vocês são muitos especiais e quero levá-las sempre comigo. Também agradeço à Rhafaela, Paula Rohr, Luiza, Stepanhie e Patrick, que compartilharam diversos momentos, cafés e almoços, regados a risadas e, às

vezes, um pouco de mau humor. Minha gratidão aos diversos amigos que cultivei desde o início da minha jornada no Hospital de Câncer de Barretos: Weder, Paula Aguiar, Fernanda, Aline, Murilo, Karina e tantas outras pessoas, que formaram minha família barretense.

Certa vez, na série *"This is us"*, o personagem Randall Pearson disse que "escolher nossas pessoas é o mais perto que chegamos de controlar nosso destino" (tradução). Essa frase me marcou de tal maneira, que sempre me pego pensativa sobre as pessoas que escolhi e que me escolheram durante a minha caminhada profissional, e por todos os lugares por onde passei. Portanto, gostaria de finalizar meus agradecimentos dizendo que escolhi as melhores pessoas que poderiam existir para compartilhar essa jornada. Tenho muita gratidão e orgulho do que consegui(mos) construir durante todo esse tempo.

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1. Câncer de mama em homens .....	1
1.2. Genes de predisposição ao câncer de mama em homens.....	2
1.3. Identificação e classificação de variantes .....	4
1.4. Variantes patogênicas presentes em genes envolvidos em vias de reparo de danos ao DNA e seu potencial como alvo terapêutico .....	6
1.5. Tratamento para o câncer de mama em homens.....	8
<b>2. Justificativa</b> .....	<b>10</b>
<b>3. Objetivo geral</b> .....	<b>11</b>
3.1. Objetivos específicos .....	11
<b>4. Material e Métodos</b> .....	<b>12</b>
4.1. Delineamento do estudo.....	12
4.2. Seleção de pacientes e aspectos éticos .....	13
4.3. Sequenciamento completo do exoma (WES) germinativo .....	14
4.4. Chamada de variantes.....	14
4.5. Genes analisados.....	14
4.6. Anotação de variantes.....	15
4.7. Priorização manual.....	15
4.8. Confirmação da presença das variantes germinativas por Sequenciamento de Sanger..	18
4.9. Sequenciamento completo do exoma (WES) somático.....	19
4.10. Análise de variantes somáticas .....	19
4.11. Análise de perda de heterozigose para a variante c.1516G>T, presente em <i>MRE11</i> ...	19
4.12. Seleção de variantes para ensaios funcionais.....	20
4.13. Linhagens celulares estabelecidas .....	23
4.14. Edição gênica e ensaios funcionais para variantes identificadas em homens diagnosticados com câncer de mama e consideradas patogênicas/provavelmente patogênicas por predições <i>in silico</i> .....	25
4.14.1. Edição Gênica: silenciamento dos genes <i>MRE11</i> e <i>MSH6</i> através do sistema CRISPR/Cas9.....	26
4.14.1.1. Confirmação de edição de linhagens por <i>Western Blot</i> (WB).....	27

4.14.1.2. Confirmação de edição dos genes <i>MRE11</i> e <i>MSH6</i> , nas linhagens MCF10ANeoT e KTMBE, por sequenciamento de Sanger .....	28
4.14.2. Edição gênica: Construção de vetores e inserção das variantes através de mutagênese sítio-dirigida em <i>BRIP1</i> , <i>MRE11</i> e <i>MSH6</i> .....	29
14.14.2.1. Subclonagem das sequências gênicas de <i>MRE11</i> e <i>MSH6</i> em pcDNA™3.1 ....	29
4.14.2.1.1. Obtenção da sequência de <i>MRE11</i> e linearização de pcDNA™3.1.....	29
4.14.2.1.2. Obtenção da sequência de <i>MSH6</i> e linearização de pcDNA™3.1 .....	30
4.14.2.1.3. Ligação de <i>MRE11</i> ou <i>MSH6</i> com pcDNA™3.1 .....	31
4.14.2.1.4. Transformação das ligações de pcDNA3-MSH6/pcDNA3-MRE11 em bactérias .....	31
4.14.2.2. Inserção das variantes nas sequências de <i>BRIP1</i> , <i>MRE11</i> e <i>MSH6</i> , por mutagênese sítio-dirigida.....	32
4.14.3. Ensaio Funcionais.....	33
4.14.3.1. Ensaio clonogênico .....	34
4.14.3.2. Análise de capacidade de reparo de danos (fosfo-histona H2A.X) e expressão de RAD51, BRIP1 e BRCA1 na presença de variantes em <i>BRIP1</i> por <i>Western Blot</i> (WB).....	35
4.14.3.3. Análise de capacidade de reparo de danos (fosfo-Histona H2A.X) e número de <i>foci</i> (RAD51) na presença de variantes em <i>MRE11</i> por imunofluorescência.....	37
4.14.3.4. Análise de capacidade de reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga (RH) através de restauração de fluorescência.....	38
4.14.3.5. Análise da capacidade de formação do heterodímero MSH2-MSH6 por imunoprecipitação.....	39
4.14.3.6. Análise de co-localização de MSH2-MSH6 .....	40
4.14.3.7. Análise de ciclo celular para <i>MSH6</i> WT ou na presença de variantes.....	41
4.15. Edição gênicas e ensaios funcionais para variantes identificadas em homens diagnosticados com câncer de mama e consideradas de significado incerto (VUS) por predições <i>in silico</i> .....	41
4.15.1. Estabelecimento de linhagens celulares <i>knockout</i> para <i>FAN1</i> .....	41
4.15.2. Confirmação do silenciamento gênico de <i>FAN1</i> por <i>Western Blot</i> .....	42
4.15.3. Edição gênica: Construção de vetores e inserção das variantes em <i>FAN1</i> , através de mutagênese sítio-dirigida .....	42

4.15.4. Avaliação da permanência de danos e morte celular na presença de variantes em <i>FAN1</i> .....	43
4.15.5. Ensaio de recuperação de radiosensibilidade (RRS) nas linhagens modificadas pela técnica de <i>short hairpin</i> RNA .....	43
4.15.6. Ensaio de proliferação celular para a linhagem OVCAR-3 na presença de variantes em <i>FAN1</i> .....	43
4.15.7. Análise de reparo de danos ao DNA por Recombinação Homóloga (RH) por <i>Western Blot</i> (WB) na presença de variantes em <i>FAN1</i> .....	44
4.16. Análises estatísticas.....	45
<b>5. Resultados .....</b>	<b>46</b>
5.1. Etapa I – Caracterização da população de estudo, sequenciamento do exoma, análises de variantes.....	46
5.1.1. Dados sociodemográficos e clínico-patológicos.....	46
5.1.2. História familiar .....	48
5.1.3. Identificação de variantes germinativas.....	50
5.1.3.1. Variantes provavelmente patogênicas ou patogênicas germinativas .....	50
5.1.3.2. Variantes de significado clínico incerto (VUS) germinativas .....	53
5.1.4. Identificação de variantes provavelmente patogênicas ou patogênicas somáticas. 55	
5.1.5. Análise de perda de heterozigose para a variante c.1516G>T, presente em MRE11 .....	56
5.2. Etapa II – Edição gênica e ensaios funcionais para as variantes consideradas P/PP pelas predições <i>in silico</i> .....	56
5.2.1. Edição Gênica: silenciamento dos genes <i>MRE11</i> e <i>MSH6</i> através do sistema <i>CRISPR/Cas9</i> .....	56
5.2.2.1. Análise do <i>knockout</i> de <i>MRE11</i> e <i>MSH6</i> por <i>Western Blot</i> (WB) .....	57
5.2.2.2. Análise do <i>knockout</i> de <i>MRE11</i> e <i>MSH6</i> por Sequenciamento de Sanger .....	58
5.2.2. Edição gênica: construção de vetores através da subclonagem da sequência gênica de <i>MRE11</i> ou <i>MSH6</i> interesse em pcDNA™3.1 .....	59
5.2.3. Edição gênica: inserção de variantes nas sequências dos genes <i>BRIP1</i> , <i>MRE11</i> e <i>MSH6</i> .....	60
5.2.4. Ensaio funcionais .....	66

5.2.4.1. Avaliação da capacidade clonogênica na presença de variantes em <i>BRIP1</i> .....	66
5.2.4.2. Avaliação de reparo de danos do DNA por <i>Western Blot</i> : expressão de proteínas presentes na via de reparo de danos ao DNA por RH na presença de variantes em <i>BRIP1</i> .....	66
5.2.4.3. Avaliação da capacidade clonogênica na presença de variantes em <i>MRE11</i> .....	68
5.2.4.4. Avaliação de reparo de danos do DNA por imunofluorescência: formação de <i>foci</i> (RAD51) e permanência de dano (p-H.2AX) na presença de variantes em <i>MRE11</i> .....	70
5.2.4.5. Avaliação de reparo de danos do DNA por restauração de fluorescência: taxa de reparo por RH na presença de variantes em <i>BRIP1</i> e <i>MRE11</i> .....	73
5.2.4.6. Avaliação da capacidade clonogênica na presença de variantes em <i>MSH6</i> .....	74
5.2.4.7. Avaliação da capacidade de formação do heterodímero MSH2-MSH6 na presença de variantes em <i>MSH6</i> .....	75
5.2.4.8. Avaliação da capacidade de co-localização de MSH2-MSH6 na presença de variantes em <i>MSH6</i> .....	77
5.2.4.9. Análise de ciclo celular na presença de variantes em <i>MSH6</i> .....	79
5.3. Etapa II – Edição gênica e ensaios funcionais para as variantes consideradas VUS pelas predições <i>in silico</i> .....	80
5.3.1. Edição Gênica: silenciamento do gene <i>FAN1</i> através do sistema <i>short hairpin</i> RNA ( <i>shRNA</i> ) .....	80
5.3.2. Análise de permanência de danos ao DNA (p-H2A.X) em diferentes tempos após a irradiação .....	80
5.3.3. Ensaio recuperação de radiosensibilidade (RRS) para linhagens editadas com <i>shRNA</i> .....	81
5.3.4. Proliferação celular na linhagem OVCAR-3 na presença de variantes em <i>FAN1</i> .....	82
5.3.5. Análise de reparo de danos ao DNA por Recombinação Homóloga (RH) na presença de variantes em <i>FAN1</i> .....	83
<b>6. Discussão .....</b>	<b>91</b>
<b>7. Conclusões.....</b>	<b>110</b>
<b>Referências.....</b>	<b>111</b>
<b>Anexo 1 .....</b>	<b>126</b>
<b>Anexo 2 .....</b>	<b>135</b>

Anexo 2A .....	135
Anexo 2B.....	137
Anexo 2C.....	140
Anexo 2D .....	142
Anexo 2E.....	144
Anexo 2F.....	146
Anexo 2G .....	149
Anexo 2H .....	151
Anexo 2I.....	153
<b>Anexo 3 .....</b>	<b>156</b>
<b>Anexo 4 .....</b>	<b>165</b>
Anexo 4A .....	165
Anexo 4B.....	166
Anexo 4C.....	167
Anexo 4D .....	168
Anexo 4E.....	169
Anexo 4F.....	170
Anexo 4G .....	171
Anexo 4H .....	172
Anexo 4I.....	173
Anexo 4J .....	174

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Delineamento do estudo.....	13
<b>Figura 2</b> – Fluxograma de análise in silico para a seleção de variantes germinativa .....	17
<b>Figura 3</b> – Via de reparo de danos de quebra de dupla fita do DNA (DSBs) por recombinação homóloga e representação de moléculas-chave (complexo MRN, ATM, CHEK2, BRCA1, PALB2, BARD1, BRIP1, BRCA2, RAD51, RAD51C e RAD51D) .....	21
<b>Figura 4</b> – hMutS $\alpha$ (complexo formado pelo heterodímero MSH6-MSH2) na configuração de ligação ao DNA .....	22
<b>Figura 5</b> – Papel de FAN1 em vias de reparo .....	23
<b>Figura 6</b> – Fluxograma de trabalho no exterior após o replanejamento do projeto para adequação ao tempo de bolsa concedido .....	26
<b>Figura 7</b> – Redes de interações proteicas, relacionando as proteínas resultantes dos genes nos quais foram identificadas variantes classificadas como P/PP.....	53
<b>Figura 8</b> – Análise de perda de heterozigose para a variante c.1516G>T, presente em <i>MRE11</i> .....	56
<b>Figura 9</b> – Análise de expressão da proteína MRE11 após o silenciamento com o sistema CRIPR/Cas9 nas linhagens MCF10AneoT e KTMBE .....	57
<b>Figura 10</b> – Análise de expressão da proteína MSH6 após o silenciamento com o sistema CRIPR/Cas9 nas linhagens MCF10AneoT e KTMBE .....	58
<b>Figura 11</b> – Screening para confirmação da inserção da sequência de MRE11 na posição correta de leitura em pcDNA <sup>TM</sup> 3.1.....	59
<b>Figura 12</b> – Screening para confirmação da inserção da sequência de MSH6 na posição correta de leitura em pcDNA <sup>TM</sup> 3.1 .....	60
<b>Figura 13</b> – Eletroferogramas dos fragmentos dos plasmídeos pcDNA3-myc-his-BACH1-WT e pcDNA3-myc-his-BACH1-R707C .....	61
<b>Figura 14</b> – Eletroferogramas dos fragmentos dos plasmídeos pcDNA3-MRE11-WT e pcDNA3-MRE11-E506* .....	62
<b>Figura 15</b> – Eletroferogramas dos fragmentos dos plasmídeos pcDNA3-MRE11-WT e pcDNA3-MRE11-R576* .....	63
<b>Figura 16</b> – Eletroferogramas dos fragmentos dos plasmídeos pcDNA3-MSH6-WT e pcDNA3-MSH6-L370S .....	64

<b>Figura 17</b> – Eletroferogramas dos fragmentos dos plasmídeos pcDNA3-MSH6-WT e pcDNA3-MSH6-R482* .....	65
<b>Figura 18</b> – Avaliação da capacidade clonogênica da linhagem T-47D na presença de variantes em BRIP1 .....	66
<b>Figura 19</b> – Avaliação da expressão proteica de BRCA1 e BRIP1 diante do dano na linhagem T-47D .....	67
<b>Figura 20</b> – Avaliação da expressão proteica de RAD51 e p-H2A.X diante do dano na linhagem T-47D .....	68
<b>Figura 21</b> – Avaliação da capacidade clonogênica nas linhagens MCF10ANeoT e KTMBE na presença de variantes em MRE11.....	69
<b>Figura 22</b> – Avaliação da capacidade de reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga com MRE11 WT ou na presença das variantes E506* e R576* na linhagem MCF10AneoT (barra de escala = 300 pixels).....	71
<b>Figura 23</b> – Avaliação da capacidade de reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga com MRE11 WT ou na presença das variantes E506* e R576* na linhagem KTMBE (barra de escala = 300 pixels).....	72
<b>Figura 24</b> – Taxa relativa de reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga na presença de variantes em BRIP1 .....	73
<b>Figura 25</b> – Taxa relativa de reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga na presença de variantes em MRE11 .....	74
<b>Figura 26</b> – Avaliação da capacidade clonogênica nas linhagens MCF10ANeoT e KTMBE na presença de variantes em MSH6.....	75
<b>Figura 27</b> – Análise de capacidade de formação do heterodímero MSH2-MSH6 por imunoprecipitação para a linhagem MCF10AneoT.....	76
<b>Figura 28</b> – Análise de capacidade de formação do heterodímero MSH2-MSH6 por imunoprecipitação para a linhagem KTMBE.....	76
<b>Figura 29</b> – Avaliação da co-localização das proteínas MSH6-MSH2 na linhagem celular T-47D superexpressando MSH6 WT ou com as variantes L370S e R482* .....	78
<b>Figura 30</b> – Análise de ciclo celular na linhagem T-47D na presença de variantes em MSH6 .....	79
<b>Figura 31</b> – Avaliação da expressão proteica de FAN1 (114 kDa) nas linhagens T-47D e OVCAR-3 após o silenciamento com shRNA .....	80

<b>Figura 32</b> – Avaliação de permanência de danos (p-H2A.X) ao longo do tempo nas linhagens OVCAR-3 e T-47D.....	81
<b>Figura 33</b> – Análise da capacidade de recuperação à radiosensibilidade (RRS) nas linhagens OVCAR-3 e T-47D.....	82
<b>Figura 34</b> – Taxa relativa de proliferação pelo método de incorporação de BrdU para <i>FAN1</i> na presença de variantes, na linhagem OVCAR-3.....	83
<b>Figura 35</b> – Avaliação da expressão de BRCA1 na linhagem OVCAR-3 na presença de variantes em <i>FAN1</i> .....	84
<b>Figura 36</b> – Avaliação da expressão de BRCA1 na linhagem T-47D na presença de variantes em <i>FAN1</i> .....	85
<b>Figura 37</b> – Avaliação da expressão de <i>FAN1</i> e <i>RAD51</i> na linhagem OVCAR-3 na presença de variantes em <i>FAN1</i> .....	86
<b>Figura 38</b> – Avaliação da expressão de <i>FAN1</i> e <i>RAD51</i> na linhagem T-47D na presença de variantes em <i>FAN1</i> .....	87
<b>Figura 39</b> – Avaliação da expressão de p-H2A.X e $\beta$ -Actina na linhagem OVCAR-3 na presença de variantes em <i>FAN1</i> .....	89
<b>Figura 40</b> – Avaliação da expressão de p-H2A.X e $\beta$ -Actina na linhagem OVCAR-3 na presença de variantes em <i>FAN1</i> .....	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Sequências de primers utilizados para a amplificação e o sequenciamento das regiões para a confirmação da presença de variantes consideradas patogênicas.....	18
<b>Tabela 2</b> – Sequência de primers utilizados para avaliação da perda de heterozigose da variante c.1516G>T (E506*) em MRE11 .....	20
<b>Tabela 3</b> – Principais características das linhagens celulares selecionadas para os ensaios funcionais de variantes .....	24
<b>Tabela 4</b> – RNA-guias (gRNA) para o sistema <i>CRISPR/Cas9</i> utilizados para os genes-alvo .....	27
<b>Tabela 5</b> – Sequências de primers utilizados para amplificação e sequenciamento das regiões alvo do RNA-guia presente no sistema <i>CRISPR/Cas9</i> .....	28
<b>Tabela 6</b> – Sequências de <i>primers</i> utilizados na técnica de inserção de variantes por mutagênese sítio-dirigida.....	33
<b>Tabela 7</b> – Tratamento com cisplatina para condições transfectadas com as construções de <i>MSH6</i> no ensaio clonogênico .....	35
<b>Tabela 8</b> – Sequências de <i>primers</i> utilizados na técnica de inserção de variantes por mutagênese sítio-dirigida para as variantes em <i>FAN1</i> .....	42
<b>Tabela 9</b> – Características sociodemográficas e histopatológicas de homens diagnosticados com câncer de mama .....	46
<b>Tabela 10</b> – História pessoal e familiar de homens diagnosticados com câncer de mama ....	49
<b>Tabela 11</b> – Variantes patogênicas/provavelmente patogênicas em homens diagnosticados com câncer de mama .....	52
<b>Tabela 12</b> – Variantes somáticas preditas como <i>drivers</i> em homens diagnosticados com câncer de mama.....	55

## LISTA DE ABREVIATURAS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
µM	Micromolar
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
AF	Anemia de Fanconi
AMP	<i>Association for Molecular Pathology</i>
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
B	Benigna
BER	<i>Base excision repair</i>
CADD	<i>Combined Annotation Dependent Depletion</i>
CanVig	<i>Cancer Variant Interpretation Group</i>
cDNA	DNA complementar
CGI	<i>Cancer Genome Interpreter</i>
ClinGen	<i>Clinical Genome Resource</i>
cm <sup>2</sup>	Centímetros quadrados
cm <sup>3</sup>	Centímetros cúbicos
CM	Câncer de mama
CMF	Câncer de mama em indivíduos do sexo feminino
CMM	Câncer de mama em indivíduos do sexo masculino
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNV	Varição do número de cópias (do inglês, <i>Copy number variation</i> )
COSMIC	<i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
<i>CRISPR/Cas9</i>	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> , associado à proteína <i>Cas9</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRH	Deficiência na recombinação homóloga
DSB	Quebra de dupla fita (do inglês, <i>double-strand break</i> )
EV	Vetor vazio (do inglês, <i>empty vector</i> )
FPG	Familiares de primeiro grau
GATK	<i>Genome Analysis Toolkit</i>

GFP	Proteína verde fluorescente (do inglês, <i>green Fluorescent Protein</i> )
gRNA	RNA-guia
Gy	Grays
H <sub>2</sub> O	Água
HBOC	Síndrome hereditária de câncer de mama e ovário (do inglês, <i>Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome</i> )
HF	História familiar
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>
HR	Razão de risco (do inglês, <i>hazard ratio</i> )
HSF	<i>Human Splicing Finder</i>
ICL	Ligações cruzadas interfilamentares (do inglês, <i>interstrand cross-link</i> )
IGV	<i>Integrative Genomics Viewer</i>
iPARP	Inibidores de poli (ADP-ribose) polimerase
kDa	Kilodaltons
M-CAP	<i>Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity</i>
MAF	Frequência alélica do segundo alelo mais frequente (do inglês, <i>Minor Allele Frequency</i> )
MANE	<i>Matched Annotation from NCBI and EMBL-EBI</i>
MAP	Síndrome de polipose associada ao gene <i>MUTYH</i> (do inglês, <i>MUTYH-associated polyposis</i> )
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MMR	Reparo de pareamento errôneo (do inglês, <i>Mismatch repair</i> )
MSI	Instabilidade de microssatélite (do inglês, <i>Microsatellite instability</i> )
MSS	Estabilidade de microssatélite (do inglês, <i>Microsatellite stability</i> )
N	Novo (do inglês, <i>New</i> )
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NCDB	<i>National Cancer Database</i>
ng	Nanogramas
NIH	<i>National Institutes of Health</i>

nm	Nanômetros
O	Antigo (do inglês, <i>old</i> )
OR	Razão de possibilidades (do inglês, <i>Odds ratio</i> )
P	Patogênica
P/E	Penicilina e Estreptomicina
p-H2A.X	Histona H2A.X fosforilada (do inglês, <i>phospho-Histone 2A.X</i> )
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PB	Provavelmente benigna
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês, <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>polymerase chain reaction</i> )
PFA	Paraformaldeído
PP	Provavelmente patogênica
PRONON	Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica
REVEL	<i>Rare Exome Variant Ensemble Learner</i>
RH	Recombinação homóloga
rpm	Rotação por minuto
RR	Risco relativo
RRS	Recuperação de radiosensibilidade
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
SBF	Soro bovino fetal
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
SH	Síndrome hereditária
sh	<i>Short hairpin</i>
SL	Síndrome de Lynch
STR	<i>Short Tandem Repeat</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNM	Tamanho do tumor, número de linfonodos e presença de metástase
UniProt	<i>Universal Protein Resource</i>
UT	Não tratado (do inglês, <i>untreated</i> )
VP	Variante patogênica

VUS	Variante de significado clínico incerto (do inglês, <i>variant of uncertain significance</i> )
WB	<i>Western Blot</i>
WES	Sequenciamento completo do exoma (do inglês, <i>whole exome sequencing</i> )
WGS	Sequenciamento completo do genoma (do inglês, <i>whole genome sequencing</i> )
WT	Alelo selvagem (do inglês, <i>wild type</i> )

## LISTA DE SÍMBOLOS

>	Maior
%	Porcentagem
=	Igual
#	Cerquilha
™	Marca comercial (do inglês: <i>Trade mark</i> )
<	Menor
≥	Maior ou igual
μ	Mi
®	Registrado
&	“E” comercial ( <i>Ampersand</i> )
α	Alfa
β	Beta

## RESUMO

PEREIRA AS. Identificação de variantes germinativas em homens diagnosticados com câncer de mama e avaliação do seu impacto biológico *in vitro*. **Tese (Doutorado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2024.

**Justificativa:** O câncer de mama em indivíduos do sexo masculino (CMM) é um tipo tumoral raro e a presença de variantes patogênicas (VPs) germinativas em *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *CHEK2* e *ATM* é considerada um fator de risco para seu desenvolvimento. No entanto, ainda há uma parcela de casos de CMM com fator genético desconhecido e, portanto, seu conhecimento é limitado. **Objetivos:** Identificar novos genes de predisposição ao CMM por meio do sequenciamento do exoma (WES) e determinar o impacto biológico, *in vitro*, de variantes selecionadas. **Metodologia:** O estudo foi dividido em duas etapas principais. Na Etapa I, incluímos 30 homens com histórico pessoal de câncer de mama, negativos para VPs em *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*. Coletamos seus dados sociodemográficos, clínico-patológicos, história pessoal e familiar de câncer. A fim de identificar variantes germinativas patogênicas (P) ou provavelmente patogênicas (PP) realizamos sequenciamento exômico germinativo (WES). As variantes identificadas foram classificadas segundo os critérios preconizados pelo *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG). Selecionamos 5 variantes para a realização de estudos funcionais *in vitro*: *BRIP1* c.2119C>T (R707C), *MRE11* c.1516G>T (E506\*) e *MSH6* c.1109T>C (L370S), consideradas P/PP, e c.80T>C (S27F) e c.1772G>A (R591Q) em *FAN1*, classificadas como VUS. Na Etapa II, realizamos a edição gênica de vetores contendo as sequências desses genes. Inserimos as variantes de interesse nos vetores, que foram superexpressos em linhagens celulares para a avaliação do impacto biológico, através e ensaios funcionais. **Resultados:** A mediana de idade ao diagnóstico foi de 55 anos (32-78; DP: 12,13). Variantes P/PP foram identificadas em 30% dos casos (9/30). Variantes P/PP foram identificadas em genes associados à predisposição ao câncer, como *CHEK2*, *BRIP1*, *MSH6* e *MUTYH*, bem como em genes de reparo de danos ao DNA, como *MRE11*, além dos já citados *BRIP1*, *MSH6* e *MUTYH*. Os resultados funcionais demonstraram que a presença da variante E506\* em *MRE11* impacta as funções da proteína resultante, diminuindo sua capacidade clonogênica e de resolução de danos ao DNA pela via de RH. Portanto, pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento tumoral. As variantes R707C, em *BRIP1*, e L370S, em *MSH6*, não apresentaram diferenças significativas nos ensaios realizados, se assemelhando à

condição WT de cada gene. As variantes S27F e R591Q, classificadas como VUS, apresentaram impacto na funcionalidade de *FAN1* em um modelo de câncer de ovário, mas seu comportamento se assemelhou a condição WT em um modelo mamário. **Conclusões:** Através das nossas análises, conseguimos estabelecer relações entre variantes genéticas, sejam elas germinativas ou somáticas, e o desenvolvimento da doença, para 7 (23,33%) participantes do estudo, já que essas variantes estão presentes em genes sabidamente associados ao câncer e/ou síndromes hereditárias. Os estudos funcionais realizados demonstraram que a variante identificada em *MRE11* apresenta um comportamento semelhante ao de uma variante patogênica, visto que sua presença impacta deficiência das linhagens celulares no reparo de danos ao DNA e ineficácia na resolução do dano ao longo do tempo. Já as variantes identificadas em *BRIP1* e *MSH6*, demonstraram um comportamento semelhante à condição WT, sem impactar na funcionalidade da proteína resultante. As variantes identificadas em *FAN1* apresentaram comportamento patogênico no modelo de câncer de ovário, mas não desempenharam o mesmo papel em um modelo mamário. Embora outras abordagens sejam necessárias para a classificação das variantes analisadas, os resultados obtidos neste estudo representam uma importante contribuição no fornecimento de dados que possam auxiliar na classificação definitiva quanto à sua patogenicidade.

**Palavras-chave:** câncer de mama em homens; câncer de mama hereditário; síndromes de predisposição ao câncer hereditário; sequenciamento completo do exoma; classificação de variantes; análises funcionais.

## ABSTRACT

PEREIRA AS. Identification of germline variants in men diagnosed with breast cancer and assessment of their biological impact *in vitro*. **Thesis (Doctorate's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2024.

**Background:** Male breast cancer (MBC) is a rare tumor type, with germline pathogenic variants (PVs) in genes such as *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *CHEK2*, and *ATM* recognized as risk factors. Despite this, many MBC cases have unknown genetic factors, limiting our understanding of the disease. **Aims:** This study aims to identify new predisposition genes for MBC through whole exome sequencing (WES) and to determine the biological impact of selected variants *in vitro*. **Methodology:** The study was conducted in two main steps. Step I: Thirty men with a personal history of breast cancer, negative for PVs in *BRCA1*, *BRCA2*, and *TP53*, were included. Sociodemographic, clinicopathological data, and personal and family history of cancer were collected. Germline WES was performed to identify pathogenic (P) or likely pathogenic (LP) variants, classified according to the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) criteria. Five variants were selected for *in vitro* functional studies: *BRIP1* c.2119C>T (R707C), *MRE11* c.1516G>T (E506\*), and *MSH6* c.1109T>C (L370S) – considered P/LP – c.80T>C (S27F) and c.1772G>A (R591Q) in *FAN1* – classified as variants of uncertain significance (VUS). Step II: Gene editing was performed on vectors containing the sequences of these genes. These variants were inserted into expression vectors and overexpressed in cell lines to evaluate their biological impact through functional assays. **Results:** The median age at diagnosis was 55 years (range 32-78; SD: 12.13). P/LP variants were identified in 30% of cases (9/30), in genes associated with cancer predisposition, such as *CHEK2*, *BRIP1*, *MSH6*, and *MUTYH*, as well as DNA damage repair genes like *MRE11*. Functional studies showed that the E506\* variant in *MRE11* impacts the resulting protein's functions, reducing its clonogenic capacity and DNA damage repair via the homologous recombination pathway, indicating a potential role in tumor development. The R707C variant in *BRIP1* and L370S variant in *MSH6* did not show significant differences in the assays, resembling the wild-type (WT) condition of each gene. The S27F and R591Q variants, classified as VUS, affected *FAN1* functionality in an ovarian cancer model but behaved similarly to the WT condition in a breast cancer model. **Conclusions:** Our analyses established relationships between genetic variants, whether germline or somatic, and disease development for 7 (23.33%) study

participants. These variants are present in genes known to be associated with cancer and/or hereditary syndromes. Functional studies demonstrated that the *MRE11* E506\* variant behaves similarly to pathogenic variants, impacting DNA damage repair. The *BRIP1* and *MSH6* variants exhibited WT-like behavior, while *FAN1* variants showed pathogenic behavior in an ovarian cancer model but not in a breast cancer model. Further approaches are necessary to classify the analyzed variants definitively, but the results provide important data to assist in the classification of their pathogenicity.

**Keywords:** Male Breast Cancer; Hereditary Breast Cancer; Hereditary Cancer Syndromes; Whole-exome sequencing; Variants classification; Functional analysis.

## 1. Introdução

### 1.1. Câncer de mama em homens

O câncer de mama é o tipo de câncer mais comum entre as mulheres, sendo estimados para o ano de 2020 quase 2,2 milhões de novos casos pelo mundo<sup>1</sup>. Esse tipo tumoral é o mais diagnosticado entre todos os tipos, considerando homens e mulheres (11,7% do total de casos de câncer)<sup>1</sup>. No Brasil, estimou-se que para o triênio 2023-2025 tenhamos 73.610 novos casos para cada ano, representando 30,1% dos casos de câncer em mulheres<sup>2</sup>. No entanto, para os homens, esse número é bem menor, representando menos de 1% dos casos entre todos os tipos de câncer, o que faz com que esse tipo tumoral não esteja presente entre os tipos mais frequentes para o sexo masculino<sup>1, 2</sup>. Um estudo realizado com informações presentes no banco de dados Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, que utiliza dados de pacientes dos Estados Unidos, demonstrou que entre 1975 e 2017 foram registrados 20.067 casos de câncer de mama entre homens, sendo 169 diagnosticados até os 39 anos e 19.898 casos em homens com 40 anos ou mais<sup>3</sup>. Para o ano de 2023, foram estimados 2.800 novos casos de câncer de mama invasivo masculino e cerca de 530 mortes pela doença no país<sup>4</sup>.

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama em indivíduos do sexo masculino (CMM) são semelhantes aos das mulheres, como idade avançada, exposição à radiação, consumo excessivo de álcool, hormonioterapia com estrógeno, além de fatores hereditários, como variantes em genes associados à doença e história familiar de câncer de mama<sup>5</sup>. Além desses fatores, também podemos destacar ginecomastia e a Síndrome de Klinefelter, que afeta 1 em cada 1.000 homens. É uma síndrome congênita caracterizada pela presença de dois cromossomos X e um Y, acarretando um menor nível de andrógeno e maior nível de estrógeno quando comparados a homens sem a síndrome. Essa condição confere de 20 a 60 vezes mais chance de um homem desenvolver câncer de mama do que outro homem da população<sup>5</sup>. Por fim, problemas relacionados aos testículos, como caxumba, testículos que não tenham descido ou a remoção dos dois testículos, podem conferir um risco maior para o desenvolvimento do câncer de mama<sup>5</sup>. Apesar de apresentar fatores de risco semelhantes às mulheres, em geral, homens têm cerca de 70 a 100 vezes menor chance de desenvolver esse tipo tumoral. Estima-se que 1 em cada 833 (0,12%) terão a doença ao longo da vida<sup>4</sup>, enquanto, entre as mulheres, a estimativa é de que 1 em cada 8 (13%) desenvolva câncer de mama<sup>6</sup>.

A prevenção do câncer de mama entre os homens é dificultada pela detecção tardia da doença, uma vez que pequenos nódulos podem ser confundidos com inflamações e, até mesmo, pela falta de informação sobre o acometimento desse tipo de câncer. No entanto, um levantamento entre os anos de 2011 e 2017 do SEER, demonstra que quando a doença é detectada precocemente apresenta uma alta taxa de sobrevida relativa em cinco anos<sup>7</sup>. De acordo com o SEER quando os homens são diagnosticados no estágio localizado (que corresponde aos casos em que não há sinais de câncer em outros órgãos), sua taxa de sobrevida em cinco anos é de 95%, diminuindo essa taxa ao passo que a doença é diagnosticada em estágio mais avançados, sendo de 83% no estágio regional (engloba os casos em que o tumor se espalhou para áreas adjacentes e linfonodos) e 19% para o estágio distante (casos onde há metástase para órgãos distantes)<sup>7</sup>. Outro estudo com dados obtidos do *National Cancer Database* (NCDB), demonstrou que a taxa de sobrevida em 5 anos para homens diagnosticados no estadio I foi de 87,8%, no estadio II de 78,9%, no estadio III de 63,3% e no estadio IV, o mais avançado, de 21,4%<sup>8</sup>. Nesta perspectiva, um estudo realizado na Unidade da Mama do Hospital Universitário de Trieste, na Itália, constatou que homens diagnosticados com tumores em estágios mais avançados (pT4) possuem um risco de morte maior do que aqueles em estágios precoces (pT1a-b) [*Hazard ratio* (HR)=10,58 (1,05 – 106,67); Intervalo de confiança (IC) 95%]<sup>9</sup>. Assim, ressalta-se a importância de um diagnóstico precoce e métodos que possam ser preventivos e, para que isso ocorra, é necessário um melhor entendimento sobre os fatores predisponentes ao desenvolvimento do CMM, incluindo a presença de alterações patogênicas em genes de predisposição ao câncer.

## **1.2. Genes de predisposição ao câncer de mama em homens**

Ainda há uma escassez de estudos sobre genes de predisposição ao CMM, no entanto, sabe-se que o supressor tumoral BRCA2 tem um importante papel no desenvolvimento da doença. Fostira e colaboradores realizaram um estudo, onde foi sequenciado o DNA germinativo de homens com câncer de mama, e observaram que o gene mais frequentemente alterado foi BRCA2, que apresentava 6,9% das alterações totais encontradas (7/102). Além disso, 53,84% (7/13) das variantes patogênicas (VPs) (de perda de função) encontradas estavam presentes nesse gene<sup>10</sup>. Homens portadores de variantes germinativas patogênicas/provavelmente patogênicas (P/PP) em BRCA2 possuem um risco cumulativo de desenvolver câncer de mama de 8,3% aos 80 anos. Para os portadores de variantes P/PP em BRCA1 esse risco é de 1,8% aos 80 anos<sup>11</sup>. Esses números são elevados quando comparamos

ao risco cumulativo para homens sem variantes nesses genes (população em geral), que é de aproximadamente 0,12% aos 80 anos<sup>11</sup>. Nessa perspectiva, Li e colaboradores apontam que o risco absoluto idade-específico para o desenvolvimento da doença em homens que possuem VP em *BRCA1* é de 0,4% e em *BRCA2* de 3,8% aos 80 anos<sup>12</sup>. O mesmo trabalho refere que o risco relativo (RR) para desenvolvimento de CMM é de 4,30 (RR = 4,30; 95% IC, 1,09 – 16,96) para portadores de variantes P/PP em *BRCA1* e de 44,0 (RR = 44,0; 95% CI, 21,3 – 90,9) para os portadores de variantes P/PP em *BRCA2*<sup>12</sup>.

A presença de variantes patogênicas nos genes que *BRCA1* e *BRCA2*, frequentemente alterados em casos de CMM, predispõem à Síndrome Hereditária de Câncer de Mama e Ovário (HBOC, do inglês *Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome*). Segundo o *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) um dos critérios sugestivos para a síndrome é possuir história pessoal ou familiar de câncer de mama em homens. Além da predisposição aos tumores de mama e ovário, pessoas com HBOC ainda possuem risco aumentado para o desenvolvimento de tumores de pâncreas e próstata, dentre outros<sup>13, 14</sup>.

Ainda que os casos de CMM sejam tratados como suspeitos para HBOC (critério de história pessoal), variantes patogênicas presentes em outros genes podem estar envolvidas em sua predisposição. Nessa perspectiva, diferentes estudos investigam fatores genéticos causais para o desenvolvimento da doença. Em um trabalho publicado por Pritzlaff e colaboradores, utilizando um painel gênico que contempla 16 genes de predisposição ao câncer de mama, observou-se que os genes mais frequentemente alterados em homens com a doença eram *BRCA2* (*Odds ratio* (OR)= 13,9), *CHEK2* (OR= 3,7), e *PALB2* (OR= 6,6), sendo estes relacionados com um aumento significativo do risco<sup>15</sup>. Portanto, possuir variantes P/PP nesses três genes, ou em *BRCA1* (OR= 1,8)<sup>15</sup>, é considerado um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama hereditário em homens<sup>16</sup>. Recentemente, o gene *ATM* também foi adicionado a esse grupo de genes, uma vez que Bucalo e colaboradores observaram que a presença de variantes patogênicas nos genes *PALB2* (OR= 7,28) e *ATM* (OR= 4,79), confere um risco aumentado para o desenvolvimento do CMM<sup>17</sup>.

Apesar de alguns genes já estarem bem relacionados ao câncer de mama masculino, como *BRCA1*<sup>16, 18</sup>, *BRCA2*<sup>15, 18</sup>, *PALB2*<sup>15, 17, 18</sup>, *CHEK2*<sup>15, 18</sup> e *ATM*<sup>17, 18</sup>, ainda existe uma parcela significativa de casos cuja causa genética é desconhecida. Em uma coorte italiana, utilizando um painel com 94 genes de predisposição hereditária (*TruSight Cancer*, Illumina), Tedaldi e colaboradores demonstraram que 78,6% dos casos de câncer de mama masculino não

possuíam variantes P/PP nos genes analisados e, portanto, sua causa genética foi considerada desconhecida<sup>19</sup>.

Na tentativa de um melhor entendimento da etiologia de doenças em que painéis gênicos não são capazes de trazer respostas, estudos em larga escala, incluindo sequenciamento exômico completo (WES, do inglês: *whole exome sequencing*) e sequenciamento genômico completo (WGS, do inglês: *whole genome sequencing*), têm sido utilizados para identificação de possíveis causas genéticas. O emprego dessas técnicas, no estudo de diversos tipos tumorais, possibilita a identificação de novos genes associados à susceptibilidade ao câncer de mama e ovário em famílias de alto risco<sup>20, 21</sup>. Em um estudo com pacientes negativas para variantes P/PP em *BRCA1/2*, Felicio e colaboradores identificaram variantes germinativas P/PP nos genes *CHEK2*, *MUTYH*, *PMS2*, *RAD51C*, *FAN1*, *POLQ*, *RAD54L*, *DROSHA* e *SLC34A2*<sup>21</sup>. Alguns desses genes são, sabidamente, envolvidos nas vias da carcinogênese ou já associados à predisposição ao câncer hereditário, enquanto outros estão presentes nas vias de reparo de danos ao DNA<sup>21</sup>. Esse tipo de estudo permite uma avaliação personalizada de risco para famílias portadoras de VPs em genes previamente associados ao câncer<sup>20</sup>. Doddato e colaboradores demonstraram que famílias com tumores de mama e ovário sem VPs em *BRCA1* ou *BRCA2*, portavam variantes P/PP nos genes *ATM*, *BRIP1*, *CDH1*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C* e *TP53*, já associados ao câncer hereditário, além de *DPYD*, *ERBB3*, *ERCC2*, *MUTYH*, *NQO2*, *NTHL1*, *PARK2*, *RAD54L* e *RNASEL*, genes candidatos à susceptibilidade ao câncer<sup>20</sup>. No entanto, apesar dos avanços nas técnicas de biologia molecular e na diminuição do seu custo, há uma escassez na literatura sobre genes envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama masculino<sup>22, 23</sup>. Seria importante, em termos de diagnóstico precoce e tratamento, que o papel de outros genes e sua associação com o CMM fosse esclarecido no que diz respeito ao desenvolvimento da doença e no impacto das variantes na funcionalidade da proteína resultante. Isso facilitaria a tomada de decisões de condutas clínicas e poderia beneficiar pacientes com tratamentos mais adequados de acordo com o perfil molecular do tumor.

### **1.3. Identificação e classificação de variantes**

É crescente o número de estudos utilizando técnicas como WES e WGS para uma busca por alterações moleculares envolvidas na predisposição ao câncer. No entanto, a análise e interpretação dos dados gerados por essas técnicas ainda é um desafio intimamente relacionado ao grande número de variantes encontradas e à priorização daquelas

potencialmente ligadas à causalidade da doença<sup>24</sup>. Neste sentido, é importante contarmos com um *pipeline* de análises de bioinformática que eleja variantes promissoras para a realização de estudos funcionais. Essas análises de bioinformática nos dão indícios sobre a influência de variantes na proteína resultante, no entanto, ainda são necessários outros tipos de avaliação, como as funcionais, para que possamos obter mais informações acerca da variante de interesse<sup>25</sup>. Esse conjunto de estudos constitui poderosas ferramentas para que essas variantes sejam classificadas quanto à sua patogenicidade<sup>25</sup> e, conseqüentemente, seus portadores possam receber o manejo adequado.

Para uma melhor interpretação clínica em relação à patogenicidade de variantes genéticas, Plon e colaboradores propuseram um sistema de classificação em que as variantes podem apresentar cinco níveis diferentes, que são graduais e levam em conta diversos parâmetros<sup>26</sup>. A classe 1 corresponde às variantes não patogênicas, ou seja, aquelas que não possuem indícios de patogenicidade (probabilidade menor que 0,1% de ser patogênica), sendo conhecidas como benignas (B). A classe 2 é composta por variantes provavelmente benignas (PB), que representam aquelas em que a probabilidade de serem patogênicas é de 0,1 a 4,9%. A classe 3, composta pelas variantes de significado clínico desconhecido, também chamadas de VUS (do inglês: *Variant of Uncertain Significance*), ou seja, não há informação suficiente para que seja feita qualquer recomendação em termos de manejo para as variantes deste grupo. Nessa classe se encontram variantes que possuem de 5 a 94,9% de probabilidade de serem patogênicas. A classe 4 engloba variantes chamadas de provavelmente patogênicas, porque apresentam uma probabilidade de 95 a 99% de possuírem patogenicidade. Por fim, a classe 5 é aquela com variantes consideradas patogênicas, já que a probabilidade de apresentarem patogenicidade é superior a 99%<sup>26</sup>.

Posterior à proposição do sistema de classificação em cinco níveis, o *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) e a *Association for Molecular Pathology* (AMP), recomendaram que a terminologia fosse comum em todo o mundo. Diante disso, os especialistas propuseram a classificação das variantes em benigna, provavelmente benigna, significado clínico incerto (VUS), provavelmente patogênica (PP) e patogênica (P)<sup>25</sup>. Uma vez que houvesse um consenso, a classificação facilitaria o diálogo entre médico e paciente, fazendo com que o segundo possa ter um melhor entendimento da situação<sup>26</sup>. O sistema também tem grande aplicabilidade na clínica para que o paciente possa receber o manejo mais adequado de acordo com a classificação da variante portada por ele e/ou familiares. O

artigo publicado por Richards e colaboradores definiu uma série de diretrizes (estabelecidas pela ACMG/AMP) para a classificação das variantes genéticas germinativas em uma das cinco categorias acima definidas<sup>25</sup>. Segundo essa diretriz, os critérios mais relevantes para que uma variante seja considerada patogênica são: i) variante de perda de função em um gene onde essa perda é um mecanismo conhecido de doença; ii) alteração de aminoácidos de uma variante patogênica previamente estabelecida, independentemente da alteração de nucleotídeos; iii) alteração de novo em paciente com a doença e sem história familiar; iv) estudos funcionais *in vitro* ou *in vivo* bem estabelecidos que demonstram um efeito prejudicial no gene ou proteína resultante; v) prevalência da variante significativamente aumentada em indivíduos com a doença quando comparados aos indivíduos saudáveis<sup>25</sup>. Vale ressaltar que ainda existem outros critérios que são considerados moderados ou fracos (*supporting*), mas que por si só não garantem a classificação de uma variante como patogênica ou benigna. Artigos publicados na sequência ao artigo de Richards e colaboradores tem detalhado vários critérios<sup>27</sup>, bem como grupos de experts do Clinical Genome Resource (ClinGen) e do Cancer Variant Interpretation Group (CanVIG) vêm publicando um direcionamento das diretrizes ACMG para genes específicos<sup>28</sup>, como, por exemplo, *BRCA1/BRCA2*<sup>29, 30</sup>, *TP53*<sup>31</sup>, *CDH1*<sup>32</sup> e *CHEK2*<sup>33</sup>.

Sendo assim, a utilização de ensaios funcionais robustos, adequados aos genes em análise, pode auxiliar na classificação de variantes identificadas, bem como na validação dos dados provenientes de ferramentas computacionais de predição *in silico*. Esses ensaios são de suma importância, especialmente no caso de variantes novas ou pouco estudadas, com ausência de informações adicionais em bancos de dados ou na literatura científica. Conforme a ACMG, a combinação de resultados de ensaios funcionais (*in vivo* e *in vitro*) consiste na forma mais robusta de esclarecimento do papel das variantes genéticas na saúde humana<sup>25, 34</sup>.

#### **1.4. Variantes patogênicas presentes em genes envolvidos em vias de reparo de danos ao DNA e seu potencial como alvo terapêutico**

Devido à importância dos genes envolvidos nas vias de reparo de danos ao DNA, é crescente a investigação do papel da predisposição desses genes na carcinogênese. Nessa perspectiva, em um estudo com casos de CMM, utilizando um painel gênico para genes envolvidos em vias de reparo, foram identificadas variantes consideradas patogênicas nos genes *BRCA2*, *BRIP1*, *MUTYH* e *PMS2*<sup>35</sup>. As variantes encontradas nesses 4 genes estavam

presentes em 22 pacientes (23%)<sup>35</sup>. Adicionalmente, foram identificadas 12 variantes classificadas como VUS em 9 genes diferentes, sendo eles *BARD1*, *BRCA1*, *BRIP1*, *CHEK2*, *ERCC1*, *NBN*, *PALB2*, *PMS1* e *RAD50*<sup>35</sup>.

Também foram realizadas análises epigenéticas de genes envolvidos na via de reparo de quebra de dupla fita (DSB, do inglês *double-strand break*) por recombinação homóloga (RH), em homens com câncer de mama<sup>36</sup>. Foi observado que, ao comparar amostras de tecido de ginecomastia (tecido normal) com tecido tumoral de mama, dois genes, *RAD51B* e *XRCC3*, apresentaram diferença nos níveis de metilação de suas regiões promotoras, sugerindo que eles possam ser utilizados como biomarcadores para o desenvolvimento do câncer de mama masculino<sup>36</sup>. Esse estudo corrobora aos achados de Rizzolo e colaboradores, que demonstrava que alterações nos perfis de metilação gênica são comuns em casos de CMM<sup>37</sup>. Os autores ainda afirmam que essas alterações do padrão de metilação poderiam permitir uma classificação dos casos de CMM em subgrupos moleculares, implicando em manejos clínicos diferenciados para os pacientes<sup>37</sup>.

Ao avaliarmos os diversos estudos sobre genes de predisposição ao câncer, tem sido observado que, especialmente, os genes envolvidos na via de reparo da RH possuem um papel fundamental na tumorigênese. Nguyen e colaboradores observaram que a maior causa da deficiência no reparo de danos ao DNA por RH (DRH) ocorre quando há inativação bialélica dos genes envolvidos nessa via, como *BRCA1*, *BRCA2*, *RAD51C* e *PALB2*<sup>38</sup>. As alterações bialélicas são as maiores causadoras de perda na eficiência do reparo em uma série de tumores presentes na HBOC<sup>39</sup>. Adicionalmente, existe uma forte correlação entre a inativação bialélica e a perda de heterozigose dos genes envolvidos no reparo de danos por RH<sup>38, 40</sup>. Diante desse cenário, diversas variantes, antes classificadas como VUS, foram reanalisadas quanto à sua patogenicidade, e reclassificadas com base no poder dessa variante causar deficiência no reparo por RH<sup>39</sup>.

O papel dos genes presentes na via de reparo de danos por RH ganha uma importância ainda maior na carcinogênese devido à existência de tratamentos direcionados, já aprovados, para portadores de VPs nesses genes. Um dos principais alvos são os inibidores da poli (ADP-ribose) polimerase (*iPARP*), utilizados, principalmente, nos casos em que os pacientes são portadores de VPs (deletérias) em *BRCA1* ou *BRCA2*<sup>41</sup>. Os *iPARP* Niraparibe e Olaparibe ainda são aprovados para a utilização no tratamento de pacientes adultos com câncer em estágio avançado de ovário, trompas de falópio ou peritoneal primário, associado a um *status* positivo

de DRH definido por: suspeita de mutação BRCA deletória; ou instabilidade genômica e que tenham progredido mais de seis meses após a resposta à última quimioterapia à base de platina<sup>42, 43</sup>. O critério de utilização para ambos é que, além do tumor estar associados à DRH, os pacientes tenham sido tratados com três ou mais regimes de quimioterapia anteriores<sup>42, 43</sup>. O Olaparibe ainda pode ser utilizado *i)* no tratamento de pacientes adultos com câncer de próstata metastático resistente à castração, com variantes somáticas ou germinativas em genes da via de RH, que tenham progredido após tratamento prévio com Enzalutamida ou Abiraterona<sup>43</sup>; *ii)* em combinação com Bevacizumabe para o tratamento de manutenção de pacientes adultos com câncer epitelial avançado de ovário, trompa de Falópio ou câncer peritoneal primário que estão em resposta completa ou parcial à quimioterapia de primeira linha à base de platina e cujo câncer está associado à DRH - estado positivo definido por: uma mutação BRCA deletória ou suspeita de ser deletória e/ou instabilidade genômica<sup>43</sup>.

### **1.5. Tratamento para o câncer de mama em homens**

No que diz respeito ao tratamento do câncer de mama masculino, apesar do tipo tumoral se manifestar de maneira diferente entre homens e mulheres, em geral, o manejo e tratamento realizado nos homens segue um padrão semelhante ao das mulheres, sendo o tamoxifeno um dos quimioterápicos mais utilizados para o sexo masculino<sup>44-46</sup>. Isso se deve ao fato de que os tumores em homens, em sua grande maioria, apresentam receptores positivos para os hormônios estrógeno e progesterona, sendo a terapia endócrina um importante fator no tratamento à doença, apresentando aumento na sobrevida dos pacientes<sup>16, 47</sup>.

Segundo as recomendações da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO)<sup>46</sup>, homens com câncer de mama com receptores hormonais positivos, candidatos à terapia endócrina adjuvante, devem receber tamoxifeno por um período inicial de cinco anos, enquanto aqueles com contraindicação ao medicamento podem ser tratados com um agonista/antagonista do hormônio liberador de gonadotrofina em adição a um inibidor de aromatase. Homens que, após cinco anos de tratamento com tamoxifeno, toleraram a terapia, e ainda apresentam alto risco de recorrência da doença, podem continuar sendo tratados com tamoxifeno por mais cinco anos. Nos casos de doença avançada ou metastática, os homens devem receber terapia endócrina como terapia de primeira linha (exceto em casos de crise visceral ou doença rapidamente progressiva) e, ainda, pode-se usar a terapia sistêmica direcionada, seguindo as mesmas indicações e combinações oferecidas às mulheres<sup>46</sup>.

Como uma alternativa terapêutica eficaz, podemos destacar os *iPARP*, como o Olaparibe, que demonstraram efetividade em ensaios clínicos de fase I, II ou III para pacientes com câncer de ovário<sup>48, 49</sup>, mama<sup>50</sup> e pâncreas<sup>51</sup> que possuem variantes germinativas patogênicas ou de perda de função em *BRCA*. Esse grupo de medicamentos atua através do mecanismo de letalidade sintética<sup>52</sup>. Esse mecanismo parte do princípio de que, quando uma via é inativada por uma variante presente em um gene da via (ou um *iPARP*, por exemplo), mas outras vias continuam funcionais, a viabilidade celular não se altera. No entanto, quando duas vias são inativadas por VPs em genes que atuam nelas, ou por um *iPARP* e uma VP em um gene de outra via, a células apresentam uma instabilidade genética e, conseqüentemente, ocorre a morte celular<sup>52</sup>. Nessa perspectiva, pacientes com CMM que possuem VPs em genes como *BRCA1* e *BRCA2* poderiam se beneficiar do tratamento com a utilização de *iPARP*, assim como outros pacientes portadores de VPs nesses genes<sup>41</sup>.

Outros estudos ainda sugerem que os *iPARP* teriam efeito similar em pacientes com VPs em outros genes envolvidos no reparo de danos ao DNA que não *BRCA1/2*, tais como *PTEN*<sup>53</sup>, *RAD51*, *RAD54*, *DSS1*, *RPA1*, *NBS1*, *ATR*, *ATM*, *CHK1*, *CHK2*, *FANCD2*, *FANCA*, *FANCC*<sup>54</sup> e *PALB2*<sup>55, 56</sup>, já que eles apresentaram sensibilidade a esse tipo de medicamento. Segundo os autores, o efeito dos *iPARP* se daria por causa da inatividade da via, não seria um fator gene-específico<sup>53-56</sup>.

Diante disso, a necessidade de um melhor conhecimento sobre genes que conferem predisposição ao CMM torna-se maior, já que pacientes com variante em genes de via de reparos poderiam beneficiar-se de tratamentos já estabelecidos, como os *iPARP*.

## 2. Justificativa

O câncer de mama representa apenas 1% dos casos de câncer que acometem a população masculina, sendo assim, os estudos sobre o tema são escassos e, em consequência, o nosso conhecimento acerca da patologia e de seus fatores causais é bastante limitado.

Dentre os fatores que podem estar associados destaca-se a presença de variantes germinativas patogênicas em genes de alto e moderado risco para câncer. Indivíduos com variantes germinativas patogênicas apresentam um risco cumulativo vital que pode ser bastante elevado para o desenvolvimento do câncer, quando comparados à população em geral. Somados a isso, o desconhecimento sobre o fator causal de uma parcela significativa dos casos de CMM e o grande potencial de prevenção associado à realização do teste genético preditivo, nos leva a crer que a utilização de uma metodologia ampla e robusta seja necessária para o diagnóstico molecular do CMM e para a descoberta de novos mecanismos moleculares envolvidos na origem ou relacionados ao desenvolvimento desse tipo tumoral.

Adicionalmente, pacientes e famílias que possuem variantes patogênicas germinativas em genes envolvidos nas vias de reparo ao DNA, como a de recombinação homóloga, poderiam se beneficiar da utilização de fármacos como os iPARP, que possuem uma eficiência comprovada para alguns tipos tumorais em genes dessa via.

Dessa forma, o presente estudo pretende realizar uma ampla caracterização clínica e molecular de pacientes com CMM, bem como uma análise funcional detalhada de genes potencialmente associados ao desenvolvimento do câncer de mama masculino. Esperamos dessa forma contribuir para um melhor entendimento da doença em relação aos genes envolvidos em sua predisposição e desenvolvimento tumoral e, conseqüentemente, um melhor direcionamento no manejo dos pacientes e seus familiares.

### 3. Objetivo geral

Identificar variantes germinativas patogênicas/provavelmente patogênicas em pacientes do sexo masculino com câncer de mama através do sequenciamento completo do exoma e determinar o impacto biológico, *in vitro*, de variantes selecionadas.

#### 3.1. Objetivos específicos

- Caracterizar a amostra de estudo quanto à história pessoal e familiar de câncer, dados sociodemográficos e informações clínico-patológicas.
- Identificar alterações germinativas em pacientes com história pessoal de câncer de mama, a partir do sequenciamento completo do exoma;
- Classificar e caracterizar as variantes germinativas identificadas seguindo as diretrizes da *American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG)*;
- Identificar variantes somáticas em peças de tumores criopreservados dos pacientes e classificá-las com o auxílio de ferramentas de predição *in silico*;
- Estabelecer linhagens celulares *knockout* para os genes que apresentam variantes genéticas selecionadas para o estudo;
- Construir vetores com as sequências gênicas de interesse *wild-type* ou modificadas através da técnica de mutagênese sítio-dirigida;
- Avaliar o efeito biológico das variantes genéticas selecionadas, através de diferentes ensaios, para as principais funções das proteínas resultantes.

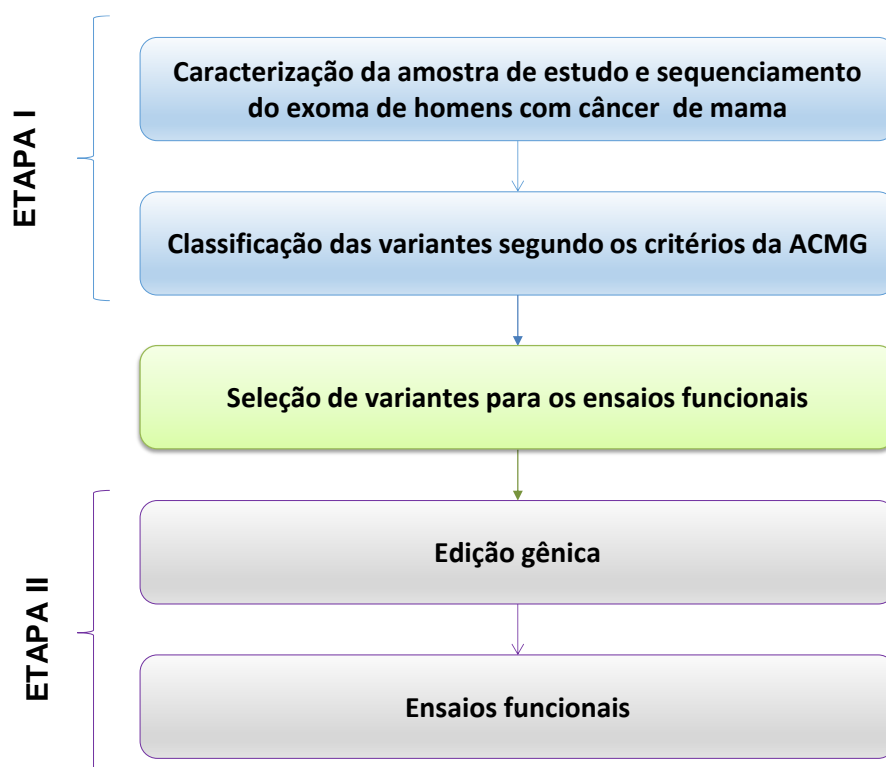
## 4. Material e Métodos

### 4.1. Delineamento do Estudo

Com o intuito de identificar novos genes associados ao câncer hereditário, foi realizado em nosso grupo de pesquisa, um estudo intitulado “Estudo Epidemiológico e Molecular para Avaliação da Oncogenética no Contexto do SUS”, aprovado pelo Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON), com auxílio financeiro do Ministério da Saúde. Este estudo foi coordenado pela Dra. Edenir I. Palmero, e contemplava o sequenciamento exômico completo de pacientes com história pessoal e/ou familiar sugestiva de câncer hereditário cujo teste genético para os genes sabidamente associados ao tumor/síndrome tenha sido negativo. O projeto foi subdividido em grupos de acordo com os tipos tumorais, sendo destacado a partir de agora o grupo de pacientes do sexo masculino diagnosticados com câncer de mama, tema da presente tese de Doutorado.

A Figura 1 representa um esquema do delineamento do estudo, que foi dividido em duas etapas principais. A primeira etapa consistiu na análise *in silico* dos dados obtidos no sequenciamento exômico dos pacientes selecionados. A classificação das variantes identificadas foi realizada através de um pipeline e de consultas a bancos de dados populacionais e doença-específicos, bem como através da aplicação das diretrizes de classificação de variantes preconizada pela ACMG<sup>25</sup>. Foram identificadas variantes que sugeriam causalidade ou associação ao desenvolvimento do fenótipo sob investigação (CMM). Em seguida, foram selecionadas variantes presentes em genes ainda não associados ao CMM, sendo três delas classificadas como P/PP e duas como VUS.

A segunda etapa do estudo baseia-se em ensaios funcionais para a caracterização e determinação do impacto dessas variantes na funcionalidade da proteína. Para isso, as construções *wild type* (WT) ou com as variantes selecionadas dos genes de interesse foram superexpressas nas linhagens celulares para a realização das análises funcionais.



**Figura 1.** Delineamento do estudo

#### 4.2. Seleção de pacientes e aspectos éticos

Este estudo faz parte do projeto PRONON, que foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (CEP) do Hospital de Câncer de Barretos (CAAE: 56164716.9.0000.5437).

Foram incluídos 30 homens com história pessoal de câncer de mama, previamente testados, negativos para variantes P/PP em *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* (painel realizado pelo Departamento de Oncogenética do Hospital de Câncer de Barretos). Esses pacientes também foram avaliados quanto a presença de grandes deleções ou rearranjos em *BRCA1* e *BRCA2* através da técnica *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) e para a presença da variante c.156\_157insAlu em *BRCA2*.

Os participantes do estudo foram selecionados de acordo com a conveniência de casos atendidos pelo Hospital de Câncer de Barretos e um dos participantes foi atendido pelo serviço do Hospital das Clínicas de Porto Alegre. Além disso, não existiram critérios de inclusão com base na história familiar para esse tipo tumoral, uma vez que ter história pessoal e/ou familiar de CMM é um dos critérios para HBOC<sup>57</sup>, uma das principais síndromes de predisposição hereditária ao câncer de mama. Sendo assim, os participantes selecionados são o próprio critério para a síndrome. Adicionalmente, todos os participantes foram incluídos mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os dados clínico-patológicos e sociodemográficos dos pacientes incluídos no estudo foram coletados através de consulta aos prontuários médicos e a história familiar foi obtida junto ao setor de Oncogenética do Hospital de Câncer de Barretos. Todos os dados foram armazenados na plataforma *RedCap*<sup>58</sup>.

#### **4.3. Sequenciamento completo do exoma (WES) germinativo**

Para a realização do sequenciamento completo do exoma germinativo foi utilizada uma amostra de sangue periférico coletada dos pacientes. O DNA genômico foi extraído com o auxílio do *QIAmp DNA Blood Mini QIAcube Kit* (Qiagen, #51104) de acordo com as recomendações do fabricante.

O sequenciamento completo do exoma foi realizado de maneira terceirizada pela SOPHiA GENETICS™, utilizando 200ng de DNA germinativo, e o *Whole Exome Solution version 1 kit* (203.058 regiões alvo, 40.907.213 pares de base e 19.682 genes) e a plataforma *NovaSeq 6000* (Illumina).

Os dados obtidos no sequenciamento dos exomas estão depositados no repositório *European Genome-phenome Archive* (<https://ega-archive.org/>), sob o número EGAS50000000028.

#### **4.4. Chamada de variantes**

Para a chamada de variantes germinativas, a qualidade das *reads* foi analisada através do FASTQ e, quando necessário, trimada pelo *software* CUTADAPT. As *reads* foram mapeadas contra o genoma humano (GRCh37/hg19) pelo *software* BWA e pós-processadas pelo *Genome Analysis Toolkit (GATK)* para recalibração dos *scores* de qualidade. A chamada de variantes foi realizada pelo *HaplotypeCaller* do GATK. Apenas aquelas variantes com cobertura superior a 30x e uma fração alélica superior a 25% foram consideradas para as próximas etapas.

#### **4.5. Genes analisados**

Para a análise de variantes foram considerados apenas genes envolvidos, direta ou indiretamente, na carcinogênese, no reparo de danos ao DNA e/ou em síndromes hereditárias. Para isso, nosso grupo de pesquisa elaborou um painel com 2.389 (Anexo 1) genes baseado no *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*<sup>59</sup> (COSMIC – utilizando as palavras-chave: “*cancer*”, “*tumor-suppressor gene*”, “*proto-oncogene*” e “*oncogene*”), no *Universal Protein Resource (UniProt)*<sup>60</sup> e no estudo DISEASE<sup>61</sup>. Adicionalmente, contamos com 228 genes envolvidos em vias de reparo de danos ao DNA<sup>13</sup>, e 260 genes relacionados a síndromes hereditárias retirados de painéis comerciais e revisado na literatura (PubMed

(<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>) e no banco de dados *Genetics Home Reference* (<https://medlineplus.gov/genetics/>) (Anexo 1).

#### 4.6. Anotação das variantes

A anotação das variantes germinativas foi realizada através do ANNOVAR<sup>62</sup>, que nos permite acessar informações como o tipo de variante, possíveis impactos biológicos, patogenicidade através de *scores*, além de acessar informações em bancos de dados doença-específicos (ClinVar<sup>63</sup>) e em bancos de dados populacionais (ABraOM<sup>64</sup> e gnomAD<sup>65</sup>).

Após a anotação, todas as variantes foram submetidas a um *pipeline*, desenvolvido no ambiente R, pelo nosso grupo de pesquisa para o estudo do PRONON (Figura 2), para selecionarmos aquelas que passariam para a priorização manual.

Foram consideradas as variantes com *Minor Allele Frequency* (MAF) <1% nos dois bancos de dados populacionais, ABraOM<sup>64</sup> e gnomAD<sup>65</sup>. Nos casos em que identificamos consanguinidade, também foram analisadas as variantes com MAF ≥ 1% em homozigose. Variantes classificadas como provavelmente patogênicas (classe 4) ou patogênicas (classe 5) de acordo com o ClinVar<sup>63</sup> ou InterVar<sup>66</sup>, bem como aquelas que levam à perda de função, assim como as consideradas de significado clínico desconhecido (VUS) foram diretamente para a próxima fase de classificação, a priorização manual.

#### 4.7. Priorização manual

A última etapa de análise contou com a inspeção manual das variantes por dois investigadores (EIP, orientadora e ASP, doutoranda). Essa fase incluiu avaliação das variantes através da revisão da literatura e dos parâmetros avaliados anteriormente no *pipeline* utilizado. Para a priorização manual, foram utilizados os critérios estabelecidos pela ACMG-AMP<sup>25</sup>.

Os parâmetros de dados populacionais foram novamente avaliados para determinar se as variantes possuem características benigna ou patogênica através da consulta aos bancos populacionais ABraOM<sup>64</sup> e gnomAD<sup>65</sup>. Para variantes consideradas benignas são marcados os parâmetros de frequência alélica alta (BA1/BS1 – *Strong*) ou com frequência de população controle inconsistente com a penetrância da doença (BS2 – *Strong*). Para aquelas consideradas com característica patogênica, são marcados os parâmetros de ausência em banco de dados populacionais (PM2 – *Moderate*) ou uma prevalência em indivíduos afetados muito maior do que em indivíduos controles (PS4 – *Strong*)<sup>25</sup>.

Para a checagem dos parâmetros de predições *in silico*, utilizamos as ferramentas *Rare Exome Variant Ensemble Learner* (REVEL – *threshold score*: 0.700)<sup>67</sup>, o *Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity* (M-CAP – *threshold score*: 0.025)<sup>68</sup> e o *Combined Annotation Dependent Depletion* (CADD – *threshold score*: 25) para variantes do tipo *missense*; e o *Human Splicing Finder* (HSF)<sup>69</sup> para variantes modificadoras de sítio de *splicing*. Adicionalmente, as ferramentas *Eigen* (*threshold score*: 0.700)<sup>4</sup> e *GenoCanyon* (*threshold score*: 0.700)<sup>5</sup> foram utilizadas como complementares nos casos em que não havia consenso entre as demais. Com essas ferramentas pudemos assinalar os parâmetros BP4, BP1, ou BP7 (todas *Supporting*) para as variantes consideradas benignas, ou o parâmetro PP3 (*supporting*), para variantes consideradas patogênicas<sup>25</sup>.

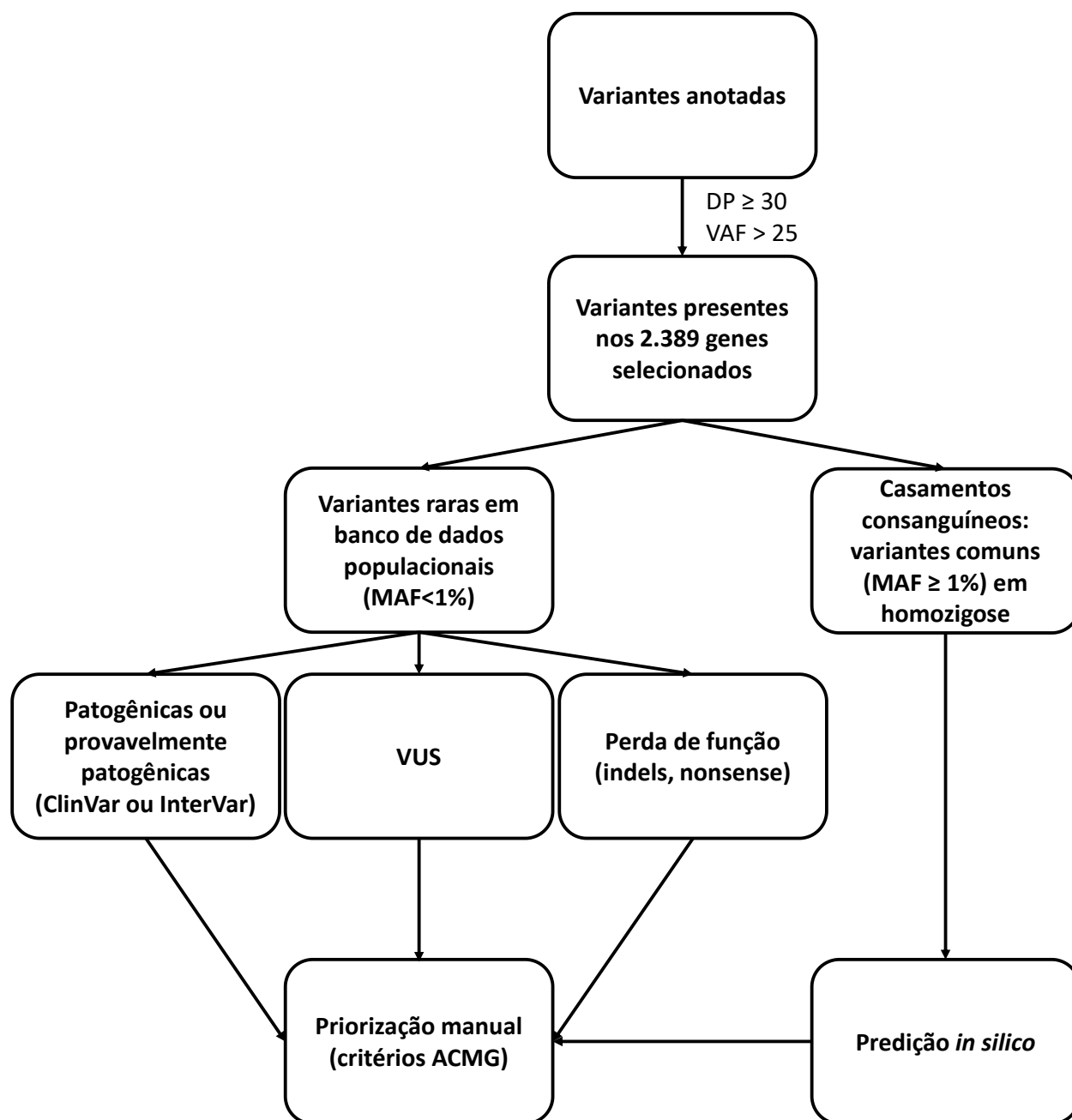
A busca na literatura para que pudéssemos avaliar dados funcionais das variantes foi realizada através do banco de dados PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov>), e consulta de informações e da classificação depositadas no Clinvar<sup>63</sup>. Dessa forma pudemos avaliar os parâmetros BS3 (*Strong*) para variantes consideradas benignas e PP3 associado com patogenicidade. De forma adicional a literatura científica foi criteriosamente revisada em busca de evidência adicionais que nos levassem a pontuar critérios adicionais tais como PM1, PM5, PS1,<sup>25</sup>. Em alguns casos, ainda pudemos checar na literatura dados de segregação das variantes (quando descritas em artigos), sendo considerados os parâmetros BS4 (*Strong – Benigna*) para variantes que não segregam e PP1 (*Supporting – Patogênica*) para variantes que segregam e estão relacionadas à doença<sup>25</sup>.

Alguns parâmetros como casos de variante *De novo* e segregação na família dos pacientes participantes do estudo não puderam ser avaliados, visto que não tínhamos acesso a dados referentes aos familiares. Adicionalmente, não conseguimos avaliar parâmetros que levavam em consideração associação do gene com a doença, ou grande número de variantes em um gene associado à doença, uma vez que grande parte das variantes foram identificadas em genes ainda não associados à doença ou pouco estudados.

Os parâmetros de classificação das variantes germinativas foram checados e assinalados de acordo com os critérios preconizados pela ACMG, e as variantes reclassificadas com o auxílio das ferramentas VarSome<sup>6</sup> e Franklin (<https://franklin.genoox.com>, Franklin by Genoox).

Por fim, para a remoção de artefatos, que representam falsos-positivos, as variantes consideradas provavelmente patogênicas ou patogênicas (P/PP) foram verificadas, através de

seu arquivo BAM original, no *Integrative Genomics Viewer (IGV)*<sup>7, 70</sup>. Para todas as análises citadas foram considerados os transcritos canônicos, verificados no *Matched Annotation from NCBI and EMBL-EBI (MANE Select)*<sup>71</sup>.



**Figura 2.** Fluxograma de análise *in silico* para a seleção de variantes germinativas. DP: Depth Coverage; VAF: Variant Allele fraction; MAF: Minor Allele Frequency; ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics; VUS: Variant of Uncertain Significance.

#### 4.8. Confirmação da presença das variantes germinativas por Sequenciamento de Sanger

Todas as variantes germinativas classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas foram confirmadas por sequenciamento de Sanger. Para que fosse realizada a reação de sequenciamento, foram adicionados a um microtubo 50ng de DNA do paciente, *primers* específicos (Tabela 1) da região contendo a variante de interesse, o *buffer* de sequenciamento, *BigDye™ Terminator* (Applied Biosystems, #4337455) e água ultrapura para um volume final de 10 µL de solução. A reação foi colocada em um termociclador, com o programa de 10 segundos a 96°C, 5 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C, por 30 ciclos. Em seguida, foi realizada a purificação da reação de sequenciamento com o *BigDye XTerminator™ Purification Kit* (Applied Biosystems, #4376486), na qual foram adicionadas à placa a solução de *XTerminator™* e a *SAM solution™*. A placa foi mantida em agitação por 30 minutos e, em seguida, levada à plataforma de sequenciamento. A plataforma utilizada foi a *3500 Series Genetic Analyzer* (Applied Biosystem). Todas as análises dos produtos sequenciados foram realizadas com o auxílio dos programas ApE – *A plasmid Editor* v2.0.52 (Wayne Davis, *University of Utah*) e *Vector NTI 10.3.0* (Invitrogen).

**Tabela 1.** Sequências de primers utilizados para a amplificação e o sequenciamento das regiões para a confirmação da presença de variantes consideradas patogênicas.

Gene	Variante – mudança no cDNA (HGVS)	Sequência de <i>primers</i> 5' – 3'
<i>BRIP1</i>	c.2119C>T	<i>Forward:</i> TGCCGTAGTCACATTGGCTT
		<i>Reverse:</i> GAAGACTGTGAGATGATGGC
<i>CHEK2</i>	c.349A>G	<i>Forward:</i> ATTCAACAGCCCTCTGATGC
		<i>Reverse:</i> TGACCAAATTACCAGCTCTCC
<i>CTC1</i>	c.322C>T	<i>Forward:</i> AGTAGGCTTGGACCTGGCTT
		<i>Reverse:</i> GCCTTGATCCTTGGACACCA
<i>DACH1</i>	c.235_241del	<i>Forward:</i> AATCTCCACGTCTGCTTCCT
		<i>Reverse:</i> TTGAGTACACGGGTTTCCC
<i>LRP1B</i>	c.2395C>T	<i>Forward:</i> CACCTCCTAGAAAGAACGTGA
		<i>Reverse:</i> TAGTCTTCAGAAAGAGCCCGA
<i>MRE11</i>	c.1516G>T	<i>Forward:</i> TGAAACATTTTGGCAGCAGG
		<i>Reverse:</i> CCTAGACCTATGGACTGACT
<i>MSH6</i>	c.1109T>C	<i>Forward:</i> GAATGGCTTAAGGAGGAAAAGAGA
		<i>Reverse:</i> GCCTTGATCCTTGGACACCA
<i>MUTYH</i>	c.452A>G	<i>Forward:</i> TACTTTGGGGTGGGTGTAGA
		<i>Reverse:</i> CCTGATTGGAGTGCAAGACTC
<i>PPM1D</i>	c.1438dupA	<i>Forward:</i> CATAGATTTGTTGAGTTCTGG
		<i>Reverse:</i> TGAGCACCCTACTTTCGACT

SAV1	c.278T>A	Forward: GACTGACATTTTGATTTTGGGG
		Reverse: GGCCGCTTTCTCTGACCAT
SH2B3	c.1183G>A	Forward: CCCAGGACATAAGGTAGCCC
		Reverse: TTCAGCAAAGGGCAGTAGGG
SMAD3	c.1117C>T	Forward: CTTGCTTTATCCAGGAGGGG
		Reverse: CCTCTCTCTGATCTTTGGTC
TINF2	c.1202dupA	Forward: TTGGATTGCTACATGGACCC
		Reverse: CCTCCTTCACATCAAGGCAG

HGVS = Human Genome Variation Society

#### 4.9. Sequenciamento completo do exoma (WES) somático

Para aqueles pacientes que possuíam material tumoral criopreservado armazenado no Biobanco do Hospital de Amor<sup>72</sup> (ID's 1342, ID 1634 e ID 2318) ainda foi realizado o WES somático. O DNA foi extraído de forma automatizada pela plataforma *QIAsymphony* (Qiagen), utilizando o *QIAsymphony DSP DNA Mini Kit* (Qiagen, #937236) e o sequenciamento completo do exoma foi realizado de maneira terceirizada pela SOPHiA GENETICS™, como descrito no item 4.3.

#### 4.10. Análise de variantes somáticas

As leituras das sequências pareadas foram alinhadas contra a construção de referência do genoma humano GRCh37 (hs37d5-decoy) usando BWA-MEM com o Burrows–Wheeler Aligner versão 0.7.10-r7893917 e as variantes germinativas foram excluídas da análise. O pré-processamento dos dados do NGS seguiu um *workflow* de melhores práticas que é amplamente utilizado<sup>73</sup>. Para identificar potenciais mutações *drivers* em tumores, aplicamos análise do *Cancer Genome Interpreter* (CGI)<sup>74</sup>. Resumidamente, o CGI anota potenciais mutações *drivers* detectadas em tumores, identificando variantes tumorigênicas conhecidas e classificando variantes de significado clínico incerto por meio do algoritmo OncodriveMUT. Após a classificação CGI, mantivemos variantes classificadas como tumorigênicas e variantes previstas como Tier1 (que possuem papel relevante na tumorigênese) ou Tier2 (que possuem fortes indícios de papel relevante na tumorigênese). Portanto, mutações previstas como neutras ou *passengers* para oncogênese, e encontradas em sequências de DNA fora das regiões codificantes, não foram consideradas para análise posterior. As mutações candidatas foram validadas visualmente usando o IGV<sup>70</sup>.

#### 4.11. Análise de perda de heterozigose para a variante c.1516G>T, presente em *MRE11*

Para avaliação da perda de heterozigose (LoH, do inglês: *Loss of Heterozygosity*), foi extraído material tumoral fixado em formalina e embebido em parafina, com o auxílio do *DNeasy® Blood & Tissue Kit* (Qiagen, #69506), de acordo com as recomendações do fabricante.

O ensaio foi realizado em parceria com o A.C. Camargo Cancer Center, por sequenciamento de nova geração, utilizando a Ion Torrent Proton Platform. Para o sequenciamento foram utilizados dois pares de *primers* para a região, descritos na Tabela 2. A análise dos dados foi realizada no software *Torrent Suite* 5.10.1, e a variante de interesse foi inspecionada manualmente, utilizando o IGV. Consideramos LoH do alelo selvagem quando o alelo variante tinha uma frequência superior a 60%.

**Tabela 2.** Sequência de *primers* utilizados para avaliação da perda de heterozigose da variante c.1516G>T (E506\*) em *MRE11*

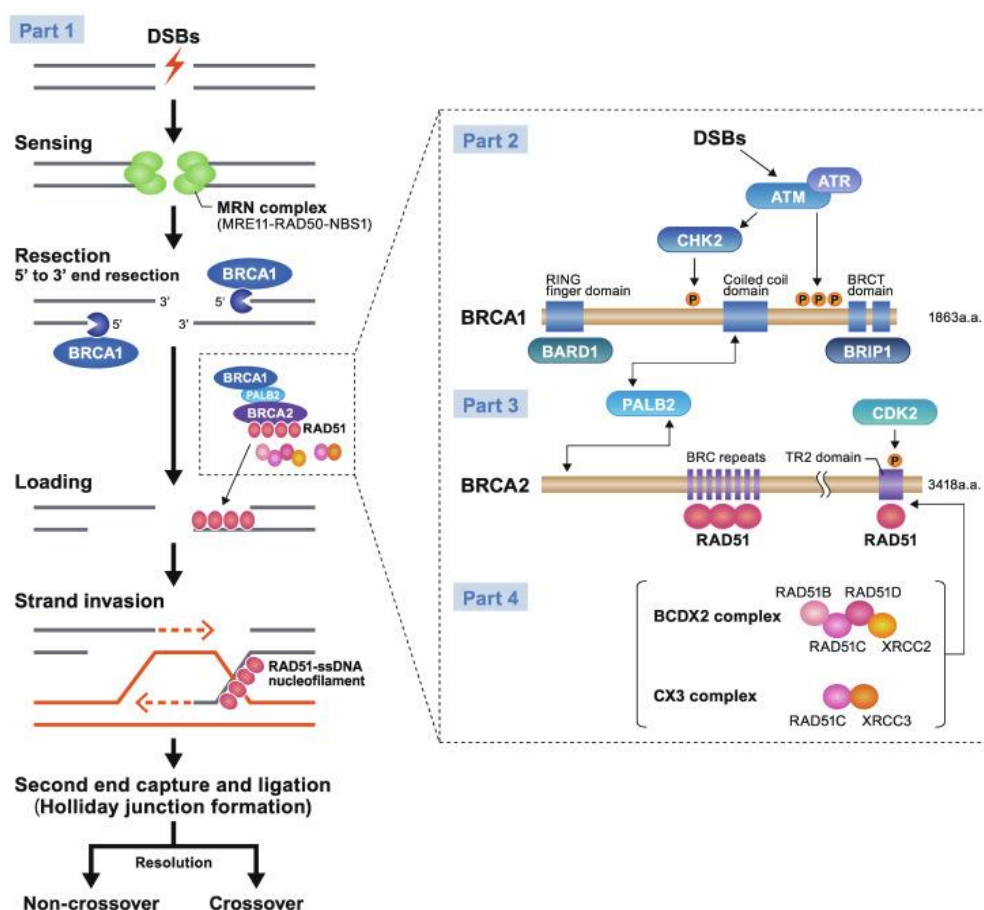
Par de <i>primer</i>	Sequências de <i>primers</i> 5' – 3'
MRE11_ E506* - <i>Primer</i> 1	<i>Forward</i> : GCATTTCTTAATTGTAGCCCCTTGT
	<i>Reverse</i> : ACCTCACGGACTTCATCATCTT
MRE11_ E506* - <i>Primer</i> 2	<i>Forward</i> : GGAATAGGCAACATGTTTGTGA
	<i>Reverse</i> : CACAAGAATTTGCAGCAGAATAA

#### 4.12. Seleção de variantes para ensaios funcionais

A partir dos dados obtidos pelas análises de bioinformática, selecionamos, entre as variantes identificadas e consideradas P/PP, aquelas presentes nos genes *BRIP1* (c.2119C>T – p.Arg707Cys – R707C), *MRE11* (c.1516G>T – p.Glu506Ter – E506\*) e *MSH6* (c.1109T>C – p.Leu370Ser – L370S) para realização dos ensaios funcionais. Adicionalmente selecionamos duas variantes presentes em *FAN1* (c.80C>T – p.Ser27Phe – S27F; e c.1772G>A – p.(Arg591Gln – R591Q), classificadas como VUS.

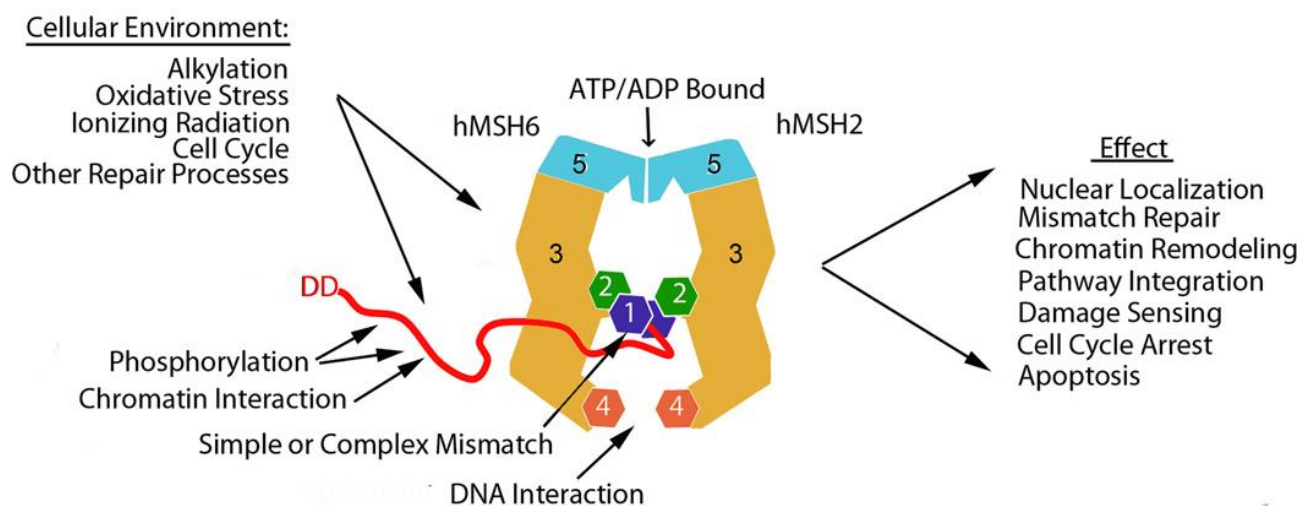
A escolha dessas variantes foi baseada no somatório das informações obtidas nas predições *in silico* realizadas na Etapa I do projeto, bem como nas análises da localização das variantes e na relevância do gene no contexto das síndromes de predisposição hereditária ao câncer. Nesse cenário, *BRIP1* é um gene relacionado à Anemia de Fanconi (AF) (OMIM #609054), sem associação bem estabelecida ao câncer de mama, no entanto, a presença de variantes germinativas nesse gene confere um risco aumentado para o desenvolvimento do câncer de ovário<sup>75-78</sup> e, conseqüentemente, está no espectro da HBOC. Diante disso, pacientes/famílias com variantes germinativas nesse gene possuem manejo bem estabelecido<sup>57, 79</sup>. Por fim, *BRIP1* faz parte da via de reparo ao DNA por RH, formando um complexo heterodimérico com *BRCA1* através de dois domínios BRCT na região C-terminal de *BRCA1* (Figura 3)<sup>80</sup>. De forma semelhante, a variante no gene *MRE11* se torna interessante por também estar envolvido nessa via de reparos ao DNA, já que sua proteína se liga às proteínas

RAD50 e NBS1, formando o complexo MRN (Figura 3)<sup>80</sup>. Adicionalmente, *MRE11* é associado a síndromes como a *Ataxia-Telangiectasia-Like Disorder 1* (OMIM #604391)<sup>81</sup> e *Nijmegen Breakage Syndrome-Like Disorder* (OMIM #251260)<sup>82</sup>.



**Figura 3.** Via de reparo de danos de quebra de dupla fita do DNA (DSBs) por recombinação homóloga e representação de moléculas-chave (complexo MRN, ATM, CHEK2, BRCA1, PALB2, BARD1, BRIP1, BRCA2, RAD51, RAD51C e RAD51D). Figura retirada de YAMAMOTO *et al.* (2021)<sup>80</sup>.

Com relação à variante presente em *MSH6*, devemos considerar que variantes germinativas neste gene predisõem à Síndrome de Lynch (SL), ressaltando que ainda não há um consenso sobre a presença do câncer de mama no espectro de tumores dessa síndrome hereditária (SH). Além disso, a proteína *MSH6* forma um heterodímero com *MSH2* (Figura 4)<sup>83</sup>, desempenhando um papel importante na via de reparo de danos ao DNA por *mismatch repair* (MMR). Isso faz com que nosso interesse em seu impacto biológico seja maior.

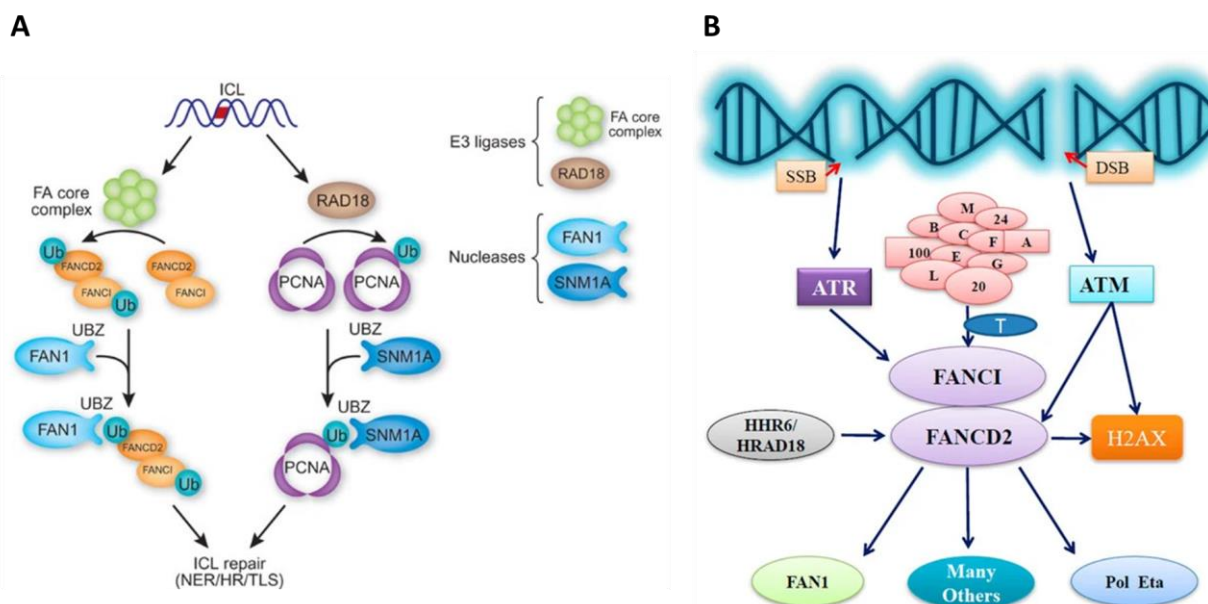


**Figura 4.** hMutS $\alpha$  (complexo formado pelo heterodímero MSH2-MSH6) na configuração de ligação ao DNA. Também estão listadas as influências ambientais e seus efeitos no hMutS $\alpha$ . Figura retirada de EDELBROCK *et al.* (2013)<sup>83</sup>.

Além das variantes classificadas como P/PP por ferramentas de predição *in silico*, também selecionamos duas variantes classificadas como VUS para a realização dos ensaios funcionais. Assim como *BRIP1*, *FAN1* é relacionado à AF<sup>84-86</sup> e atua no reparo de danos de ligações cruzadas interfilamentares (ICL, do inglês: *interstrand cross-link*) do DNA (Figura 5). A proteína pode ser recrutada por FANCD2–FANCI para o local do dano, e *FAN1* pode atuar nas incisões e/ou etapas de excisão subsequentes durante o reparo de ICL. Também pode haver um processo com participação de múltiplas vias de reparo de DNA, incluindo RH<sup>87</sup>. Além disso, *FAN1* também pode estar envolvido em etapas posteriores deste modelo, como excisão de DNA e RH<sup>88</sup> (Figura 5). Já foi demonstrado que, quando não está atuando na via da AF, *FAN1* possui um papel importante na manutenção do genoma e a inibição da sua função em tumores deficientes em BRCA podem levar à letalidade celular<sup>89</sup>. Os estudos em relação à associação desse gene à predisposição hereditária para o câncer são escassos. Por fim, a variante c.149T>G, que já foi associada ao risco aumentado para o câncer colorretal<sup>90</sup>, também foi identificada em outros estudos do nosso grupo, que sequenciaram o exoma de mulheres com câncer de mama<sup>21</sup> com alto risco para HBOC e famílias com câncer colorretal familiar do tipo X<sup>91</sup>. Diante disso, é interessante que possamos caracterizar funcionalmente as variantes identificadas em *FAN1*, e classificadas como VUS, para que possamos auxiliar em uma classificação definitiva quanto a sua patogenicidade.

Também foram selecionadas uma variante sabidamente patogênica para cada um dos genes, como um controle positivo para os ensaios. As VPs selecionada para os genes de

interesse foram *BRIP1* c.139C>G (p.Pro47Ala – P47A), *MRE11* c.1726C>T (p.Arg576Ter – R576\*) e *MSH6* c.1444C>T (p.Arg482Ter – R482\*). Para *FAN1*, selecionamos uma combinação de variantes, c.130-131TG>GC + c.139-140TG>GC (p.Cys44Ala + p.Cys47Ala – C44/47A), que é uma variante sintética descrita anteriormente por abolir a atividade nucleásica de *FAN1* através da perda da interação com *FANCD2*<sup>85, 92</sup>.



**Figura 5.** Papel de *FAN1* em vias de reparo. **A** – Reparo de DNA *interstrand cross-link* (ICL) regulado pela via de Anemia Fanconi (AF). Figura retirada de HUANG; ANDREA<sup>87</sup>. **B** – Atuação da proteína *FANCD2* e seus ligantes sob condições de estresse. Figura retirada de NEPAL *et al.*<sup>88</sup>. UBZ = *ubiquitin-binding zinc finger*; NER = *nucleotide excision repair*; HR = *homologous recombination*; TLS = *translesion synthesis*; SSB = *single strand break*; DSB = *double strand break*.

#### 4.13. Linhagens celulares estabelecidas

Para os ensaios funcionais, em colaboração com a *Queen's University of Belfast*, utilizamos as linhagens KTMBE (epitelial de mama masculina), estabelecida pelo grupo de pesquisa do Dr. Nick Orr, e MCF10AneoT (derivada da MCF10A – epitelial de mama feminina). A última possui uma modificação com o oncogene T24 Ha-Ras, que a torna pré-maligna<sup>93</sup>. Adicionalmente, utilizamos as linhagens T-47D (HTB 133™) e OVCAR-3 (HTB-161™), presentes no acervo do Banco de Células do Hospital de Câncer de Barretos, para os ensaios realizados nesta instituição.

A linhagem T-47D foi utilizada para os ensaios envolvendo as variantes presentes em *BRIP1*, *MRE11*, *MSH6* e *FAN1*. A OVCAR-3, se trata de uma linhagem de ovário, no entanto, foi selecionada visto que as variantes identificadas em *FAN1* foram analisadas em um projeto

paralelo que buscava avaliar outras variantes presentes no mesmo gene, identificadas em famílias do espectro de HBOC.

Por fim, para o ensaio de análise de reparo de danos por RH, foi utilizada a linhagem T-47D-pDRGFP, estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa. Essa linhagem é derivada da linhagem T-47D, que foi modificada para expressar, constitutivamente, o plasmídeo pDRGFP (Addgene, #26475), o qual possui duas cópias em *tandem* do gene *Green Fluorescent Protein* (GFP)<sup>94</sup>. Para garantir que a linhagem continue expressando o plasmídeo, a cada três passagens celulares é realizada a pressão seletiva com a adição de puromicina na concentração de 3µg/mL.

Essas linhagens foram mantidas em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup>, em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, nas condições descritas na Tabela 3. Ao atingirem confluência, as células são dissociadas com o auxílio de uma solução de tripsina (0,05%/EDTA 0,53 mM- *TripLE Express, Life Technologies*) e, novamente, cultivadas nas condições descritas na Tabela 3 para a realização dos ensaios funcionais. Adicionalmente, as linhagens são submetidas ao teste de detecção de micoplasma e confirmação da sua autenticidade a partir da análise de *Short Tandem Repeat* (STR), de acordo com a *International Reference Standard for Authentication of Human Cell Lines*, usando um painel de 9 *loci* STR<sup>95</sup>.

**Tabela 3.** Principais características das linhagens celulares selecionadas para os ensaios funcionais de variantes.

<b>Linhagem</b>	<b>Tecido</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Meio</b>
<b>KTMBE (masculina)</b>	Glândula mamária	Epitelial	DMEM/F12 suplementado com 10% de SBF e 1% de P/E
<b>MCF10AneoT (feminina)</b>	Glândula mamária	Epitelial pré-maligna (derivada da linhagem celular MCF10A transformada com o oncogene T24 Ha-Ras <sup>93</sup> )	DMEM/F12 suplementado com 10% de SBF e 1% de P/E
<b>T-47D (HTB 133™) (feminina)</b>	Glândula mamária (sítio metastático)	Epitelial	DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de P/E
<b>T-47D-pDRGFP (feminina)</b>	Glândula mamária (sítio metastático)	Epitelial (derivada da linhagem T-47D, expressando, constitutivamente, o plasmídeo pDRGFP (que possui duas cópias em tandem de GFP <sup>94</sup> ))	DMEM suplementado com 10% de SBF e 1% de P/E
<b>OVCAR-3 (HTB-161™) (feminina)</b>	Ovário	Epitelial	RPMI-1640 suplementado com 20% de SBF e 1% de P/E.

SBF: Soro bovino fetal; P/E: Penicilina e Estreptomicina.

#### **4.14. Edição gênica e ensaios funcionais para variantes identificadas em homens diagnosticados com câncer de mama e consideradas patogênicas/provavelmente patogênicas por predições *in silico***

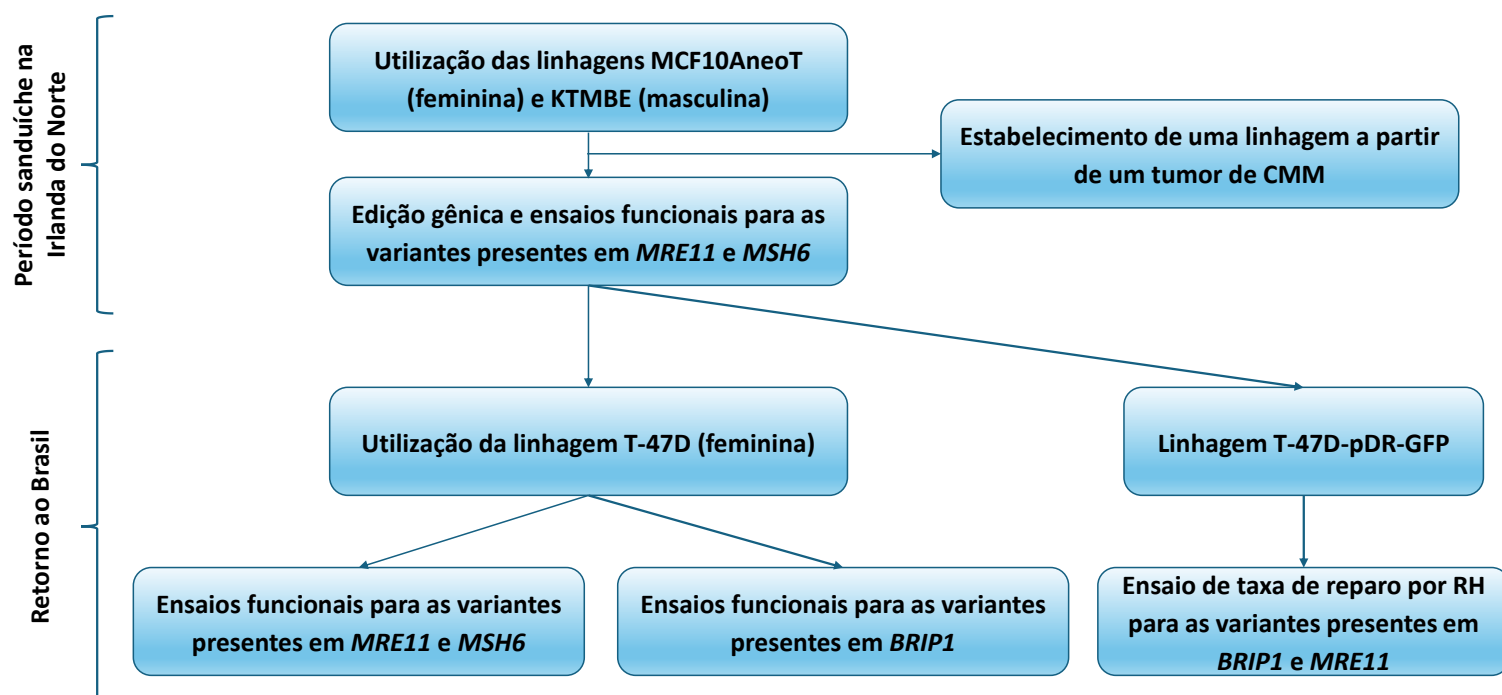
Durante o período de doutorado, obtivemos a aprovação do projeto “Estabelecimento e caracterização de um modelo de câncer de mama masculino *in vitro* para a avaliação do impacto biológico e terapêutico de variantes germinativas patogênicas identificadas por *whole exome sequencing* (WES)” (401066/2022-3) na Chamada CNPq Nº 26/2021 - Apoio à Pesquisa Científica, Tecnológica e de Inovação: Bolsas no Exterior. Dentro deste projeto, contamos com o período de doutorado sanduíche (200476/2022-0), onde foram realizadas análises para as variantes presentes nos genes *MRE11* e *MSH6*.

O projeto concedido contou com uma parceria estabelecida com um grupo de pesquisa coordenado pelo Dr. Nick Orr, na *Queen’s University of Belfast*, na Irlanda do Norte, Reino Unido. Essa parceria se deu devido a inexistência de linhagens comerciais de câncer de mama masculino<sup>96, 97</sup>, somada à expertise do grupo no estabelecimento de linhagens primárias. O principal objetivo era estabelecer e caracterizar linhagens primárias de câncer de mama masculino para determinar o impacto biológico das variantes selecionadas nos genes *MRE11* e *MSH6* projeto. O grupo de pesquisa possui experiência no protocolo de estabelecimento e de caracterização de linhagens primárias, assim como em análises funcionais em linhagens editadas geneticamente.

Inicialmente, o doutorado sanduíche foi proposto para o período de um ano, no entanto foram aprovados, em caráter especial, apenas 6 meses. Por isso, adaptamos o projeto ao tempo concedido. A principal mudança foi relacionada ao estabelecimento de culturas primárias para a realização dos ensaios funcionais. Elaboramos um novo plano de trabalho (Figura 6) no qual optamos por tentar o estabelecimento de culturas primárias em paralelo à realização dos ensaios funcionais. No entanto, durante o período do doutorado sanduíche, contamos apenas com uma coleta de biópsia tumoral, que entrou em senescência, após o processamento e não passou pelo processo de imortalização. Diante disso, não foi possível o estabelecimento de linhagens primárias, a partir de tumores de mama masculina, uma vez que vários fatores influenciam essa abordagem como: i) diagnóstico de um caso de câncer de mama masculina (tumor raro); ii) necessidade de cirurgia (disponibilidade de amostra); iii) além do aceite do paciente para doação da amostra; iv) tempo de bolsa concedido que inviabilizaria a execução. Sendo assim, todos os ensaios funcionais foram realizados em

linhagens estabelecidas epiteliais de mama masculina (KTMBE) e feminina (MCF10AneoT), que são utilizadas pelo grupo do Dr. Nick Orr.

Os ensaios para avaliação da funcionalidade das variantes em *BRIP1* foram realizados após o período de doutorado sanduíche e, portanto, para as análises, utilizamos a linhagem T-47D, que faz parte do acervo do Banco de Células do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos. Adicionalmente, alguns ensaios para as variantes presentes em *MRE11* e *MSH6*, executados após o período de doutorado sanduíche, também foram realizados na linhagem T-47D pela impossibilidade de trazer amostras das linhagens MCF10AneoT e KTMBE. Por fim, a linhagem modificada T-47D-pDR-GFP foi utilizada para o ensaio que avaliou a taxa de reparo por RH, através da restauração da fluorescência, para as variantes presentes em *MRE11* e *BRIP1*.



**Figura 6.** Fluxograma de trabalho após o replanejamento do projeto para adequação ao tempo de bolsa concedido no exterior.

#### 4.14.1. Edição Gênica: silenciamento dos genes *MRE11* e *MSH6* através do sistema CRISPR/Cas9

O silenciamento foi realizado com o auxílio de um sistema composto pelo plasmídeo eSpCas9-2A-Puro (PX459) V2.0 (Genscript), que é resistente à ampicilina e puromicina, e contém o sistema CRISPR/Cas9. Esse plasmídeo possui uma versão da sequência que codifica a proteína *Cas9* com um *enhancer* modificado, com o intuito de diminuir os efeitos *off-target*.

Para o aumento da eficiência do sistema *knockout*, obtivemos 2 plasmídeos comerciais diferentes, construídos com RNA-guias (gRNAs) específicos, para cada gene-alvo (Tabela 4).

Foram plaqueadas  $4 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  células por poço para as linhagens MCF10AneoT e KTMBE, respectivamente, em uma placa de 6 poços. A transfecção foi realizada concomitante ao plaqueamento, com o auxílio da *Lipofectamine™* 3000 (Invitrogen, #L3000001), conforme orientações do fabricante. A seleção dos clones *knockout* foi realizada com o antibiótico puromicina, já que os plasmídeos possuem uma sequência de resistência a esse antibiótico, até que o poço com células não transfectadas (controle) não tivesse mais células viáveis. Para a linhagem MCF10AneoT foi utilizada a concentração de 0,75 µg/mL e para a linhagem KTMBE 0,5 µg/mL.

**Tabela 4.** RNA-guias (gRNA) para o sistema *CRISPR/Cas9* utilizados para os genes-alvo.

Gene	gRNA	Sequência alvo do gRNA
<i>MRE11</i>	MRE11 CRISPR Guia RNA 2	GTTGCAACAGATATTCATCT
	MRE11 CRISPR Guia RNA 4	TTCATGAAAATAAGCCCTCA
<i>MSH6</i>	MSH6 CRISPR Guia RNA 1	GGAACATTCATCCGCGAGAA
	MSH6 CRISPR Guia RNA 4	GATAGAGTGTTTACTAGACT

gRNA = RNA-guia

#### 4.14.1.1. Confirmação de edição de linhagens por *Western Blot* (WB)

As linhagens celulares foram cultivadas em placas de 6 poços ( $4 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  células para MCF10AneoT e KTMBE, respectivamente) e, depois de 24 horas, coletadas. As células foram lisadas com tampão de lise (10 mM Tris-HCl; pH 7,8; 0,25 M glicose; 6N HCl; 1 mM EDTA) à 4°C, com um tablete de *PhosSTOP™* (Roche, #4906845001) e um tablete de *cComplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche, #11836170001) para extração de proteínas. Os sobrenadantes foram coletados, e a concentração total de proteínas mensurada pelo ensaio de *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, #5000006), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras contendo as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e não redutoras (SDS-PAGE), e as proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose (*Hybond-C™ Extra, Amersham Biosciences*). Ao fim da transferência, a membrana foi corada com uma solução à 0,1% de *Ponceau S* (Sigma, #P3504) e 5% de ácido acético para conferência da efetividade da transferência. A membrana foi lavada com uma

solução TBS-T (Trizma® base 200mM; NaCl 1.4M) e bloqueada com 5% de leite em pó diluído em TBS-T por uma hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com os anticorpos primários *MSH6 (D60G2) XP® Rabbit* (Cell Signaling, #5424) e *MRE11 (31H4) Rabbit* (Cell Signaling, #4847), em uma solução de 5% de leite em TBS-T, ambos diluídos na concentração de 1:1000. Por fim, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase, em 5% de leite em pó diluído em TBS-T, por 1 hora à temperatura ambiente, na concentração de 1:5000. A reação foi revelada por quimiluminescência ECL (GE), detectada pelo *ImageQuant™ 800* (Cytiva Life Sciences) e as bandas quantificadas por densitometria utilizando o software ImageJ (*National Institutes of Health – NIH*).

#### 4.14.1.2. Confirmação de edição dos genes *MRE11* e *MSH6*, nas linhagens MCF10AneoT e KTMBE, por sequenciamento de Sanger

Para confirmar a edição gênica nas linhagens MCF10AneoT e KTMBE, foi realizado o sequenciamento de Sanger das regiões alvo do gRNA para o sistema CRISPR/*Cas9*. Dessa forma, poderíamos confirmar se as linhagens haviam sofrido uma deleção no local da sequência alvo. Para isso, extraímos o DNA das linhagens parentais, e dos clones selecionados, após a técnica de silenciamento para cada um dos genes. As linhagens foram semeadas em placas de cultura celular de 60 mm até que elas atingissem confluência de, aproximadamente, 80%, e a extração do DNA foi realizada com o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, #69504), de acordo com as recomendações do fabricante. As regiões foram amplificadas por uma reação de PCR, utilizando os primers descritos na Tabela 5 em uma concentração de 10 µM, e a *AmpliTaq Gold™360 Master Mix* (Applied Biosystems, #4398876), seguindo as recomendações do fabricante. Após a amplificação, o sequenciamento foi realizado de maneira terceirizada pela empresa Eurofins Genomics, utilizando o *Mix2Seq Kit*. Nos tubos contendo os *barcodes* foram adicionados 10 µL da amostra em uma concentração de 10 ng/µL e 10µL dos primers para sequenciamento (Tabela 5) em uma concentração de 5 µM.

**Tabela 5.** Sequências de primers utilizados para amplificação e sequenciamento das regiões alvo do RNA-guia presente no sistema CRISPR/*Cas9*.

Região de Sequenciamento	Sequência de <i>primers</i> para PCR convencional e sequenciamento de Sanger
<i>MRE11</i> CRISPR RNA-guia 2	<i>Forward</i> : GGGCCTGGGTTACATGAGTT
	<i>Reverse</i> : CGAATAGACACTGCCACAGG

<b>MRE11 CRISPR RNA-guia 4</b>	<i>Forward:</i> GATCACCTTGTGTGGCCTGA
	<i>Reverse:</i> GGAAGGCAAACAGTTGTGTG
<b>MSH6 CRISPR RNA-guia 1</b>	<i>Forward:</i> CATGCCTTTTTCCTGCCATCA
	<i>Reverse:</i> TTCACAACTGCCACCCCTTG
<b>MSH6 CRISPR RNA-guia 4</b>	<i>Forward:</i> CTCCCTCATTACAGGCTG
	<i>Reverse:</i> CTATCATGAGCTACACATATTG

#### 4.14.2. Edição gênica: Construção de vetores e inserção das variantes através de mutagênese sítio-dirigida em *BRIP1*, *MRE11* e *MSH6*

Para os ensaios envolvendo o gene *BRIP1*, foram utilizados os vetores comerciais pcDNA3-myc-his-BACH1-WT (Addgene, #17642), para a condição WT e para a inserção da variante de interesse, e pCDNA3-myc-his-BACH1-P47A (Addgene, #17644), como controle positivo (variante patogênica), uma vez que essa variante é associada à perda de função da proteína resultante<sup>98</sup>.

Para a construção dos vetores de expressão com os genes *MRE11* e *MSH6*, suas sequências foram obtidas e subclonadas no vetor pcDNA™3.1 (Invitrogen, #V790-20). Para isso, contamos com o auxílio de enzimas de restrição para a remoção das sequências gênicas dos plasmídeos comerciais pICE-HA-MRE11-WT (Addgene, #82033) e pFB1\_hMSH6 (Addgene, #129424). De forma semelhante, pcDNA™3.1 foi linearizado com as mesmas enzimas, através dos procedimentos descritos nos subitens a seguir.

##### 4.14.2.1. Subclonagem das sequências gênicas de *MRE11* e *MSH6* em pcDNA™3.1

###### 4.14.2.1.1. Obtenção da sequência de *MRE11* e linearização de pcDNA™3.1

O plasmídeo pcDNA™3.1 não possui sítios de restrição na mesma ordem das enzimas presentes nas regiões 5' e 3' da sequência de *MRE11* (inserto), para que a ligação ocorra na posição correta de leitura (5'>3'). Portanto, para sua linearização, bem como a obtenção da sequência de *MRE11*, contamos com o auxílio a enzima *Klenow Fragment* (Thermo Scientific), que possui atividade de polimerase 5'>3' e atividade de exonuclease 3'>5', para a realização das técnicas. Dessa forma, uma das extremidades, tanto da sequência de *MRE11*, quanto de pcDNA™3.1, ficariam “cegas”, e a outra extremidade, que possui sítio de restrição para a mesma enzima no vetor e no inserto, ficariam coesivas, e facilitariam a ligação na posição correta. Adicionalmente, para a linearização do vetor pcDNA™3.1 utilizamos as enzimas *XhoI* e *NotI*. Para a obtenção da sequência do gene *MRE11*, utilizamos as enzimas *NotI* (New England BioLabs) (sítio de restrição na porção 5' de *MRE11* no plasmídeo pICE-HA-MRE11-WT)

e *KpnI* (Thermo Fisher Scientific) (sítio de restrição na porção 3' de *MRE11* no plasmídeo pICE-HA-MRE11-WT).

Em um microtubo foram adicionados 5 µg de DNA do plasmídeo pICE-HA-MRE11-WT, 3 µL do buffer da enzima, 0,5 µL da enzima *KpnI* e H<sub>2</sub>O ultrapura para completar um volume final de 30 µL. Em outro microtubo, foram adicionados 5 µg de DNA do plasmídeo pcDNA™3.1, 3 µL do buffer da enzima, 0,5 µL da enzima *XhoI* e H<sub>2</sub>O ultrapura para completar um volume final de 30 µL. As reações foram incubadas por, no mínimo, 1 hora a 37°C e, posteriormente, purificadas através do *kit ReliaPrep™ DNA Clean-up and Concentration System* (Promega, #A2891), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida, utilizamos 10 µL das reações purificadas, 3 µL do buffer da enzima, 1 µL da enzima *Klenow*, 1 µL de dNTP e H<sub>2</sub>O ultrapura para completar os volumes finais de 30 µL. As reações foram incubadas por 15 minutos a 30°C. Novamente, as reações foram purificadas. Em outros microtubos, foram adicionados 10 µL das reações purificadas, 3 µL do buffer da enzima, 0,5 µL da enzima *NotI* e H<sub>2</sub>O ultrapura para completar os volumes finais de 30 µL. As reações foram incubadas por, no mínimo, 1 hora a 37°C. A reação com pcDNA™3.1 foi purificada. A reação com o plasmídeo pICE-HA-MRE11-WT foi aplicada em um gel a 1% de agarose, e passou por eletroforese. Assim obtivemos bandas de diferentes tamanhos, sequência do MRE11 e restante da sequência do plasmídeo, advindos da digestão. A banda com o tamanho de fragmento da sequência de *MRE11* foi retirada do gel, com o auxílio de um bisturi. O fragmento no gel foi purificado através do *kit ReliaPrep™ DNA Clean-up and Concentration System* (Promega, #A2891), de acordo com as recomendações do fabricante. Em seguida foi realizada a ligação do vetor com o inserto.

#### **4.14.2.1.2. Obtenção da sequência de *MSH6* e linearização de pcDNA™3.1**

Para obtenção da sequência de *MSH6*, foram utilizadas as enzimas *BamHI* (Thermo Fisher Scientific) (sítio de restrição na porção 5' de *MSH6* no plasmídeo pFB1\_hMSH6) e *XhoI* (Thermo Fisher Scientific) (sítio de restrição na porção 3' de *MSH6* no plasmídeo pFB1\_hMSH6). Em um microtubo foram adicionados 5 µg de DNA do plasmídeo pFB1\_hMSH6, 5 µL do buffer *BamHI*, 0,5 µL da enzima *BamHI*, 1 µL da enzima *XhoI* e H<sub>2</sub>O ultrapura para completar um volume final de 50 µL. A reação foi incubada por 1 hora a 37°C e, posteriormente, purificada com o *kit ReliaPrep™ DNA Clean-up and Concentration System* (Promega, #A2891).

Para a linearização de pcDNA™3.1, digerimos 10µg do plasmídeo pcDNA™3.1 com as enzimas *BamHI/XhoI*, como descrito para pFB1\_hMSH6. Ao final da linearização de pcDNA™3.1, para desfosforilação das extremidades 5' e 3' do vetor, adicionamos à reação 1 µL da enzima fosfatase alcalina CIP (New England BioLabs, #M0525S), 7 µL do *CutSmart Buffer* e H<sub>2</sub>O ultrapura para completar um volume final de 70 µL. A reação foi incubada por 4 horas a 37°C e, posteriormente, purificada com o kit *ReliaPrep™ DNA Clean-up and Concentration System* (Promega, #A2891). Esse procedimento foi realizado para que as extremidades, agora com cortes coesivos, não se religassem antes da incorporação da sequência de interesse. Em seguida foi realizada a ligação do vetor com o inserto.

#### **4.14.2.1.3. Ligação de *MRE11* ou *MSH6* com pcDNA™3.1**

As sequências obtidas de *MRE11* e *MSH6* foram ligadas aos seus respectivos vetores linearizados com o auxílio da enzima T4 DNA ligase (New England BioLabs). Foram utilizados 10 µL de inserto, 1,5 µL de T4 DNA ligase, 1,5 µL do *buffer* específico da enzima, 1 µL do vetor linearizado e 1 µL de H<sub>2</sub>O (volume final de 15 µL). As reações foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente.

#### **4.14.2.1.4. Transformação das ligações de pcDNA3-MSH6/pcDNA3-MRE11 em bactérias**

Os produtos das ligações dos insertos com o vetor foram transformados em bactérias competentes NEB® 5-alpha *E. coli* (New England BioLabs, #C2987). Em 70 µL de bactéria foram acrescentados 7 µL de produto da ligação, que foram incubados por 30 minutos em gelo e submetidos a choque térmico, por 30 segundos a 42°C e 2 minutos em gelo. Foram acrescentados 1mL de *SOC Outgrowth Medium* (New England BioLabs, #B9035) e incubados por 1 hora a 37°C e 200 rpm, para recuperação da membrana. As bactérias contendo os plasmídeos foram cultivadas em meio ágar para seleção com ampicilina na concentração de 0,1 mg/mL por cerca de 16 horas. Posteriormente, as colônias selecionadas foram cultivadas em meio *LB Broth* (Sigma, #L3522) líquido com 0,1 mg/mL de ampicilina por aproximadamente 16 horas, a 37°C e 200 rpm. A extração do DNA plasmidial foi realizada com o *NucleoSpin Plasmid, Mini Kit* (Macherey-Nagel, USA), de acordo com as recomendações do fabricante.

A sequência gênica foi confirmada, em primeiro momento, através de um *screening* realizado a partir de uma digestão, com enzimas de restrição. A partir do padrão de bandas gerado foi possível identificarmos se ocorreu a ligação de pcDNA™3.1 com as sequências de *MRE11* e *MSH6* na posição correta de transcrição ou, ainda, se o vetor se fechou sem a ligação. Para o *screening* dos clones pcDNA3-MSH6 utilizamos a enzima *HindIII* (Thermo Fisher

Scientific) e para os clones pcDNA3-MRE11, utilizamos a enzima *BamHI* (Thermo Fisher Scientific). Clones que apresentaram a condição desejada para cada gene foram selecionados para a realização da mutagênese sítio-dirigida.

#### **4.14.2.2. Inserção das variantes nas sequências de *BRIP1*, *MRE11* e *MSH6*, por mutagênese sítio-dirigida**

As variantes selecionadas foram introduzidas na sequência de pcDNA3-myc-his-BACH1-WT, pcDNA3-MRE11 ou pcDNA3-MSH6 através da técnica de mutagênese sítio-dirigida, adaptada a partir do método utilizado pelos kits QuickChange™ (Agilent). Para isso, utilizamos as construções pcDNA3-MRE11-WT e pcDNA3-MSH6-WT. Foi realizada a técnica de mutagênese sítio-dirigida com primers que contêm a sequência gênica modificada na posição da variante de interesse (Tabela 6), com o auxílio da enzima PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Takara, #R045A), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram adicionados 10 µL de PrimeSTAR®, 0,5 µL de cada um dos primers (*forward* e *reverse*) na concentração de 10 µM, 50 ng de DNA do plasmídeo (pcDNA3-myc-his-BACH1-WT, pcDNA3-MRE11 ou pcDNA3-MSH6) e H<sub>2</sub>O para um volume final de 20 µL de reação. As reações para as variantes em *MRE11* e *MSH6* foram incubadas no termociclador com a programação de 98°C por 5 segundos; 30 ciclos de 98°C por 10 segundos, 55°C por 5 segundos e 72°C por 10 segundos; 72°C por 50 segundos. Para a inserção da variante em *BRIP1* realizamos um ajuste no protocolo e a reação foi incubada no termociclador com a programação de 98°C por 10 segundos; 30 ciclos de 98°C por 10 segundos, 55°C por 15 segundos e 72°C por 1 minuto; 72°C por 1 minuto.

Após a reação de mutagênese sítio-dirigida, as amostras foram digeridas com a enzima *DpnI*, para que a fita molde fosse degradada. Para isso, foram adicionados 18 µL da amostra, 3 µL do *buffer* CutSmart® (New England BioLabs), 0,5 µL da enzima *DpnI* (New England BioLabs) e 8,5 µL de H<sub>2</sub>O MilliQ (para um volume final de 30 µL). A reação foi incubada a 37°C, *overnight* e, em seguida, purificada com o *kit ReliaPrep™ DNA Clean-up and Concentration System* (Promega, #A2891) e transformada em bactérias como descrito no item 4.14.2.1.4. A confirmação da inserção das variantes foi realizada por sequenciamento de Sanger, como descrito no item 4.8.

**Tabela 6.** Sequências de *primers* utilizados na técnica de inserção de variantes por mutagênese sítio-dirigida.

Variante	Sequência de <i>primers</i> 5' – 3'*
<b><i>BRIP1</i> c.2119C&gt;T (R707C)</b>	Forward: TATTAGAAAAATTTAAAAGAATGTTGGCTCTC
	Reverse: TAAACCAGTAGAGAGCCAACATTCTTTTAAT
<b><i>MRE11</i> c.1561G&gt;T (E506*)</b>	Forward: AGGAGGTACGTCGTTTCAGATAAACCAGACA
	Reverse: AGTATTTTTTTGTCTGGTTTATCTGAAACGA
<b><i>MRE11</i> c.1726C&gt;T (R576*)</b>	Forward: GAAGAGGCCGAGGAAGAGGTTGAAGAGGTGG
	Reverse: CTGCCCTCTCCACCTCTTCAACCTCTTCT
<b><i>MSH6</i> c.1444C&gt;T (R482*)</b>	Forward: AGAAGGGCTATAAAGTAGCATGAGTGGAACA
	Reverse: AGTCTCAGTCTGTTCCACTCATGCTACTTTA
<b><i>MSH6</i> c.1109T&gt;C (L370S)</b>	Forward: TGTTTGGTATCATGAAACTTCAGAATGGCTT
	Reverse: TTTCTCCTTAAGCCATTCTGAAGTTTCATG

\*Em amarelo estão as bases de substituição, na posição correta, para a inserção das variantes

Ao fim da realização da mutagênese sítio-dirigida, obtivemos as construções pcDNA3-myc-his-BACH1-WT, pcDNA3-myc-his-BACH1-R707C, pcDNA3-myc-his-BACH1-P47A, pcDNA3-MRE11-WT, pcDNA3-MRE11-E506\*, pcDNA3-MRE11-R576\*, pcDNA3-MSH6-WT, pcDNA3-MSH6-L370S e pcDNA3-MSH6-R482\*. As construções foram utilizadas nos ensaios funcionais para a avaliação do impacto de cada uma delas na funcionalidade das proteínas avaliadas.

#### 4.14.3. Ensaios Funcionais

Uma vez que as edições gênicas das linhagens MCF10AneoT e KTMBE, tanto para *MRE11*, quanto para *MSH6*, realizadas na *Queen's University of Belfast*, não foram satisfatórias, e considerando a ausência de tempo hábil para o ajuste e repetição da técnica, decidimos mudar a estratégia para que o impacto das variantes selecionadas pudesse ser avaliado. Assim, analisamos o impacto das variantes para cada gene em dois ensaios com tratamentos específicos que influenciam na funcionalidade das proteínas em cada uma das vias. Para os ensaios, foram utilizadas as linhagens sem edição com a superexpressão das construções com as sequências gênicas WT, com as variantes de interesse ou com as variantes sabidamente patogênicas. Para os ensaios que envolviam dano ao DNA, utilizamos a irradiação para avaliação do impacto da presença de variantes em *MRE11*, já que esse agente causa um dano de dupla fita, permitindo avaliar a funcionalidade de *MRE11* na via de reparo de danos ao DNA por RH. Já para os ensaios onde analisamos o impacto das variantes presentes em *MSH6*, utilizamos a cisplatina como fármaco indutor de dano. Ela inibe a síntese de DNA através de ligação covalentes com as porções nucleofílicas, principalmente da

guanina, causando danos estruturais e, conseqüentemente, ativando a via em que a proteína MSH6 está relacionada, a via de MMR.

Para os ensaios realizados no Hospital de Câncer de Barretos, também superexpressamos os vetores na linhagem T-47D e T-47D-pDRGFP para a avaliação do impacto das variantes de interesse. De forma semelhante a *MRE11*, para os ensaios de avaliação de dano ao DNA na presença de variantes em BRIP1, utilizamos a irradiação como agente causador de dano, já que esse gene também está envolvido na via de reparo de danos ao DNA por RH.

#### 4.14.3.1. Ensaio clonogênico

A propriedade de inibir a formação de colônias foi avaliada nas linhagens T-47D, para o gene *BRIP1* WT ou na presença de variantes, e nas linhagens MCF10AneoT e KTMBE, para os genes *MRE11* e *MSH6* WT, ou na presença de variantes. As linhagens, T-47D e MCF10AneoT foram plaqueadas em uma densidade de  $4 \times 10^5$  células por poço, enquanto para KTMBE a densidade foi de  $3 \times 10^5$  células por poço. As células foram transfectadas com 2,5µg de DNA das construções BRIP1 WT, BRIP1 R707C, BRIP1 P47A, MRE11 WT, MRE11 E506\*, MRE11 R576\*, MSH6 WT, MSH6 L370S ou MSH6 R482\* e incubadas por 24 horas.

Para as condições transfectadas com as construções de *BRIP1* e *MRE11*, foram utilizadas 6 placas de 6 poços para a realização do ensaio. Em cada placa foram distribuídas 500 células por poço de cada construção (WT ou com variantes avaliadas), em duplicata. As placas foram incubadas por 24 horas. Uma das placas permaneceu sem irradiação (UT, do inglês *untreated* – controle sem tratamento) e as demais foram irradiadas com 1Gy, 2Gy, 4Gy, 6Gy ou 8Gy. Utilizamos os irradiadores *MultiRad 160* (PRECISION X-Ray), para os ensaios que avaliaram *MRE11*, e o RS-2000 (Rad Source Technologies), para os ensaios que avaliaram *BRIP1*.

As condições transfectadas com as construções de *MSH6*, foram distribuídas, em 6 placas de 6 poços, cada condição em duplicata, nas seguintes proporções: 2 placas com 200 células por poço; 2 placas com 500 células por poço; e 2 placas com 1000 células por poço de com cada construção. As placas foram incubadas por 24 horas e tratadas com cisplatina nas condições descritas na Tabela 7. Vale ressaltar que as concentrações utilizadas para o tratamento da linhagem KTMBE são menores em relação às concentrações utilizadas para MCF10AneoT por se tratar de uma linhagem mais sensível a drogas.

Todas as placas foram mantidas em estufa umidificada, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> até que pudéssemos observar as colônias formadas na condição UT – 7 dias após o agente indutor de dano (irradiação ou cisplatina) para as linhagens MCF10AneoT e KTMBE, e 8 dias após o agente indutor de dano (irradiação) para a linhagem T-47D. Após esse tempo, as células foram fixadas com metanol resfriado e coradas com uma solução de 0,5% de cristal violeta (Sigma) e 10% de metanol, diluídos em uma tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate-buffered saline*), por 20 minutos. Por fim, as placas das linhagens MCF10AneoT e KTMBE foram escaneadas com o auxílio do *GelCount™* (Oxford Optronix) e a contagem de colônias foi realizada com o auxílio do *software* ImageJ (NIH). Para a análise das condições transfectadas com as construções de *MSH6*, foi realizada uma proporção entre o número de colônias para o número de células plaqueadas. Para as placas da linhagem T-47D, as imagens foram obtidas pelo microscópio estereoscópio Olympus SZX7 (Olympus Life Science) e analisadas pelo software *OpenCFU*<sup>99</sup>.

**Tabela 7.** Tratamento com cisplatina para condições transfectadas com as construções de *MSH6* no ensaio clonogênico.

Número de células por poço	Tratamento para a linhagem MCF10AneoT	Tratamento para a linhagem KTMBE
200	UT e 0,5 µM de cisplatina	UT e 0,1 µM de cisplatina
500	1 e 1,5 µM de cisplatina	0,5 e 1 µM de cisplatina
1000	2 e 5 µM de cisplatina	1,5 e 2 µM de cisplatina

Legenda: UT = sem tratamento (do inglês: *untreated*)

#### 4.14.3.2. Análise de capacidade de reparo de danos (histona fosforilada 2A.X) e expressão de RAD51, BRIP1 e BRCA1 na presença de variantes em *BRIP1* por *Western Blot* (WB)

Para avaliar as condições sob indução de dano ao DNA para as variantes presentes em *BRIP1*, analisamos a expressão das proteínas Histona fosforilada 2A.X (p-H2A.X, do inglês *phospho-Histone 2A.X*) e RAD51 por WB, uma vez que os anticorpos disponíveis no laboratório não permitiam essa análise, concomitantemente, por imunofluorescência. Adicionalmente, avaliamos a expressão de BRCA1, uma das proteínas que interagem com BRIP1, e a expressão de BRIP1. A linhagem T-47D foi plaqueada em uma densidade de 4x10<sup>5</sup> células/poço e foram transfectadas 2,5 µg de DNA plasmidial para cada condição (BRIP1 WT ou com variantes), com *Lipofectamine™* 3000 (Invitrogen, #L3000001), conforme orientações do fabricante. Cada

condição de células transfectadas foram divididas em 4 poços e as placas foram incubadas por 24 horas. As células foram irradiadas com 2Gy e as proteínas coletadas 1, 4 e 24 horas após a irradiação (também coletamos uma condição sem irradiação denominada UT).

As células foram lisadas com auxílio do tampão de lise (10 mM Tris-HCl; pH 7,8; 0,25 M glicose; 6N HCl; 1 mM EDTA) resfriado, com adição de inibidores de protease. Os sobrenadantes foram coletados, e a concentração total de proteínas mensurada pelo ensaio de Bradford<sup>100</sup> (Sigma, #B6916), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras contendo as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes e não redutoras (SDS-PAGE), e as proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose (*Hybond-C™ Extra, Amersham Biosciences*). Ao fim da transferência, a membrana foi corada com uma solução à 0,1% de *Ponceau S* (Sigma, #P3504) e 5% de ácido acético para conferência da efetividade da transferência. A membrana foi lavada com uma solução TBS-T (Trizma®base 200mM; NaCl 1.4M; 1% TWEEN® 20) e bloqueada com 5% de leite em pó diluído em TBS-T por uma hora em temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com os anticorpos primários *Phospho-Histone H2A.X (Ser139)* (Cell Signaling Technology, #2577), *RAD51 (D4B10) Rabbit mAb* (Cell Signaling Technology, #8875), *Anti-BRCA1 (Ab-1) Mouse mAb* (MS110) (Millipore, #OP92) e *BRIP1/FANCI Antibody* (Cell Signaling, #4578), e o endógeno *Laminin B1 Antibody* (Cell Signaling Technology, #9087), diluídos em uma solução de 5% de albumina de soro bovino (BSA, do inglês: *bovine serum albumin*), todos na concentração 1:1000. Por fim, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, em 5% de leite em pó diluído em TBS-T, por 1 hora à temperatura ambiente. Os anticorpos secundários utilizados foram o *anti-rabbit IgG, HRP linked antibody* (Cell Signaling, #7074) ou *anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody* (Cell Signaling, #7076), ambos concentrados 1:5000, de acordo com o anticorpo primário. A reação de quimioluminescência foi revelada pelo *SignalFire™ ECL Reagent* (Cell Signaling, #6883), detectada pelo *ImageQuant LAS 4000 mini* (GE) e as bandas quantificadas por densitometria utilizando o software *ImageJ* (*National Institutes of Health – NIH*).

Para a avaliação da expressão das proteínas, todas foram normalizadas pela proteína endógena Laminina B1. Para as análises estatísticas da atividade de RAD51 e p-H2A.X, consideramos a condição UT como sendo 100% (=1) e calculamos as taxas relativas da demais condições de tratamento (1, 4 e 24 horas após a irradiação).

#### 4.14.3.3. Análise de capacidade de reparo de danos (fosfo-Histona H2A.X) e número de *foci* (RAD51) na presença de variantes em *MRE11* por imunofluorescência

Uma das variantes selecionadas para os ensaios funcionais está presente em *MRE11*, um gene presente na via de reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga. Diante disso, avaliamos a capacidade de reparo de danos nas condições *MRE11* WT ou na presença da variante de interesse (*MRE11* E506\*) e, ainda de uma variante sabidamente patogênica (*MRE11* R576\*).

Em uma placa de 6 poços, foram colocadas 4 lamínulas por poço e plaqueadas  $4 \times 10^5$  e  $3 \times 10^5$  células por poço para as linhagens MCF10AneoT e KTMBE, respectivamente, transfectadas com as diferentes condições (*MRE11* WT, E506\* ou R576\*). Foram transfectadas 2,5 $\mu$ g de DNA por poço, o auxílio da *Lipofectamine*<sup>™</sup> 3000 (Invitrogen, #L3000001), conforme orientações do fabricante. As placas foram incubadas por 24 horas, uma das lamínulas de cada condição (WT, E506\* e R576\*) foi retirada e considerada a condição UT e as placas foram irradiadas com 2Gy, utilizando o MultiRad 160 (PRECISION X-Ray). As outras lamínulas foram retiradas com 1, 4 e 24 horas após a irradiação. As células foram fixadas com uma solução à 4% de paraformaldeído (PFA), por 20 minutos, e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 diluído em PBS por 20 minutos. Foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com 5% de BSA, diluído em H<sub>2</sub>O, por 1 hora. As células foram incubadas com os anticorpos primários *Anti-phospho-Histone H2A.X* (Ser139) clone JBW301 (Millipore) em uma concentração de 1:1000 e Anti-RAD51 (H-92) (Santa Cruz Biotechnology, #sc-8349) em uma concentração de 1:500 diluídos em uma solução de 5% de BSA, a 4°C, *overnight*. As células foram incubadas nos anticorpos secundários *Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor*<sup>™</sup> *Plus 488* (Thermo Fisher Scientific, #A32731) para a marcação de p-H2A.X, e *Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor*<sup>™</sup> *Plus 594* (Thermo Fisher Scientific, #A32742) para a marcação de RAD51, à temperatura ambiente, por 1 hora. As lamínulas foram montadas em lâminas com o auxílio do ProLong<sup>™</sup> Glass Antifade Mountant with NucBlue<sup>™</sup> (Invitrogen, #P36983). As imagens foram adquiridas com o microscópio invertido ECLIPSE Ti (Nikon®) e o software NIS-Elements (Nikon), utilizando os canais DAPI, TXRED e FITC. Foi calculada a proporção de número de *foci* por 50 células e mensurada a fluorescência para marcação de permanência de dano (p-H2A.X). Para as análises estatísticas, consideramos a condição UT como sendo 100% (=1) e calculamos as taxas relativas da demais condições de tratamento (1, 4 e 24 horas após a irradiação).

#### 4.14.3.4. Análise de capacidade de reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga (RH) através de restauração de fluorescência

A taxa de reparo de danos ao DNA por RH nas condições com *MRE11* WT, ou com variantes, foi avaliada através de um sistema de restauração de fluorescência. Para isso, utilizamos uma linhagem estabelecida pelo nosso grupo de pesquisa, a T-47D-pDRGFP. Essa linhagem é derivada da linhagem comercial T-47D e expressa, constitutivamente, o plasmídeo pDRGFP (Addgene, #26475), que possui duas cópias em tandem do gene *Green Fluorescent Protein* (GFP)<sup>94</sup>. Uma das cópias, *SceGFP*, é inativa, uma vez que possui um stop códon dentro do sítio de clivagem (I-SceI) do vetor de expressão que será utilizado, o pCBASceI (Addgene, #26477). A outra cópia, *iGFP*, é truncada nas duas extremidades. Quando a clivagem de *SceGFP* é feita por I-SceI, *iGFP* é utilizada pela recombinação homóloga como *template* para restaurar o marco de leitura da GFP<sup>94</sup>. Por isso, apenas na presença do reparo por recombinação homóloga ambas as cópias truncadas da GFP formarão uma única cópia do gene funcional.

Para a realização do ensaio, foram eletroporadas  $5 \times 10^5$  células para cada uma das condições em cubetas de 4 mm com 100  $\mu$ L de meio OPTIMEM contendo 20  $\mu$ g de cada vetor (pCI-neo\_mCherry, pCBASceI e pcDNA3-MRE11/pcDNA3-myc-his-BACH1 com cada uma das variantes de interesse). As células foram eletroporadas, com o auxílio do *Gene Pulser Xcell™ Eletroporation System* (Bio-Rad), em pulso único de 120V, com a capacitância de 960 $\mu$ F por 10ms. Após a eletroporação, as células foram recuperadas em 2 mL de meio nas condições de cultivo em um poço de placas de 6 poços. As placas foram incubadas por 72 horas e analisadas por citometria de fluxo utilizando o *FACSMelody™* (BD Biosciences). Foram analisados 20.000 eventos no *gate* da população viável de *singlets* para os canais FITC (GFP) e PE-CY594 (mCherry). O cálculo utilizado para determinar a eficiência da edição foi a razão de células GFP+/mCherry+<sup>101, 102</sup>. Após a normalização das taxas de transfecção, as taxas de reparo foram relativizadas em relação às condições “sem reparo” (sem a transfecção do vetor pCBASceI). Cada uma das condições “sem reparo” (controles) receberam o valor de 1 e as taxas onde há reparo (transfectadas com o plasmídeo pCBASceI) foram calculadas relativas aos seus respectivos controles.

#### 4.14.3.5. Análise da capacidade de formação do heterodímero MSH2-MSH6 por imunoprecipitação

A fim de avaliar a capacidade da proteína MSH6 formar um heterodímero, ainda que na presença de variantes, foi realizado o ensaio de imunoprecipitação. Foram semeadas  $1 \times 10^6$  células em placas de cultura de 60mm, transfectadas com 5,5  $\mu\text{g}$  de DNA de cada uma das construções para MSH6 (*MSH6* WT, L370S ou R482\*) com *Lipofectamine*<sup>™</sup> 3000 (Invitrogen, #L3000001), conforme orientações do fabricante. As placas foram incubadas por 24 horas, as células foram desagregadas com auxílio da Tripsina, cada uma das condições foi dividida em dois poços de placas diferentes e incubadas por mais 24 horas. Uma placa contendo cada uma das condições foi tratada com cisplatina para que houvesse indução do dano ao DNA. Foi utilizada a concentração de 10  $\mu\text{M}$  para as condições transfectadas na linhagem MCF10AneoT e 5  $\mu\text{M}$  para as condições transfectadas na linhagem KTMBE. As células foram lisadas com o tampão NP-40 (50 mM TRIS-HCL, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA e 1% NP-40) contendo inibidores de protease, incubadas em gelo por 30 minutos e centrifugadas em velocidade máxima (12000 xg) por 20 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e quantificados com o *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad, #5000006), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram preparados 100 $\mu\text{L}$  de amostra em uma concentração de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Para o ensaio de imunoprecipitação, utilizamos *Dynabeads*<sup>™</sup> *protein G* (Invitrogen, #10004D), com algumas modificações das recomendações do fabricante. Brevemente, ressuspendemos as *beads* magnéticas e transferimos 50  $\mu\text{L}$  (1.5 mg) para microtubos. Ressuspendemos as *beads* em 5  $\mu\text{g}$  do anticorpo *Purified mouse Anti-MSH6*, clone 44 (BD Transduction Laboratories<sup>™</sup>, #610919) diluídos em PBS Tween<sup>™</sup> 20 para um volume final de 200  $\mu\text{L}$  para cada condição. A solução foi incubada por 2 horas à temperatura ambiente e, ao fim da incubação, adicionamos as amostras em cada um dos microtubos. O complexo *beads* magnéticas-anticorpo-amostra foi incubado por 1 hora, à temperatura ambiente. Ao final, o complexo de cada uma das condições foi eluído em uma solução contendo 20  $\mu\text{L}$  de *buffer* de eluição (Glicina 50 mM, pH 2,8), 7  $\mu\text{L}$  de *4X Bolt*<sup>™</sup> *LDS Sample Buffer* (Thermo Fisher Scientific, #B0007) e 3  $\mu\text{L}$  de *10X Bolt*<sup>™</sup> *Sample Reducing Agent* (Thermo Fisher Scientific, #B0004). As amostras foram aquecidas a 70°C, por 10 minutos e, imediatamente, aplicadas em um gel para a análise por WB, como descrito no item 4.14.3.2. Para a detecção de MSH2 utilizado no WB, utilizamos o anticorpo MSH2 (D-6) (Santa Cruz Biotechnology, #sc-376384). Adicionalmente, a proteína G pode ser detectada por qualquer anticorpo secundário (anti-IgG), para controle

do funcionamento da reação. A detecção das reações de quimioluminescência foi realizada com o auxílio do *ImageQuant™ 800* (Cytiva Life Sciences) e as bandas quantificadas por densitometria utilizando o software ImageJ (*National Institutes of Health – NIH*).

#### **4.14.3.6. Análise de co-localização de MSH2-MSH6**

Em uma placa de 6 poços, foram colocadas 3 lamínulas por poço e plaqueadas as células da linhagem T-47D, transfectadas com cada uma das construções de *MSH6* (WT ou com as variantes L370S e R482\*). Foram transfectados 5 µg de DNA de cada uma das construções em  $2,5 \times 10^5$  células/poço com o auxílio da *Lipofectamine™ 3000* (Invitrogen, #L3000001). As placas foram incubadas por 24 horas, uma das lamínulas de cada condição (WT, L370S e R482\*) foi retirada (sem tratamento – UT) e as placas foram tratadas com cisplatina, na concentração 10µM. As lamínulas foram retiradas com 1 e 4 horas após o tratamento. As células foram fixadas com PFA (4%) por 20 minutos e permeabilizadas com 0,5% de Triton X-100 diluído em PBS por 20 minutos. Foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com 5% de BSA, diluído em H<sub>2</sub>O, por 1 hora. As células foram incubadas com os anticorpos primários MSH6 (D60G2) XP® Rabbit (Cell Signaling, #5424) e MSH2 (3A2) MOUSE MAB (Cell Signaling, #2850S) ambos em uma concentração de 1:50, diluídos em uma solução de 5% de BSA, a 4°C, *overnight*. As células foram incubadas nos anticorpos secundários Donkey anti-mouse IgG (Alexa flúor® 488 - Abcam, #ab150105), e Donkey anti-rabbit IgG (Alexa flúor® 647 – Abcam, #ab150075), por 1 hora, a temperatura ambiente, em câmara escura. As lamínulas foram montadas em lâminas com o auxílio do ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen, #P36941). As imagens foram adquiridas pelo microscópio confocal Olympus FluoView FV10i (Olympus), utilizando os canais DAPI, TXRED e FITC. As análises foram realizadas com o *software* ImageJ (National Institute of Health, USA). As imagens com a marcação de MSH2 foram processadas para uma melhor visualização, subtraindo 100 pixels de cada. Os *thresholds* de demarcação de área de cálculo foram ajustados com o auxílio do *plug-in* JACoP (disponível em <https://imagej.net/plugins/jacop>), que também auxiliou no cálculo do coeficiente de Pearson<sup>103</sup>. Quando o coeficiente de Pearson é igual ou maior que 0,5, consideramos que há um nível de co-localização.

#### **4.14.3.7. Análise de ciclo celular para MSH6 WT na presença de variantes**

Foram plaqueadas  $1 \times 10^5$  células, eletroporadas com cada uma das condições, MSH6 WT, L370S ou R482\*, em cubetas de 4 mm com meio OPTIMEM contendo 5µg de DNA por poço. As células foram recuperadas com meio de cultivo nas condições de manutenção. Cada

amostra foi dividida em 4 poços, para que pudessem ser avaliadas nas condições tratadas e não tratadas, 24 e 48 horas após o tratamento. Após 6 horas de recuperação, o meio foi trocado com redução de soro (0,5% de SFB), para que houvesse sincronização do ciclo, e as placas foram incubadas *overnight*. Em seguida, realizamos o tratamento com cisplatina 5 $\mu$ M (Supelco, #PHR1624). O ciclo foi avaliado 24 e 48 horas após o tratamento, com o BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit (BD Biosciences, #340242), de acordo com as recomendações do fabricante. Utilizamos a plataforma BD FACSCanto™ II (BD Biosciences) para avaliação das amostras e o *software* ModFit LT™ (Verity Software House) para as análises.

#### **4.15. Edição gênicas e ensaios funcionais para variantes identificadas em homens diagnosticados com câncer de mama e consideradas de significado incerto (VUS) por predições *in silico***

A metodologia para os ensaios envolvendo as variantes presentes em *FAN1* foram diferentes daquelas empregadas para os genes *BRIP1*, *MRE11* e *MSH6*, uma vez que as análises funcionais foram realizadas dentro de um projeto aprovado pela FAPESP. O projeto foi denominado “Avaliação funcional de genes de reparo de danos ao DNA para determinação do seu papel no desenvolvimento e tratamento do câncer de mama hereditário” (processo número 18/25118-8). Neste projeto avaliamos diversas variantes, classificadas como VUS ou não reportadas na literatura, identificadas em genes presente em vias de reparo, dentre elas, as variantes presentes em *FAN1*. Duas das variantes avaliadas nesse gene foram identificadas neste projeto de doutorado e, portanto, a avaliação funcional está presente nesta tese.

##### **4.15.1. Estabelecimento de linhagens celulares *knockout* para *FAN1***

As linhagens OVCAR-3 e T-47D foram transduzidas com partículas lentivirais contendo o vetor MISSION® pLKO.1-puro-CMV-tGFP (Sigma Aldrich, TRCN0000136648), que possui expressão de GFP, e 6 mg/mL do reagente polibrene, de acordo com as recomendações do fabricante. Também foram transduzidas com a partícula contendo o controle de transdução MISSION® pLKO.1-puro Non-Target *shRNA* Control Transduction Particles (Sigma Aldrich, #SHC016V). As células transduzidas foram selecionadas por Puomicina (1  $\mu$ g/mL para OVCAR-3 e 3  $\mu$ g/mL para T47D). Após a seleção e expansão dos clones, foi realizado o *cell sorting* para enriquecimento da população com o BD FACSMelody™ Cell Sorter (BD Biosciences). Foram coletadas 10<sup>3</sup> células GFP positivas (infectadas com o vetor lentiviral), que foram mantidas em condições de cultivo até que atingissem confluência para realização dos ensaios.

#### 4.15.2. Confirmação do silenciamento gênico de *FAN1* por *Western Blot*

As proteínas extraídas dos clones obtidos de OVCAR-3 e T-47D *shFAN1* ou *shSCRAMBLE* (controle) foram quantificadas, avaliadas e reveladas conforme descrito no item 4.14.3.2. Adicionalmente, utilizamos extratos proteicos da linhagem HeLa como controle de detecção de *FAN1* (controle do anticorpo). Para detecção das proteínas *FAN1* e  $\alpha$ -Tubulina, utilizamos os anticorpos primários *anti-FAN1 antibody* (Abcam, #ab95717) e endógeno  $\alpha$ -*Tubulin (DM1A) Mouse mAb* (Cell Signaling, #3873), ambos em concentrados 1:2000. Os anticorpos secundários utilizados foram o *anti-rabbit IgG, HRP linked antibody* (Cell Signaling, #7074) e o *anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody* (Cell Signaling, #7076), respectivamente, ambos em uma concentração de 1:5000. Para a avaliação da expressão das proteínas, todas foram normalizadas pela proteína endógena  $\alpha$ -Tubulina.

#### 4.15.3. Edição gênica: Construção de vetores e inserção das variantes em *FAN1*, através de mutagênese sítio-dirigida

Para a construção das sequências variantes de *FAN1*, utilizamos o vetor pcDNA™5/FRT/TO-GFP-*FAN1* (MRC PPU Reagents and Services, University of Dundee, Dundee, Escócia, #DU19495), na técnica de mutagênese sítio-dirigida, descrita no item 4.14.2. Os primers utilizados na reação estão descritos na Tabela 8, com modificações nas posições específicas de inserção das variantes.

**Tabela 8.** Sequências de *primers* utilizados na técnica de inserção de variantes por mutagênese sítio-dirigida para as variantes em *FAN1*.

Variante	Sequência de primers 5' – 3'
<i>FAN1</i> c.80C>T (S27F)	<i>Forward</i> : CAAGAATAAGAAAAAGCATTTAATTCTATT
	<i>Reverse</i> : AACACGAAATAATAGAATTAATGCTTTTTT
<i>FAN1</i> c.1772G>A (R591Q)	<i>Forward</i> : TCCTAGTTACACCATCAATCAGAAAACCCAC
	<i>Reverse</i> : CTTGGAAGATGTGGGTTTTCTGATTGATGGT
<i>FAN1</i> c.130-131TG>GC (C44A)	<i>Forward</i> : CACCACCTGCTAAACTTGCCGCCCGTTTGC
	<i>Reverse</i> : CCATTTTACTGCAAACGGGGCGGCAAGTTTGC
<i>FAN1</i> c.139-140TG>GC (C47A)	<i>Forward</i> : CTAAACTTGCCGCCCGTTGCCAGTAAAATG
	<i>Reverse</i> : ATCTAGGCACCATTTTACTGGCAACGGGGGCG

\*Em amarelo estão as bases de substituição, na posição correta, para a inserção das variantes

#### **4.15.4. Avaliação da permanência de danos e morte celular na presença de variantes em *FAN1***

Para avaliar as condições sob indução de dano ao DNA, analisamos a expressão da proteína H2A.X na forma fosforilada. As linhagens celulares OVCAR-3 *shFAN1*, T-47D *shFAN1* e seus respectivos controles (OVCAR-3 *shSCRAMBLE* e T47D *shSCRAMBLE*), foram irradiadas com 10Gy e, seus extratos proteicos foram extraídos 2, 4 e 24 horas após a irradiação. Realizamos o WB pra avaliação de expressão proteica conforme descrito no item 4.14.3.2. Os anticorpos primários utilizados foram *Phospho-Histone H2A.X (Ser139)* (Cell Signaling Technology, #2577) na concentração de 1:1000, e  *$\alpha$ -Tubulin (DM1A) Mouse mAb* (Cell Signaling Technology, #3874), concentrado 1:2000. Os anticorpos secundários utilizados foram o *anti-rabbit IgG, HRP linked antibody* (Cell Signaling, #7074) e *anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody* (Cell Signaling, #7076), respectivamente, ambos concentrados 1:5000. Para a avaliação da expressão das proteínas, todas foram normalizadas pela proteína endógena  $\alpha$ -Tubulina.

#### **4.15.5. Ensaio de recuperação de radiosensibilidade (RRS) nas linhagens modificadas pela técnica de *short hairpin RNA***

O ensaio de recuperação de radiosensibilidade foi realizado para verificar se as linhagens celulares eram capazes de formar colônias após a irradiação. Para isso, as linhagens celulares OVCAR-3 *shFAN1*, OVCAR-3 *shSCRAMBLE*, T47D *shFAN1* e T47D *shSCRAMBLE* foram semeadas, em duas placas diferentes, na proporção de 500 células por poço e incubadas por 24 horas. Uma placa com cada condição foi irradiada com 4Gy e a outra permaneceu em condições normais. Ambas as placas foram incubadas até as células formarem colônias visíveis (aproximadamente 14 dias). As células foram fixadas com metanol resfriado e coradas com uma solução de 0,5% de cristal violeta. As diferentes condições foram documentadas com o microscópio estereoscópio Olympus SZX7 (Olympus Life Science) e as colônias analisadas com o software ImageJ (NIH).

#### **4.15.6. Ensaio de proliferação celular para a linhagem OVCAR-3 na presença de variantes em *FAN1***

Devido a observação de um aumento na capacidade clonogênica da linhagem OVCAR-3 *shFAN1* em relação ao controle (*shSCRAMBLE*), realizamos o ensaio de proliferação para essa linhagem, expressando as construções de *FAN1*. Adicionalmente, transfectamos a construção pCI-neo-mCherry, como um controle do ensaio, uma vez que observamos que a

transfecção de um DNA exógenos estava impactando a proliferação celular. O ensaio foi realizado na linhagem celular OVCAR-3, utilizando o kit BrdU Cell Proliferation ELISA (Abcam, #ab1266556). Foram semeadas  $1 \times 10^4$  células/poço em placa de 96 poços e incubadas por 24 horas. Foram transfectados 160 ng de DNA plasmidial por poço para cada condição, em sextuplicata. A placa foi incubada por 24 horas. O reagente BrdU foi adicionado e as demais etapas do ensaio seguiram conforme recomendações do fabricante. A medida de absorbância foi realizada em 450nm, utilizando o leitor de placas Varioskan® Flash (Thermo Fisher Scientific). Foram realizados três experimentos independentes. As médias de cada experimento foram consideradas na análise e o percentual de cada condição foi relativo ao percentual da condição transfectada com a construção pCI-neo-mCherry (considerado 100%).

#### **4.15.7. Análise de reparo de danos ao DNA por Recombinação Homóloga (RH) por Western Blot (WB) na presença de variantes em *FAN1***

A capacidade de reparar danos no DNA por RH foi analisada por WB, uma vez que as linhagens silenciadas com o vetor lentiviral expressam GFP, o que torna inviável a realização do ensaio de reparo de danos por restauração de fluorescência. Foram analisadas as proteínas BRCA1, FAN1, RAD51 e a proteína endógena Laminina B1.

As linhagens *knockdown* OVCAR-3 e T-47D *shFAN1* foram transfectadas com 4 µg de cada construção de FAN1 (WT ou com variantes). Para T-47D *shFAN1* e *shSCRAMBLE*, semeamos  $2,5 \times 10^5$  células/poço, em 2 placas diferentes, incubadas por 24 horas e transfectadas usando o reagente de transfecção de DNA X-tremeGENE™ HP (Roche, #6366236001), de acordo com as recomendações do fabricante. Para OVCAR-3 *shFAN1* e *shSCRAMBLE*, realizamos a transfecção reversa com *Lipofectamine*™ 3000 (Invitrogen, #L3000008), semeando  $5 \times 10^5$  células/poço ao mesmo tempo em que transfectamos os vetores, de acordo com as recomendações do fabricante. Após 24 horas de transfecção, uma das placas com cada condição foi irradiada com 10Gy. As proteínas foram extraídas 2 horas após a irradiação para T-47D e 4 horas após a irradiação para OVCAR-3. Esses tempos foram estabelecidos com base na análise de acúmulo de danos nas linhagens celulares em diferentes momentos, a partir dos resultados do ensaio descrito no item 4.15.4.

O WB foi realizado como descrito no item 4.14.3.2. Os anticorpos primários utilizados foram o anti-FAN1 (Abcam, #ab95717) concentrado 1:2000, anti-BRCA1 (*Ab-1*) *Mouse mAb* (MS110) (Millipore, #OP92), concentrado 1:1000, RAD51 (D4B10) *Rabbit mAb* (Cell Signaling Technology, #8875) concentrado 1:1000, e Laminin B1 (Cell Signaling, #9087), concentrado

1:1000. Os anticorpos secundários utilizados foram o *anti-rabbit IgG, HRP linked antibody* (Cell Signaling, #7074) ou *anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody* (Cell Signaling, #7076), ambos concentrados 1:5000, de acordo com o anticorpo primário.

#### **4.16. Análises Estatísticas**

Os dados obtidos foram analisados como média e erro padrão utilizando o programa *GraphPadPrisma* versão 9.0 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA*). Foram realizados testes de normalidade e, em casos de testes paramétricos as diferenças entre grupos foram analisadas pelo teste ANOVA com pós-teste de Tukey; casos não paramétricos foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis. Consideramos significantes as diferenças estatísticas quando  $p < 0,05$ .

## 5. Resultados

### 5.1. Etapa I – Caracterização da população de estudo, sequenciamento do exoma, análises de variantes

#### 5.1.1. Dados sociodemográficos e clínico-patológicos

As principais características sociodemográficas e histopatológicas dos pacientes estão presentes na Tabela 9. Resumidamente, a mediana de idade ao diagnóstico foi de 55 anos (32 – 78; SD: 12,13), sendo a maior parte dos tumores ductais invasivos (73,3%), com moderado grau de diferenciação (76,7%), e diagnosticados precocemente (73,4% com estadiamento TNM 0, I ou II) (Tabela 9). Em relação aos receptores hormonais, 90% e 76,6% apresentaram receptores positivos para estrógeno e progesterona, respectivamente (Tabela 9). Três pacientes foram diagnosticados com outro tumor primário (vias biliares; gástrico; tireoide), um paciente foi diagnosticado com outros dois tumores primários (próstata e pele) e um paciente foi diagnosticado com outros três tumores primários (gástrico, rim e baço) (Tabelas 9 e 10).

**Tabela 9.** Características sociodemográficas e histopatológicas de homens diagnosticados com câncer de mama.

<b>Etnia (autodeclarada)</b>	<b>Total (%)</b>
Branco	22 (73,4)
Pardo	7 (23,3)
Negro	1 (3,3)
<b>Escolaridade</b>	<b>Total (%)</b>
Analfabeto	1 (3,3)
Ensino fundamental incompleto	14 (46,7)
Ensino fundamental completo	5 (16,7)
Ensino médio incompleto	1 (3,3)
Ensino médio completo	3 (10)
Ensino Superior	5 (16,7)
Não informado	1 (3,3)
<b>Idade ao diagnóstico</b>	<b>Mediana de idade (mínimo – máximo)</b>
	55 (32 – 78; SD: 12,13)
<b>Outro sítio de tumor primário</b>	<b>Total</b>
Baço	1
Gástrico	2
Pele	1
Próstata	1

Rim	1
Tireoide	1
Vias biliares	1
<b>Lado da lesão</b>	<b>Total (%)</b>
Direito	11 (36,7)
Esquerdo	19 (63,3)
<b>Morfologia</b>	<b>Total (%)</b>
<i>In situ</i>	2 (6,7)
Ductal invasivo	22 (73,3)
Papilífero	6 (20,0)
<b>Grau histopatológico</b>	<b>Total (%)</b>
Pouco diferenciado	3 (10)
Moderadamente diferenciado	23 (76,7)
Bem diferenciado	4 (13,3)
<b>Estadiamento TNM*</b>	<b>Total (%)</b>
0	2 (6,7)
I ou II	20 (66,7)
III ou IV	7 (23,3)
Não informado	1 (3,3)
<b>Receptor de estrógeno</b>	<b>Total (%)</b>
Positivo	27 (90)
Negativo	1 (3,3)
Não informado	2 (6,7)
<b>Receptor de progesterona</b>	<b>Total (%)</b>
Positivo	23 (76,6)
Negativo	5 (16,7)
Não informado	2 (6,7)
<b>Status HER2</b>	<b>Total (%)</b>
Positivo	1 (3,3)
Negativo	19 (63,3)
Não informado	10 (33,4)
<b>Subtipo molecular</b>	<b>Total (%)</b>
Luminal A	4 (13,3)
Luminal B	14 (46,7)
Não informado	12 (40,0)
<b>Status do paciente</b>	<b>Total (%)</b>
Vivo em seguimento	25 (83,3)
Óbito	5 (16,7)

---

\*Estadiamento TNM: T é referente ao tamanho e extensão do tumor; N é referente ao número de linfonodos comprometidos ao redor do tumor; e M é referente a presença de metástase.

### **5.1.2. História pessoal e familiar**

A história pessoal e familiar dos pacientes participantes está representada na Tabela 10 e, aqueles com variantes P/PP nos heredogramas, no Anexo 2. Cinco pacientes foram diagnosticados com mais de um tumor primário (IDs 148, 1153, 1757, 2179 e 2318). Cerca de 87% dos homens relataram história familiar de câncer. Treze (43,3% dos pacientes; 50% entre aqueles que relataram história familiar – HF), possuem outros casos de câncer de mama na família, sendo que dois deles possuem outros casos de câncer de mama masculino em familiares de primeiro grau. Também destacamos a presença de tumores de próstata (onze famílias), gástricos (cinco famílias), colorretais (três famílias), tireoide (três famílias) e uterinos (duas famílias) (Tabela 10). Por fim, cinco pacientes (16,6%) possuem história de casamento consanguíneo entre os pais (ID's: 333, 1153, 1439, 1757 e 2349).

**Tabela 10.** História pessoal e familiar de homens diagnosticados com câncer de mama.

ID do paciente	Câncer (idade ao diagnóstico)	História familiar – Tipo tumoral (sexo, idade ao diagnóstico)
1	Mama (42)	Materno: Cólon (F,?) <sup>1</sup> , (F,53) <sup>3</sup> ; Leucemia (M,?) <sup>3</sup> . Paterno: Mama (M,?) <sup>1</sup> ; Próstata (M,?) <sup>3</sup> ; Leucemia (F,?) <sup>3</sup> ; Uterino (F,?) <sup>3</sup>
4	Mama (55)	Mama (F,50) <sup>2</sup> , (F,60) <sup>2</sup> ; Próstata (M,?) <sup>1</sup> ; Garganta (M,60) <sup>3</sup> , (M,?) <sup>3*</sup> ; Outro (F,57; M,?) <sup>3</sup>
67	Mama (51)	Mama (F,44) <sup>3</sup> ; Colón (M,80) <sup>1</sup> , (M,63) <sup>3</sup> ; Garganta (M,>50) <sup>3</sup>
148	Mama, Vias biliares (73, 75)	Sem história familiar
187	Mama (45)	Sem história familiar
<b>333</b>	Mama (47)	Materno: Mama (F,60; F,55) <sup>3</sup> ; Pulmão (F,72) <sup>1</sup> . Paterno: Próstata (M,78) <sup>1</sup>
527	Mama (45)	Próstata (M,60; M,60) <sup>3</sup> , (M,?) <sup>2</sup> ; Tireoide (F,?) <sup>3</sup> ; Coluna cervical (M,?) <sup>3</sup>
<b>1153</b>	Mama, Gástrico (61, 61)	Mama (F, 54) <sup>1</sup> , Intestino (F,65; M,65) <sup>2</sup> , Próstata (M,?) <sup>2</sup> , Boca (M,70) <sup>3</sup> , Osso (M,23) <sup>3</sup> , Leucemia (F,75; F,40; M,60) <sup>3</sup> , Gástrico (F,45) <sup>3</sup>
1342	Mama (64)	Próstata (M,82) <sup>1</sup>
<b>1439</b>	Mama (78)	Mama (F,70) <sup>1</sup> , (F,40; F,<40) <sup>3</sup> ; Fígado (F,48) <sup>1</sup>
1634	Mama (78)	Sem história familiar
<b>1757</b>	Próstata, Mama, Pele (62, 71, 71)	Gástrico (M,?) <sup>1</sup> , Intestino (F,79) <sup>1</sup> , Pele (F,?) <sup>1</sup>
1784	Mama (59)	Melanoma (F,>60) <sup>1</sup>
1918	Mama (50)	Próstata (M,85) <sup>1</sup>
2001	Mama (40)	Mama (F,<50; F,<30) <sup>3</sup> ; Tireoide (M,?) <sup>3</sup> ; Colorretal (F,?) <sup>3</sup>
2104	Mama (49)	Sem história familiar
2170	Mama (58)	Mama (F,38; F,40; F,40; F,55) <sup>3</sup> , (F, 65) <sup>2</sup> ; Pâncreas (M,?; M,?) <sup>1</sup> ; Uterino (F,60) <sup>2</sup> ; Intestino (F,?) <sup>1</sup> , (M,?) <sup>3</sup>
2179	Gástrico, Rim, Baço, Mama (47,55,55, 56)	Mama (M,63; F,66) <sup>2</sup> ; Pulmão (M,?) <sup>1*</sup> ; Outro (M, 70) <sup>2</sup>
2200	Mama (56)	Mama (F,60) <sup>3</sup> ; Boca (M,48) <sup>1*</sup> ; Garganta (M,53) <sup>1*</sup>
2272	Mama (47)	Síndrome mielodisplásica (M,58) <sup>2</sup>
2279	Mama (56)	Mama (F,?; F,?) <sup>3</sup>
2284	Mama (49)	Mama (F,60; F,47) <sup>3</sup> ; Cólon (F,60) <sup>3</sup>
2302	Mama (51)	Materno: Mama (F,>50; F,>50; F,?) <sup>3</sup> ; Colorretal (M,65) <sup>3</sup> ; Garganta (M,59) <sup>3*</sup> . Paterno: Mama (F,>50) <sup>3</sup> ; Próstata (M,95) <sup>3</sup>
2318	Mama, Tireoide (35, ?)	Outro: osso/Sangue (F,?) <sup>1</sup>
2329	Mama (59)	Materno: Perna (M,60) <sup>3</sup> . Paterno: Mama (F,57) <sup>3</sup> ; Próstata (M,55) <sup>1</sup> ; Colo de útero (F,84) <sup>3</sup> ; Próstata (M,60) <sup>3</sup>
2344	Mama (73)	Gástrico (F,56) <sup>1</sup>
<b>2349</b>	Mama (62)	Materno: Mama (F,75) <sup>3</sup> ; Gástrico (M,65) <sup>2</sup> , (M,70) <sup>3</sup> . Paterno: Próstata (M,69) <sup>1</sup>
2353	Mama (74)	Perna (F,55) <sup>1</sup>
2421	Mama (52) <sup>#</sup>	Paterno: Intestino (F,54) <sup>3</sup> . Materno: Outro (F,?; F,?; F,?; F,?) <sup>3</sup>
2554	Mama (32)	Bexiga (F,?) <sup>3</sup>

Legenda: F = Feminino; ? = sem informação; M = Masculino; <sup>1</sup> = Familiar de 1º grau; <sup>2</sup> = Familiar de 2º grau; <sup>3</sup> = Familiar de 3º grau. \*Fumante e/ou alcohólatra. #Paciente com 7 familiares com má formação peniana do lado paterno (1 de segundo grau, 1 de terceiro grau e 5 de quarto grau). Os ID's em negrito são correspondentes aos pacientes com pais com casamento consanguíneo.

### 5.1.3. Identificação de variantes germinativas

Após o sequenciamento do exoma e primeira filtragem pelo *pipeline* desenvolvido pelo grupo de pesquisa, foram descartadas todas as variantes consideradas benignas. Ao final, identificamos 424 variantes em 314 genes diferentes. Essas variantes seguiram para a fase de priorização manual.

Na priorização manual, foram excluídas variantes consideradas provavelmente benignas e benignas, artefatos do sequenciamento (falsos positivos) e variantes duplicadas. Após essa verificação, restaram 271 variantes, sendo que 53 (19,5%) estão presentes em genes que fazem parte de vias de reparo ao DNA e 78 (29%) presentes em genes de predisposição a síndromes hereditárias. Além disso, 13 variantes (4,8%) foram consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas (Tabela 11).

#### 5.1.3.1. Variantes provavelmente patogênicas ou patogênicas germinativas

As variantes consideradas provavelmente patogênicas (PP) ou patogênicas (P) foram 13 variantes, identificadas em 9 pacientes diferentes (30% dos pacientes). Entre elas, 7 (53,8%) são variantes de perda de função (*frameshift*, *nonsense* ou *splicing*) e 6 (46,2%) são *missense*.

Identificamos 4 variantes (em 4 pacientes diferentes) em genes que são relacionados a síndromes hereditárias, sendo eles *BRIP1* (c.2119C>T), *CHEK2* (c.349A>G), *MSH6* (c.1109T>C) e *MUTYH* (c.452A>G), sendo esta última em heterozigose, para um gene de padrão recessivo autossômico (Tabela 11). Quatro variantes P/PP foram identificadas em genes que fazem parte da via de reparo de danos ao DNA, sendo elas *MRE11* (c.1516G>T) (DSB DNA *repair* – DSB-*repair*), e as já mencionadas *BRIP1* (DSB-*repair*), *MSH6* (MMR) e *MUTYH* (*base excision repair* – BER) (Tabela 11).

Entre os pacientes com variantes em genes já associados a SH, o participante portador da variante em *BRIP1*, possui uma HF sugestiva, com outro caso de CMM e uma familiar com CM, além de outro familiar com câncer não especificado (Tabela 10). O participante com a variante em *CHEK2* também possui HF sugestiva para SH e, sua filha, também diagnosticada com CM apresenta a mesma variante (Tabela 10). O portador da variante em *MSH6* não reportou HF de câncer (Tabela 10). O paciente com a variante P/PP em *MRE11* reportou 3 familiares com câncer de próstata, um familiar com câncer de tireoide e um familiar com câncer cervical (Tabela 10). O participante portador da variante em *MUTYH* não reportou HF

sugestiva (apenas um familiar com câncer de bexiga), no entanto foi diagnosticado com CM em idade jovem, 32 anos (Tabela 10).

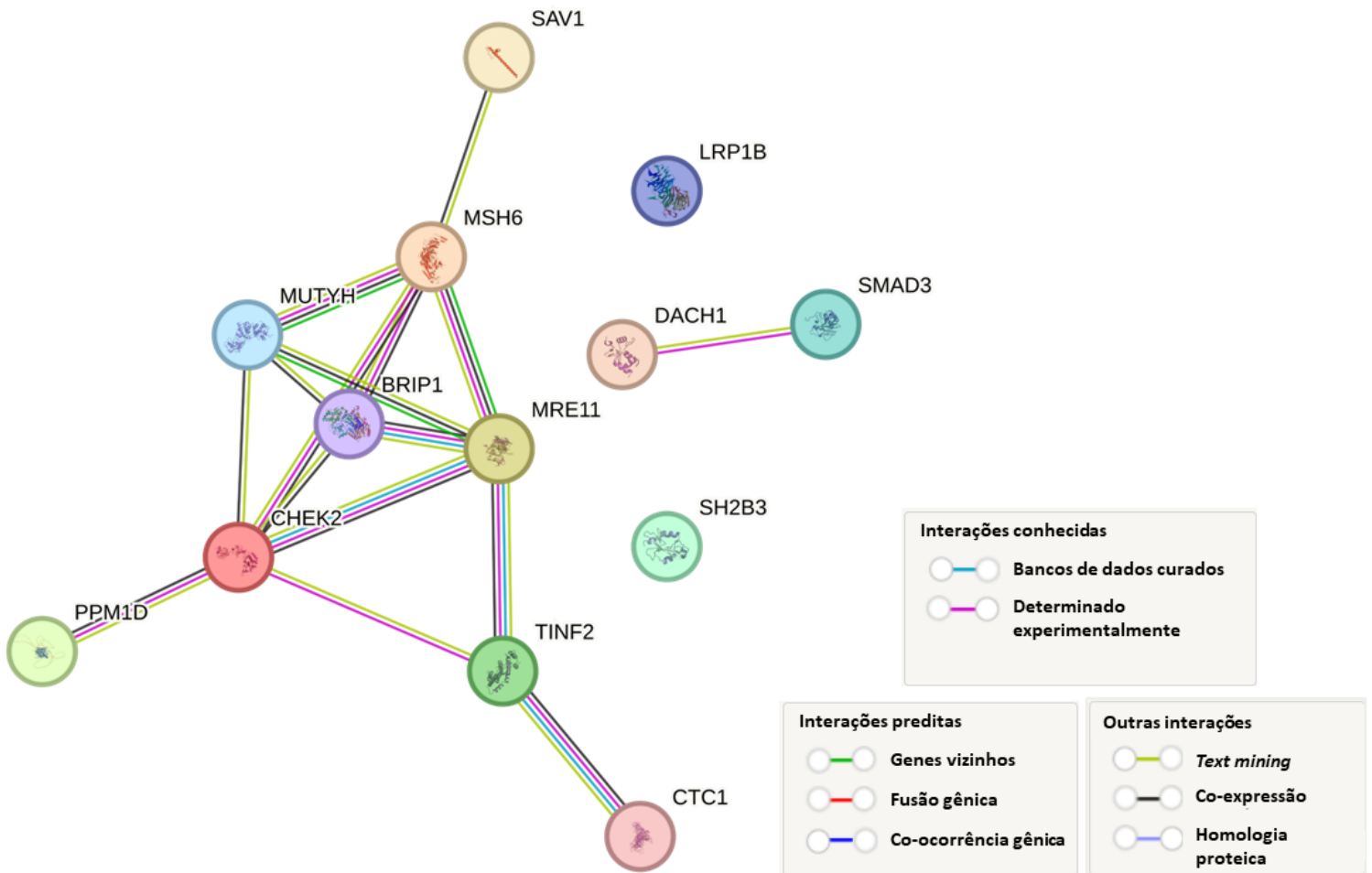
Quatro pacientes apresentaram mais de uma variante P/P. Um dos pacientes (ID 2554) possui duas variantes P/PP, nos genes *MUTYH* e *TINF2* (Tabela 11). Esse paciente foi diagnosticado com câncer de mama em uma idade muito jovem (32 anos) e possui apenas um familiar de terceiro grau com câncer de bexiga (Tabela 10). Outro paciente que apresentou mais de uma variante classificada como P/PP (ID 1757), nos genes *SAV1* e *SH2B3*, também foi diagnosticado com câncer de próstata e de pele. Esse participante possui pais em casamento consanguíneo e reporta HF com tumores de intestino, gástrico e de pele (Tabela 10). Já o paciente com variantes nos genes *CTC1* e *LRP1B* (ID 333), também possui pais em casamento consanguíneo, duas familiares diagnosticadas com CM, uma com câncer de pulmão e um familiar com câncer de próstata (Tabela 10). Por fim, o participante ID 2001, com variantes identificadas nos genes *DACH1* e *SMAD3*, possui duas familiares com CM em idade jovem (>50 e >30 anos), um familiar com câncer de tireoide e um familiar com câncer colorretal (Tabela 10). A história familiar de cada paciente está descrita na Tabela 10 e, para aqueles que são portadores de variante P/PP, os heredogramas estão representados no Anexo 2.

Realizamos uma análise de interações proteicas envolvendo os genes nos quais identificamos variantes P/PP em nosso estudo. Podemos destacar que BRIP1 está no centro da rede de interações, sendo que, os genes relacionados a SH ou em que suas proteínas estão envolvidas em vias de reparo ao DNA (BRIP1, CHEK2, MRE11, MSH6 e MUTYH) demonstram maiores interações entre si (Figura 7). Esse resultado reforça a importância desses genes na predisposição ao CMM. Vale destacar que as proteínas LRP1B e SH2B3 não possuem rede de interações com nenhuma das outras proteínas avaliadas (Figura 7). Além disso, as proteínas DACH1 e SAMD3 só interagem entre si (Figura 7).

**Tabela 11.** Variantes patogênicas/provavelmente patogênicas em homens diagnosticados com câncer de mama.

ID	Gene	Transcrito	Mudança no cDNA (HGVS)	Mudança a nível proteico	Tipo de variante	dbSNP	ACMG-AMP	REVEL	ClinVar#	gnomAD (FA)	AbraOM (FA)
2179	<i>BRIP1</i>	NM_032043	c.2119C>T	p.Arg707Cys	Missense	rs764803896	PP	0,854	VUS	0,000279	NR
1153	<i>CHEK2</i>	NM_007194	c.349A>G	p.Arg117Gly	Missense	rs28909982	P	SP	P/PP	0,0001	0,000821
333	<i>CTC1</i>	NM_025099	c.322C>T	p.Arg108Ter	Nonsense	rs372031509	P	SP	P	0,004007	NR
2001	<i>DACH1</i>	NM_080759	c.235_241del	p.Gly79_Gly82del	Frameshift	NR	PP	SP	NR	NR	NR
333	<i>LRP1B</i>	NM_018557	c.2395C>T	p.Arg799Ter	Nonsense	NR	PP	SP	NR	NR	NR
527	<i>MRE11</i>	NM_005591	c.1516G>T	p.Glu506Ter	Nonsense	rs587781384	P	SP	ICP (P/PP/VUS)	0,0003193	NR
1634	<i>MSH6</i>	NM_000179	c.1109T>C	p.Leu370Ser	Missense	rs587779204	PP	0,811	P/PP	NR	NR
2554	<i>MUTYH</i>	NM_001048174	c.452A>G	p.Tyr151Cys	Missense	rs34612342	P	0,963	P/PP	0,0015	0,002463
148	<i>PPM1D</i>	NM_003620	c.1438dupA	p.(Ala479_Lys480dup)	Frameshift	rs777478387	PP	SP	NR	0,00398	NR
1757	<i>SAV1</i>	NM_021818	c.278T>A	p.Leu93Ter	Nonsense	NR	P	SP	NR	NR	NR
1757	<i>SH2B3</i>	NM_005475	c.1183G>A	p.Glu395Lys	Missense	rs148636776	PP	0,635	P/PP	0,0002	NR
2001	<i>SMAD3</i>	NM_005902	c.1117C>T	p.Arg373Cys	Missense	rs863223746	PP	0,958	ICP (P/PP/VUS)	NR	NR
2554	<i>TINF2</i>	NM_001099274	c.1202dupA	p.(Asn401_Gly402dup)	Frameshift	NR	PP	SP	VUS	NR	NR

Legenda: HGVS = Human Genome Variantion Society; dbSNP = Single Nucleotide Polymorphism database; ACMG-AMP = American College of Medical Genetics and Genomics – Association of Molecular Pathology; FA = Frequência alélica; NR = Não reportada; P = Patogênica; PP = Provavelmente patogênica; SP = Sem predição; ICP = Interpretação conflitante de patogenicidade; VUS = Variante de significado clínico incerto. #Última consulta realizada em Março de 2024.



**Figura 7.** Redes de interações proteicas, relacionando as proteínas resultantes dos genes nos quais foram identificadas variantes classificadas como P/PP. *Text mining* = Utilização do método de mineração de dados na recriação de redes de interações proteicas, bem como na detecção de domínios de ligação de pequenas moléculas nas estruturas proteicas. Análise realizada no banco de dados STRING<sup>104</sup> (<https://string-db.org/>).

### 5.1.3.2. Variantes de significado clínico incerto (VUS) germinativas

Entre as variantes identificadas em nosso estudo, 258 (95,2%) foram consideradas como variantes que possuem impacto biológico e clínico incerto (Anexo 3). Quarenta e duas (16,6%) dessas variantes estão presentes em genes que predisõem ao câncer hereditário. Podemos destacar uma variante em *BRCA1* (c.4390C>G) e uma em *ATM* (c.1444A>C) – genes já relacionados ao CMM –, uma variante em *MSH2* (c.286C>A), uma variante em *POLG* (c.2145A>T), duas variantes em *APC* (c.8524T>G e c.7158G>C) e duas variantes em *FAN1* (c.80C>T e c.1772G>A) (Anexo 3).

As variantes presentes em *BRCA1* e *ATM* foram identificadas no mesmo paciente (ID 2318), que não é portador de variantes consideradas P/PP. Esse paciente não apresenta HF significativa (apenas um familiar com câncer ósseo), no entanto foi diagnosticado com CM aos 35 anos e câncer de tireoide em idade não especificada (Tabela 10). A variante presente em *BRCA1* preenche os

parâmetros PM2 (associado à frequência baixa/ausente da variante em bancos de dados populacionais) e BP4 (associado com predição de benignidade por ferramentas de predição *in silico*). Já a variante presente em *ATM* preencheu apenas o critério PM2 (raridade em populações teoricamente saudáveis).

O participante portador da variante em *MSH2* (ID 2344; c.286C>A) reportou apenas um familiar com câncer gástrico (Tabela 10). Essa variante preencheu os parâmetros PM2 e PP3 (patogênica *supporting*; as ferramentas de predição *in silico* apontam para um efeito deletério no gene). O portador da variante em *POLG* (ID 2104; c.2145A>T) foi diagnosticado aos 49 anos e não reportou HF.

Com relação às variantes identificadas em *APC*, um dos participantes (ID 2001; c.7158G>C) possui HF sugestiva para SH, já que tem outros dois familiares diagnosticada com CM, uma com menos de 50 anos e outra com menos de 30 anos, um familiar com câncer de tireoide e uma com câncer colorretal, um dos tipos tumorais com o qual a presença de mutações patogênicas no gene *APC* é associada (Tabela 10). Com relação ao outro participante com variante identificada nesse gene (ID 2554; c.8524T>G), ele não reportou HF significativa (apenas um familiar diagnosticado com câncer de bexiga) (Tabela 10). Ambas as variantes em *APC* preencheram apenas o parâmetro PM2.

Para os portadores das variantes identificadas em *FAN1*, vale ressaltar que o participante ID 333, portador da variante (c.1772G>A), possui pais com casamento consanguíneo e HF sugestiva para SH (Tabela 10). Essa variante preencheu apenas o parâmetro PM2. O participante também é portador de duas variantes consideradas P/PP, nos genes *CTC1* e *LRP1B*. Já o participante ID 148, portador da variante c.80C>T, foi diagnosticado com câncer de mama e de vias biliares (com 73 e 75 anos, respectivamente), e não reportou HF. A variante preencheu o parâmetro BS1 (benigna *strong*; frequência alélica maior do que a esperada para uma doença) Esse participante também é portador da variante c.1438dupA, no gene *PPM1D*, classificada como P/PP, e duas variantes consideradas VUS no gene *FANCD2* (c.860A>C e c.2180C>T), cuja proteína resultante é uma das principais ligantes de *FAN1*.

Para que essas variantes (com exceção da c.80T>C em *FAN1*), classificadas como VUS, fossem consideradas P/PP, seria necessário preencher algum outro parâmetro considerado *strong* ou *very strong* para patogenicidade, por exemplo, ensaios funcionais que apontem para perda de função; maior frequência em casos do que em controles. Para a variante c.80C>T, em *FAN1*, o preenchimento de outro parâmetro que a considere benigna faria com que essa variante fosse classificada como B/PB.

Além disso, dentre as VUS identificadas, 14 (5,4%) são variantes de perda de função. No entanto, devido à falta de evidência sobre o impacto na funcionalidade dos genes nos quais elas estão presentes, são consideradas VUS. Elas estão presentes nos genes *APTX*, *ECT2L* (2 pacientes), *FAT1*, *HTATIP2*, *INSL3*, *KLK2*, *MUC4*, *NBPF3*, *OBSCN*, *PDE4DIP*, *RINT1*, *SAMD9*, *TBP* e *USP6* (Anexo 3).

#### 5.1.4. Identificação de variantes provavelmente patogênicas ou patogênicas somáticas

Em relação às variantes somáticas potencialmente deletérias identificadas em genes *drivers* para os três pacientes em que o tecido tumoral criopreservado estava disponível para sequenciamento (IDs 1342, 1634 e 2318), realizamos análise CGI, conforme descrito anteriormente. As informações detalhadas das variantes somáticas identificadas na análise CGI estão resumidas na Tabela 12.

Em relação aos portadores de variantes somáticas, dois deles não portavam variantes germinativas classificadas como oncogênicas ou provavelmente oncogênicas. Destacamos o ID 1342, que porta uma variante somática no gene *PIK3CA*. O outro caso em nossa coorte é o participante ID 2318, portador da variante, bem estabelecida como patogênica, *BRAF* V600E e outra variante em *MAP3K1*. Já o participante ID 1634, portador de uma variante germinativa no gene *MSH6* (c.1109T>C), também porta uma variante somática no gene *MTOR*.

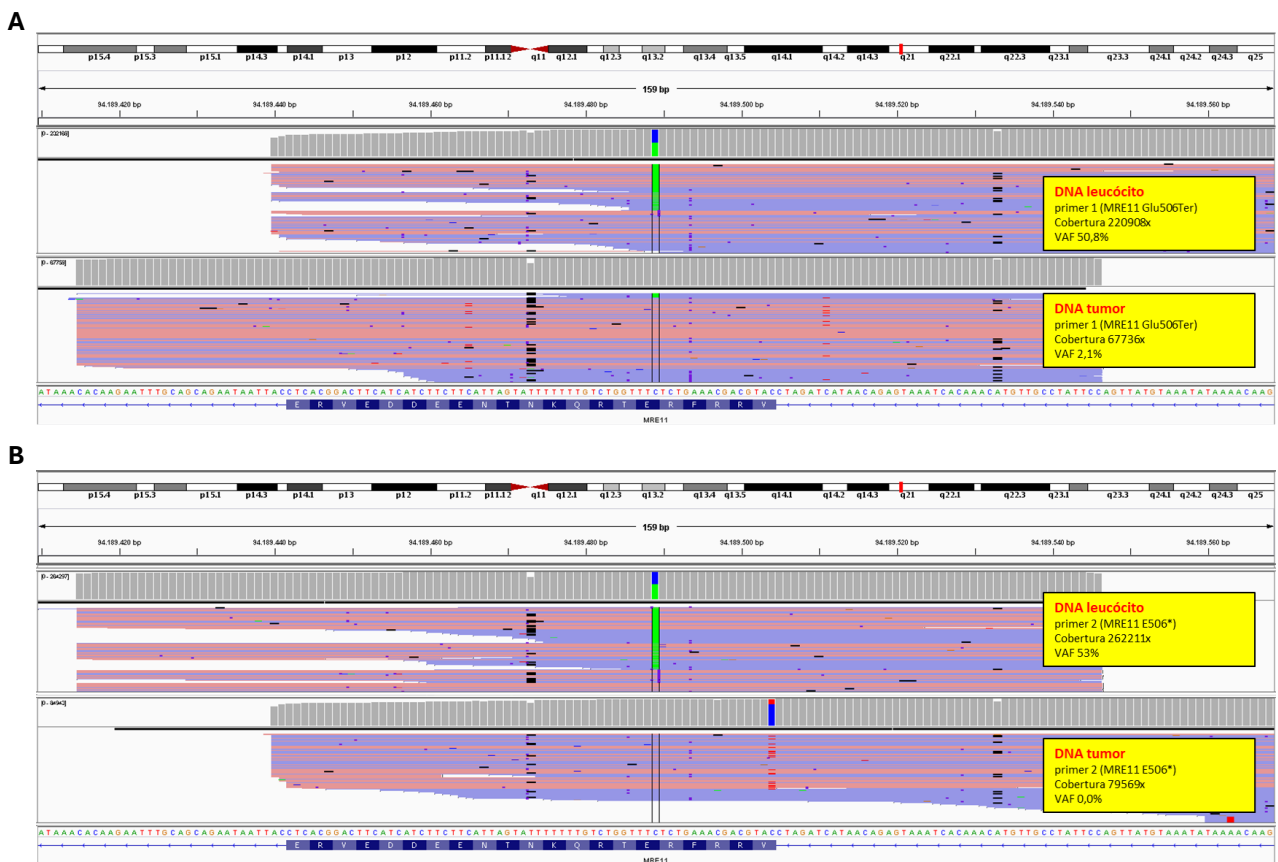
**Tabela 12.** Variantes somáticas preditas como *drivers* em homens diagnosticados com câncer de mama.

ID	Gene	Mudança no cDNA	Mudança a nível proteico	Tipo de mutação	Status Driver	Predição Driver	Papel no gene
1342	<i>ARAP3</i>	c.3197C>T	p.Thr1066Met	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Perda de função
	<i>FAT1</i>	c.2650G>T	p.Asp884Tyr	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Perda de função
	<i>HERC2</i>	c.4904T>C	p.Leu1635Pro	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Ambíguo
	<i>PIK3CA</i>	c.1634A>G	p.Glu545Gly	<i>Missense</i>	Conhecido	TIER 1	Funcional
	<i>PIK3R2</i>	c.1885C>T	p.Arg629Cys	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Perda de função
	<i>RASA1</i>	c.580C>T	p.Arg194Cys	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Perda de função
	<i>ROS1</i>	c.6337G>A	p.Asp2113Asn	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Funcional
1634	<i>BCL9L</i>	c.2240delG	p.Gly747fs	<i>Frameshift</i>	Predito	TIER 2	Ambíguo
	<i>CLSPN</i>	c.2285C>T	p.Ser762Leu	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Perda de função
	<i>MAP3K11</i>	c.1195T>A	p.Trp399Arg	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Ambíguo
	<i>MTOR</i>	c.6887G>A	p.Gly2296Glu	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Funcional
	<i>MYOD1</i>	c.607C>T	p.Arg203Cys	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Ambíguo
	<i>SMARCA4</i>	c.567delG	p.Met189fs	<i>Frameshift</i>	Predito	TIER 1	Perda de função
2318	<i>WRN</i>	c.2008G>A	p.Ala670Thr	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Perda de função
	<i>ACTB</i>	c.172G>C	p.Ala58Pro	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Funcional
	<i>BRAF</i>	c.1799T>A	p.Val600Glu	<i>Missense</i>	Conhecido	TIER 1	Funcional
	<i>ELF4</i>	c.986G>A	p.Arg329Gln	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Funcional
	<i>FES</i>	c.368T>A	p.Leu123Gln	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Perda de função

<i>MAP3K1</i>	c.(13_486)	p.Ala5fs	<i>Frameshift</i>	Predito	TIER 1	Perda de função
<i>RMND5B</i>	c.574_575delinsTC	p.Leu192Ser	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Ambíguo
<i>ZEB1</i>	c.383A>T	p.Glu128Val	<i>Missense</i>	Predito	TIER 1	Ambíguo

### 5.1.5. Análise de perda de heterozigose para a variante c.1516G>T, presente em *MRE11*

Na análise de perda de heterozigose da variante c.1516G>T (E506\*), presente em *MRE11* (Figura 8), observamos uma VAF de 2,1%, quando consideramos o sequenciamento realizado com o *primer 1* (Figura 8A), e 0%, quando consideramos o *primer 2* (Figura 8B). Portanto, concluímos que não houve LoH para essa variante.



**Figura 8.** Análise da perda de heterozigose da variante c.1516G>T (E506\*) em *MRE11*. Comparação da fração alélica da variante (VAF) do DNA germinativo (DNA leucócitos) e do DNA tumoral para os *primer 1* (A) e *primer 2* (B). Em verde podemos observar as bases com a troca avaliada (G>T).

## 5.2. Etapa II – Edição gênica e ensaios funcionais para as variantes consideradas P/PP pelas predições *in silico*

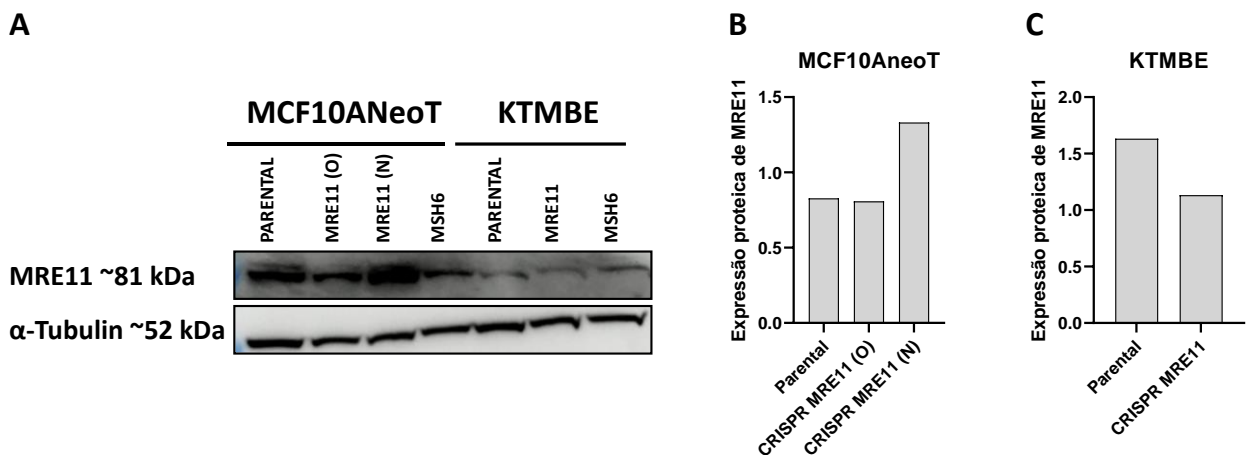
### 5.2.1. Edição Gênica: silenciamento dos genes *MRE11* e *MSH6* através do sistema CRISPR/*Cas9*

Foi realizada a técnica de silenciamento utilizando o sistema CRISPR/*Cas9* para cada um dos genes selecionados nas duas linhagens de mama (masculina e feminina). A técnica foi realizada três vezes, sendo que, na primeira tentativa ambas as linhagens morreram, tanto no silenciamento para

*MRE11*, quanto para *MSH6*. Na segunda tentativa, obtivemos um clone de MCF10AneoT após o silenciamento para *MRE11*, que foi chamado de MRE11 OLD (O), no entanto, as demais condições morreram. Diante disso, foi necessário ajustar a dose de puromicina para a seleção dos clones. Após a terceira vez da realização da técnica e seleção com puromicina, para a linhagem MCF10AneoT, obtivemos outro *pool* de células para o silenciamento de *MRE11*, que foi chamado de MRE11 NEW (N), e um clone para KTMBE. No silenciamento para *MSH6*, obtivemos apenas um *pool* de células para cada linhagem.

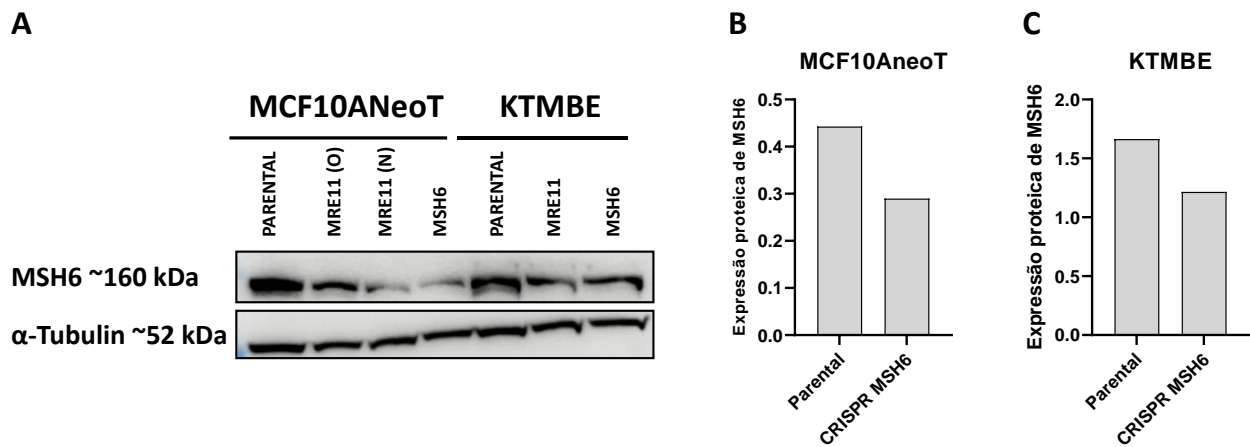
### 5.2.1.1. Análise do *knockout* de *MRE11* e *MSH6* por Western Blot (WB)

Para avaliação da eficiência do silenciamento de *MRE11* e *MSH6*, analisamos a expressão proteica pela técnica de WB. Para a linhagem MCF10AneoT, não observamos diminuição na expressão da proteína MRE11 nos clones selecionados (Figura 9), mas observamos uma diminuição na expressão da proteína MSH6 no clone selecionado, quando comparado à linhagem parental (Figura 10). Para a linhagem KTMBE, observamos uma diminuição na expressão de MSH6 e MRE11 nos clones selecionados, quando comparados à linhagem parental (Figuras 9 e 10). Os resultados revelam que não obtivemos clones *knockout* para nenhum dos genes, apenas um indício de linhagens *knockdown* para MRE11 na linhagem MCF10AneoT, e de MSH6 para ambas as linhagens (Figuras 9 e 10).



**Figura 9.** Análise de expressão da proteína MRE11 após o silenciamento com o sistema CRISPR/Cas9 nas linhagens MCF10AneoT e KTMBE. **A** – Imagem representativa da avaliação da expressão de MRE11 (~81kDa) na condição parental de ambas as linhagens, dois clones selecionados por puromicina em MRF10AneoT, MRE11 (O) e MRE11 (N), e um clone selecionado por puromicina, MRE11, em KTMBE. Também estão incluídas na imagem os clones que passaram por silenciamento de MSH6. Para controle da técnica, foi avaliada a proteína endógena  $\alpha$ -Tubulina (~52kDa). **B** – Quantificação da expressão proteica de MRE11 na linhagem MCF10AneoT para as condições parental e editadas (CRISPR MRE11 (O) e CRISPR MRE11(N)), normalizada pela quantificação da expressão de  $\alpha$ -Tubulina. **C** – Quantificação da expressão proteica de MRE11 na linhagem KTMBE

para as condições parental e editada (CRISPR MRE11), normalizada pela quantificação da expressão de  $\alpha$ -Tubulina. Foi realizada apenas uma réplica biológica.



**Figura 10.** Análise de expressão da proteína MSH6 após o silenciamento com o sistema CRISPR/Cas9 nas linhagens MCF10AneoT e KTMBE. Avaliação da expressão de MSH6 (~160kDa) na condição parental e em um clone selecionado por puromicina de ambas as linhagens após o silenciamento de MSH6. Também estão incluídos na imagem os clones que passaram por silenciamento de MRE11. Para controle da técnica, foi avaliada a proteína endógena  $\alpha$ -Tubulina (~52kDa). **B** – Quantificação da expressão proteica de MSH6 na linhagem MCF10AneoT para as condições parental e editada (CRISPR MSH6), normalizada pela quantificação da expressão de  $\alpha$ -Tubulina. **C** – Quantificação da expressão proteica de MSH6 na linhagem KTMBE para as condições parental e editada (CRISPR MSH6), normalizada pela quantificação da expressão de  $\alpha$ -Tubulina. Foi realizada apenas uma réplica experimental.

#### 5.2.1.2. Análise do *knockout* de *MRE11* e *MSH6* por Sequenciamento de Sanger

Para avaliar a edição gênica nas sequências de *MRE11* e *MSH6* nas linhagens celulares, realizamos o sequenciamento de Sanger na região em que as sequências-alvo dos gRNAs do sistema CRISPR/*Cas9* deveriam reconhecer e deletar. Todos os clones avaliados após a técnica de licenciamento por CRISPR/*Cas9*, em ambas as linhagens, apresentaram as sequências que deveriam ser deletadas, o que nos indicou que a técnica não funcionou para nenhum dos genes (*MRE11* e *MSH6*) nas linhagens MCF10AneoT e KTMBE (Anexo 4). Além disso, através do sequenciamento, analisamos o espectro de inserções e deleções dos clones, quando comparados com as linhagens parentais para determinar a porcentagem de eficiência da técnica (Itens B das figuras do Anexo 4). As porcentagens variaram de 1,3% de eficiência para o clone MRE11 NEW para a região do gRNA-4 na linhagem MCF10AneoT (Anexo 4D) a 11,3% para o clone MRE11 NEW para a região do gRNA-2 na linhagem MCF10AneoT (Anexo 4C). No entanto, ao observarmos o espectro de controle de qualidade, onde comparamos a porcentagem de similaridade entre os clones avaliados e as linhagens parentais, notamos que algumas dessas inserções e deleções estão presentes na

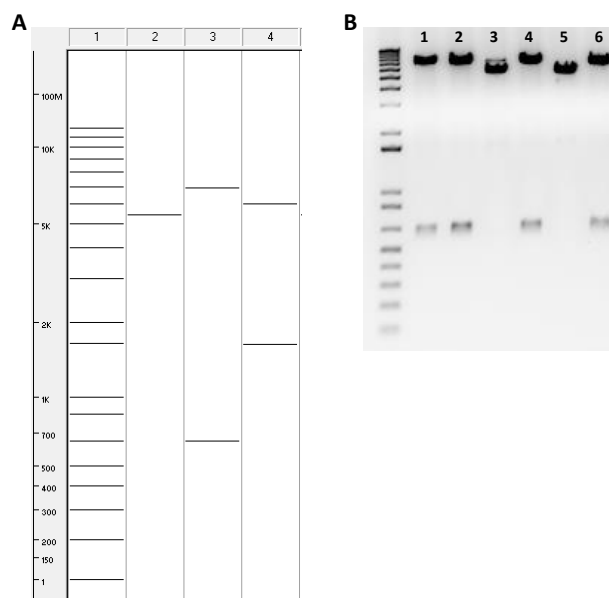
extremidade da sequência, em uma região onde o sequenciamento não ocorre de maneira correta. Diante disso, podemos concluir que, até mesmo nas linhagens onde a porcentagem de eficiência foi ligeiramente maior, a similaridade à parental é quase de 100%, uma vez que as regiões consideradas diferentes se trata de artefatos da técnica.

### 5.2.2. Edição gênica: construção de vetores através da subclonagem da sequência gênica de *MRE11* ou *MSH6* interesse em pcDNA<sup>TM</sup>3.1

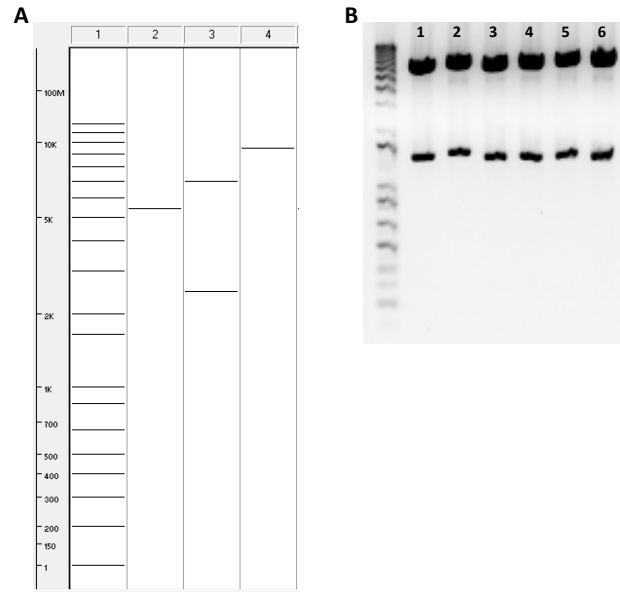
Para a confirmação das construções de pcDNA3-*MRE11* e pcDNA3-*MSH6*, realizamos um *screening* com o auxílio de enzimas de restrição. Através dos perfis de bandas depois de uma digestão foi possível confirmarmos a inserção na posição correta de leitura das sequências de *MRE11* (Figura 11) e *MSH6* (Figura 12).

Na Figura 11, observamos que, com exceção das colônias 3 e 5 (nas quais identificamos a ligação do plasmídeo pcDNA<sup>TM</sup>3.1 sem a inserção da sequência), obtivemos construções de pcDNA3-*MRE11* na posição correta de leitura. Na Figura 12, observamos que todas as construções obtidas de pcDNA3-*MSH6* estão na posição correta de leitura.

As sequências de WT (pcDNA3-myc-his-BACH1-WT) e com a variante P47A (pcDNA3-myc-his-BACH1-P47A) *BRIP1* foram adquiridas comercialmente subclonadas no vetor pcDNA<sup>TM</sup>3.1, portanto, esse passo não foi necessário.



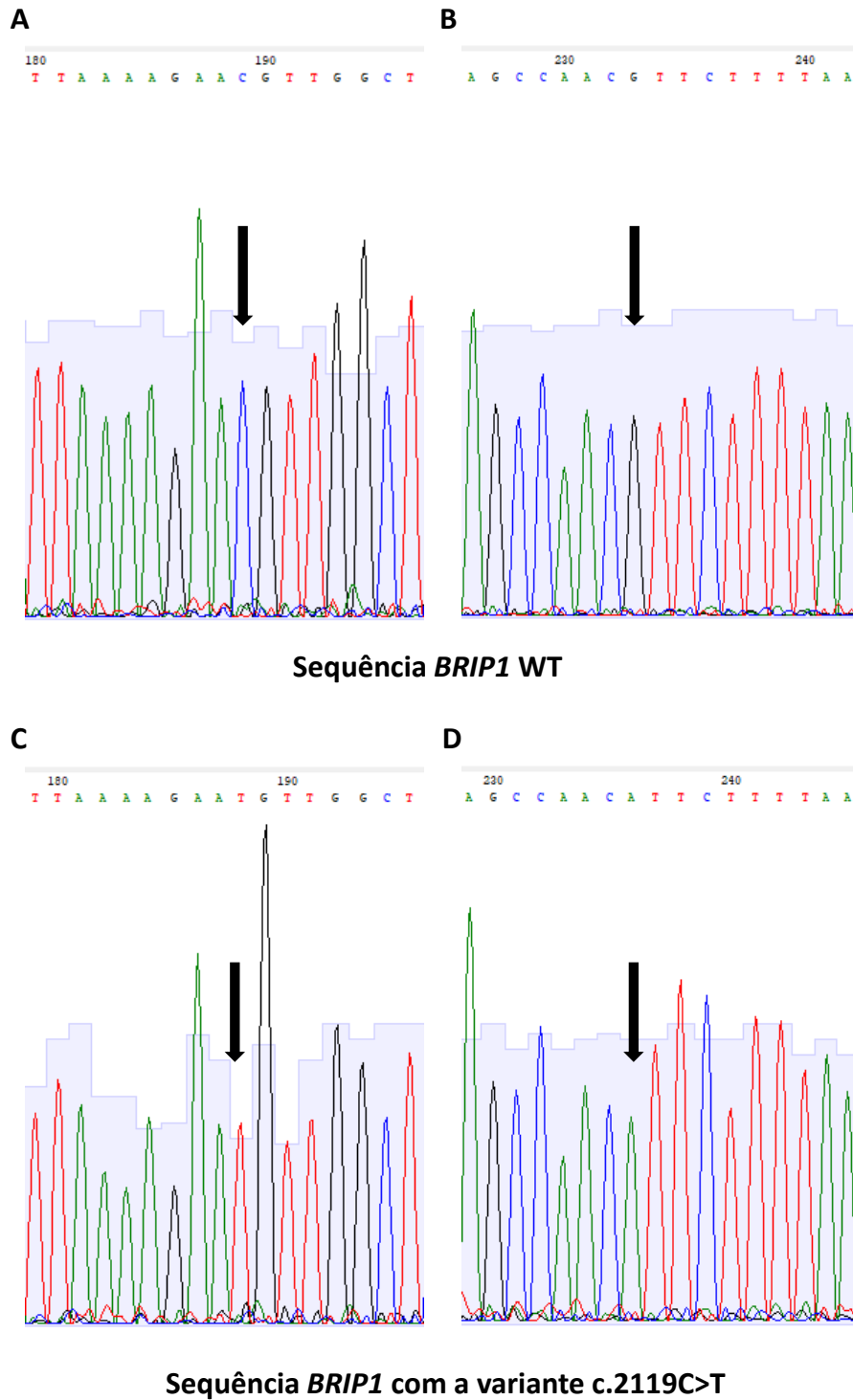
**Figura 11.** *Screening* para confirmação da inserção da sequência de *MRE11* na posição correta de leitura em pcDNA<sup>TM</sup>3.1. **A** – Simulação de gel com os perfis de bandas após uma digestão com a enzima *Bam*HI realizada no programa Vector NTI. É possível observarmos a referência dos tamanhos de fragmentos 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen, #10787018) (1) e a situação em que pcDNA<sup>TM</sup>3.1 se fecha sozinho, sem a inserção da sequência (2), há a inserção do fragmento na posição correta de leitura (3) e há a inserção do fragmento na posição incorreta de leitura (4). **B** – Gel com as amostras de DNA plasmidial obtidas das colônias com a ligação de pcDNA<sup>TM</sup>3.1 e *MRE11*.



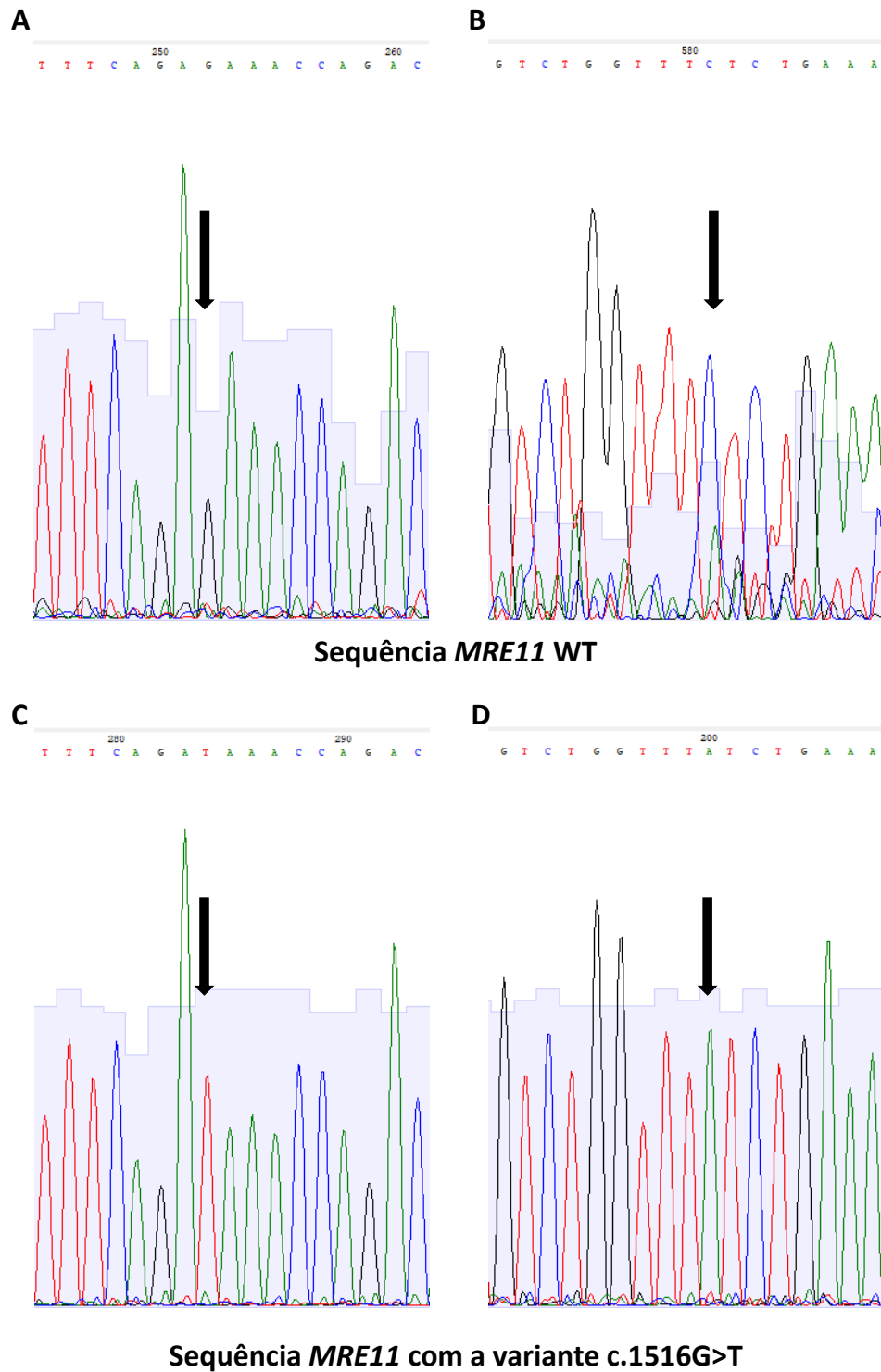
**Figura 12.** *Screening* para confirmação da inserção da sequência de *MSH6* na posição correta de leitura em pcDNA™3.1. **A** – Simulação de gel com os perfis de bandas após uma digestão com a enzima *HindIII* realizada no programa Vector NTI. É possível observarmos a referência dos tamanhos de fragmentos usando o 1 Kb Plus DNA ladder (Invitrogen, #10787018) (1) e as situações em que pcDNA™3.1 se fecha sozinho, sem a inserção da sequência (2), há a inserção do fragmento na posição correta de leitura (3) e há a inserção do fragmento na posição incorreta de leitura (4). **B** – Gel com as amostras de DNA plasmidial obtidas das colônias com a ligação de pcDNA™3.1 e *MSH6*.

### 5.2.3. Edição gênica: inserção de variantes nas sequências dos genes *BRIP1*, *MRE11* e *MSH6*

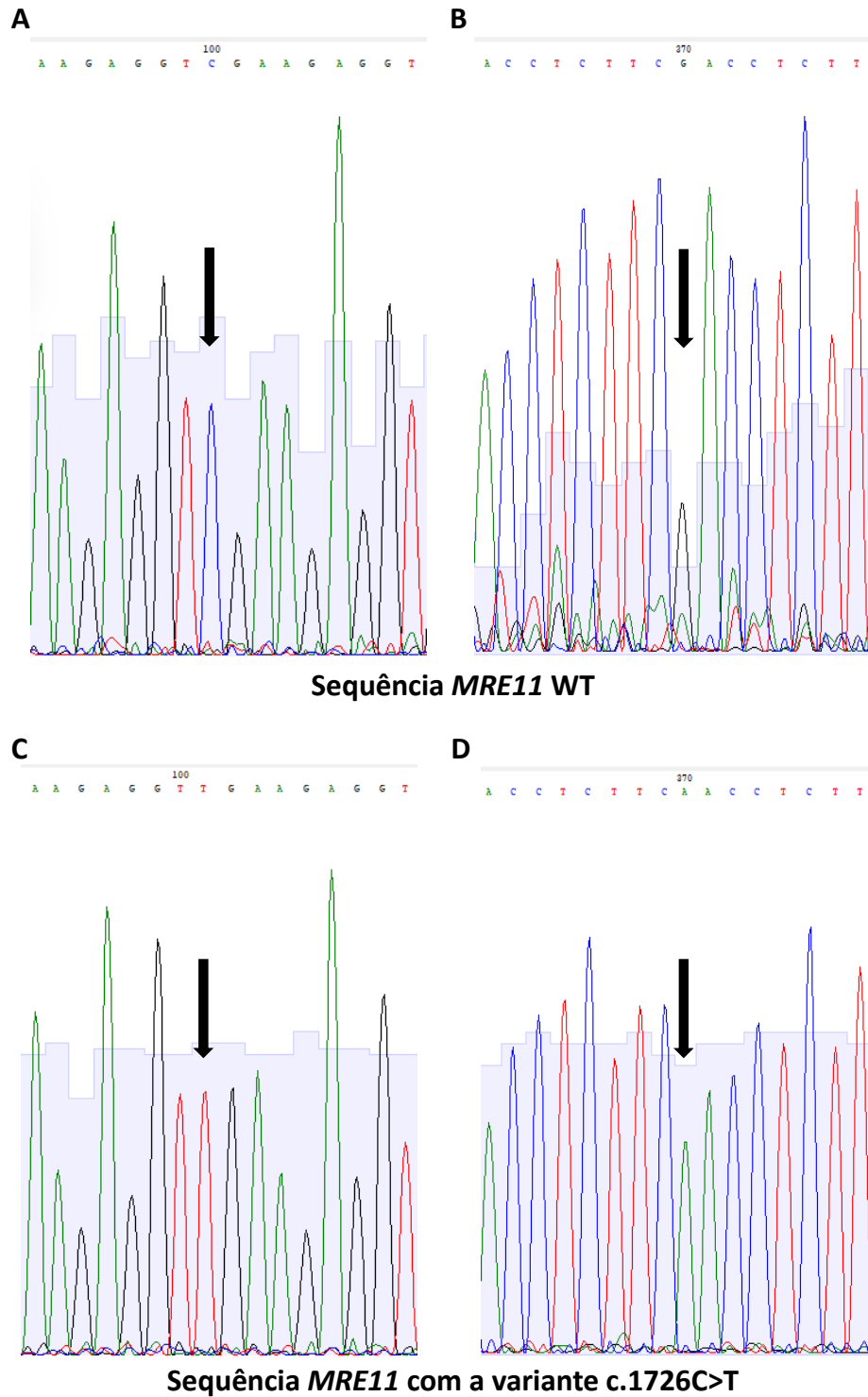
Para a inserção das variantes, realizamos a mutagênese sítio-dirigida em vetores contendo as sequências dos genes *BRIP1*, *MRE11* e *MSH6*. Após a realização da técnica, os fragmentos foram submetidos ao sequenciamento de Sanger para confirmação de sua inserção. A variante de interesse (c.2119C>T) foi inserida corretamente na sequência de *BRIP1* (Figura 13), já para a variante patogênica (c.139C>G), adquirimos o plasmídeo comercial com a alteração. Ambas as variantes (c.1516G>T e c.1726C>T) foram inseridas corretamente conforme observamos nos eletroferogramas para o fragmento de *MRE11* (Figuras 14 e 15). Para as variantes avaliadas em *MSH6* (c.1444C>T e c.1109T>C), observamos sua inserção nos eletroferogramas (Figuras 16 e 17).



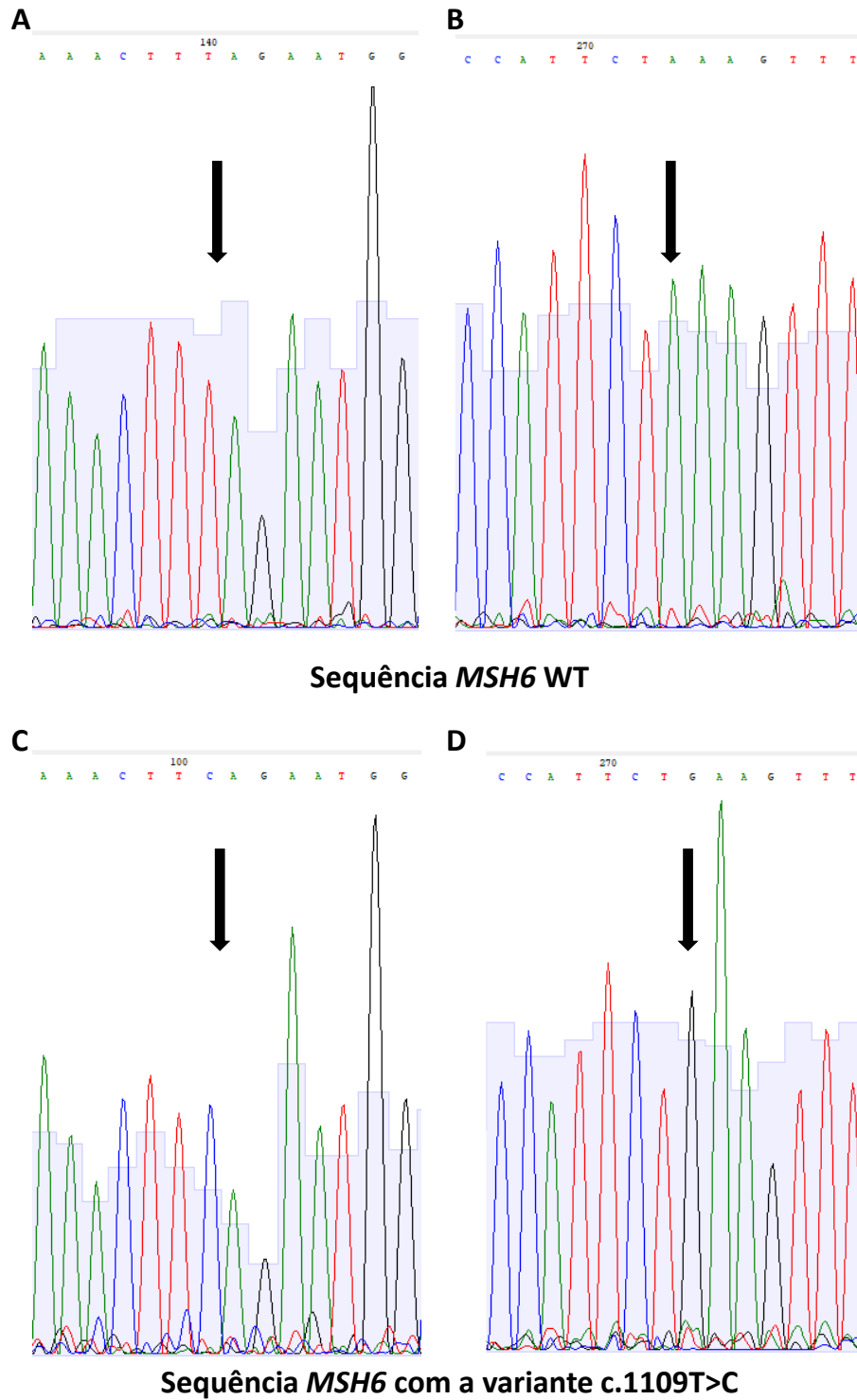
**Figura 13.** Eletroferogramas dos fragmentos dos plasmídeos pcDNA3-myc-his-BACH1-WT e pcDNA3-myc-his-BACH1-R707C. Sequência de *BRIP1* WT *forward* (A) e *reverse* (B). Sequência de *BRIP1 forward* (C) e *reverse* (D), após a inserção da variante c.2119C>T (R707C), através da realização da técnica de mutagenese sítio-dirigida. A seta preta aponta a posição exata da troca de bases.



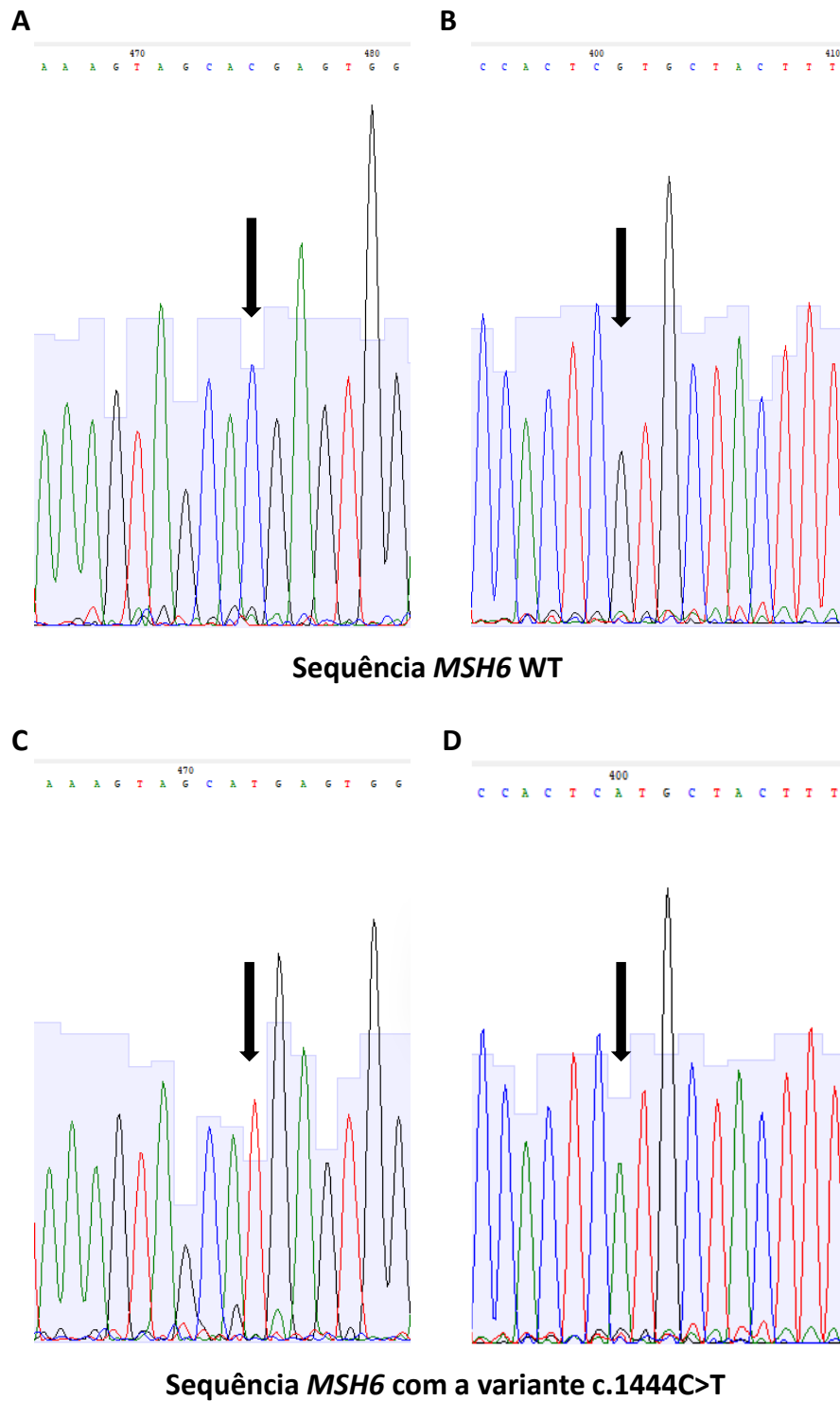
**Figura 14.** Eletroferogramas dos fragmentos dos plasmídeos pcDNA3-MRE11-WT e pcDNA3-MRE11-E506\*. Sequência de *MRE11* WT *forward* (A) e *reverse* (B). Sequência de *MRE11* *forward* (C) e *reverse* (D), após a inserção da variante c.1516G>T (E506\*), através da realização da técnica de mutagênese sítio-dirigida. A seta preta aponta a posição exata da troca de bases.



**Figura 15.** Eletroferogramas dos fragmentos dos plasmídeos pcDNA3-MRE11-WT e pcDNA3-MRE11-R576\*. Sequência de *MRE11* WT *forward* (A) e *reverse* (B). Sequência de *MRE11* *forward* (C) e *reverse* (D), após a inserção da variante c.1726C>T (R576\*), através da realização da técnica de mutagênese sítio-dirigida. A seta preta aponta a posição exata da troca de bases.



**Figura 16.** Eletroferogramas dos fragmentos dos plasmídeos pcDNA3-*MSH6*-WT e pcDNA3-*MSH6*-L370S. Sequência de *MSH6* WT *forward* (A) e *reverse* (B). Sequência de *MSH6* *forward* (C) e *reverse* (D), após a inserção da variante c.1109T>C (L370S), através da realização da técnica de mutagênese sítio-dirigida. A seta preta aponta a posição exata da troca de bases.

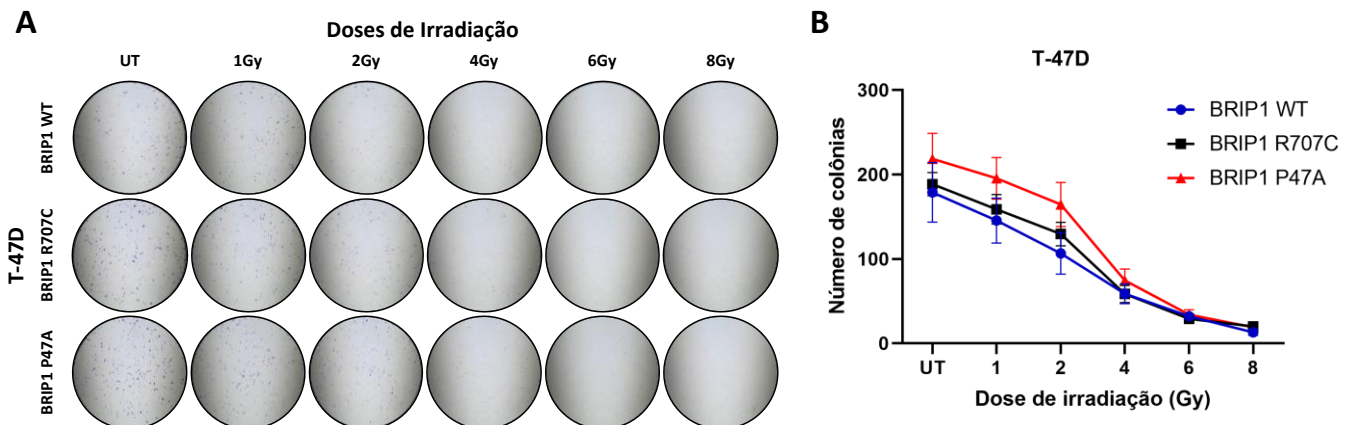


**Figura 17.** Eletroferogramas dos fragmentos dos plasmídeos pcDNA3-*MSH6*-WT e pcDNA3-*MSH6*-R482\*. Sequência de *MSH6* WT *forward* (A) e *reverse* (B). Sequência de *MSH6* *forward* (C) e *reverse* (D), após a inserção da variante c.1444C>T (R482\*), através da realização da técnica de mutagênese sítio-dirigida. A seta preta aponta a posição exata da troca de bases.

## 5.2.4. Ensaios funcionais

### 5.2.4.1. Avaliação da capacidade clonogênica na presença de variantes em *BRIP1*

Para avaliação da capacidade clonogênica na presença de variantes em *BRIP1*, superexpressamos as construções de BRIP1 WT, ou com as variantes R707C e P47A, na linhagem T-47D. Não observamos diferenças estatísticas significantes em nenhuma condição de irradiação na presença das variantes em relação à condição WT (Figura 18).



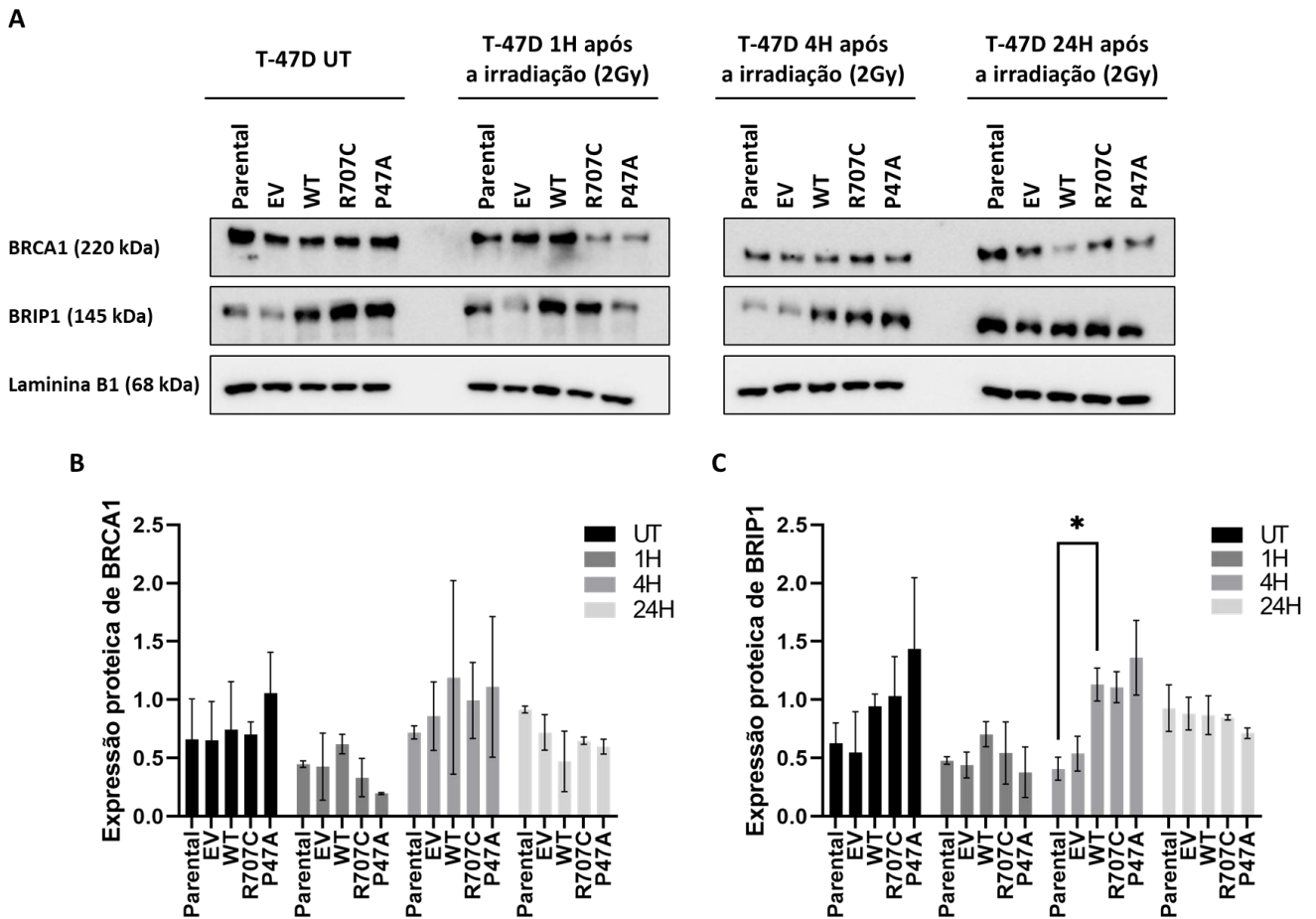
**Figura 18.** Avaliação da capacidade clonogênica da linhagem T-47D na presença de variantes em *BRIP1*. **A** – Representação do ensaio clonogênico para a linhagem T-47D com a superexpressão das construções de BRIP1 WT ou na presença das variantes R707C e P47A, em diferentes doses de tratamento de irradiação (Gy). UT = sem tratamento. **B** – Representação gráfica da capacidade clonogênica de T-47D frente às diferentes doses de irradiação (Gy) quando superexpressa com as construções BRIP1 WT ou na presença das variantes R707C e P47A. Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. Foram considerados significativos  $p < 0,05$  (\*).

### 5.2.4.2. Avaliação de reparo de danos do DNA por *Western Blot*: expressão de proteínas presentes na via de reparo de danos ao DNA por RH na presença de variantes em *BRIP1*

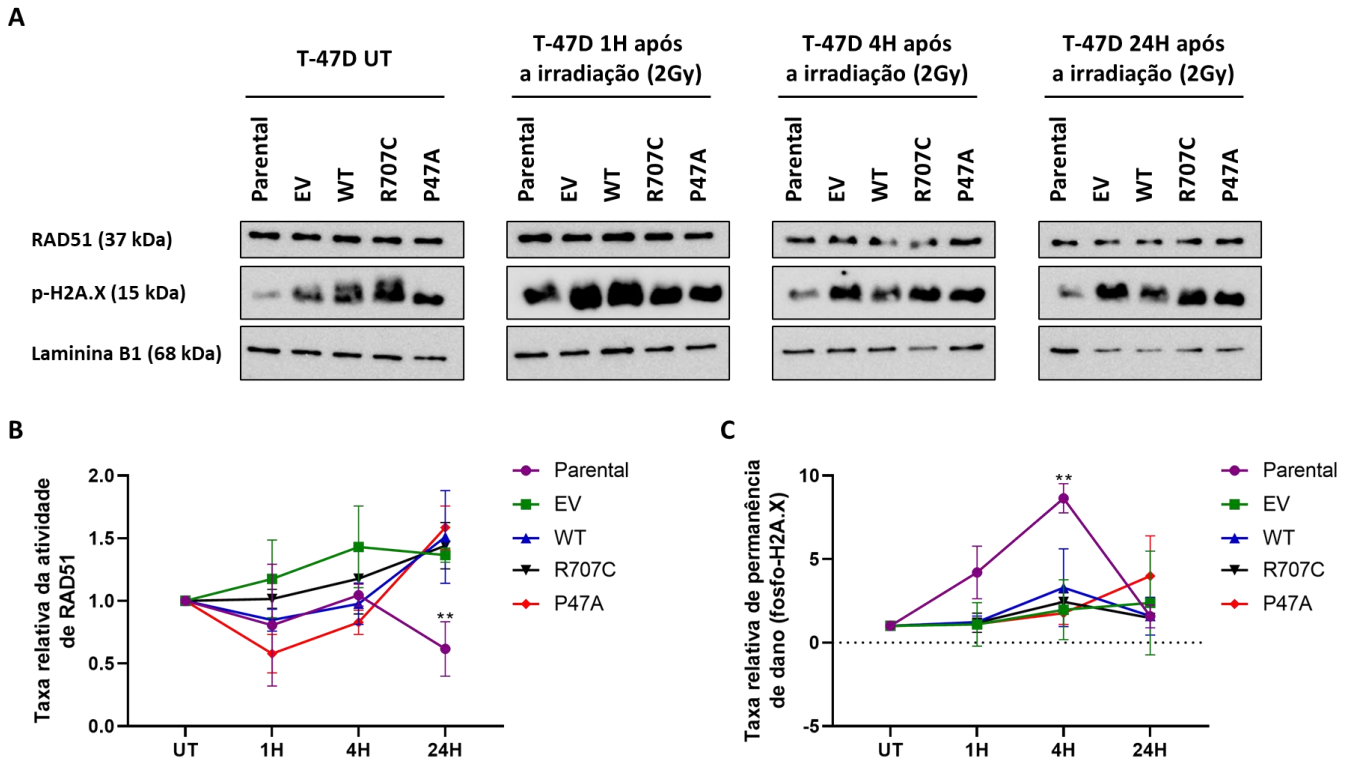
Para avaliar a funcionalidade da via de reparo de danos ao DNA e a resolução do dano, avaliamos proteínas presentes na via de reparo por RH (RAD51 e BRCA1) e permanência de dano (p-H2A.X), bem como a expressão e a atividade de BRIP1 (Figuras 19 e 20).

Não foram observadas diferenças estatísticas entre as condições na expressão proteica de BRCA1 e BRIP1 em nenhum dos tempos nas condições normais (UT) ou com indução de dano (Figura 19). Com relação à expressão proteica de RAD51 (Figura 20A e B), observamos diferença estatística apenas para a linhagem parental, que apresentou uma diminuição na expressão da proteína, em comparação a BRIP1 WT, após 24 da irradiação (Figura 20A e B). Na avaliação da atividade da

proteína p-H2A.X, que indica a permanência de dano, não observamos diferenças estatísticas nas condições normais ou com indução de dano (Figura 20A e C).



**Figura 19.** Avaliação da expressão proteica de BRCA1 e BRIP1 diante do dano na linhagem T-47D. Foram avaliadas a linhagem parental ou transfectada com as construções do vetor pcDNA™3.1 vazio (EV) ou com a sequência de BRIP1 WT ou na presença de variantes (R707C e P47A). **A** – Imagem representativa da expressão proteica de BRCA1 (~220 kDa), BRIP1 (~145 kDa) e o endógeno Laminina B1 (~68 kDa) nas condições sem danos (UT) e 1, 4 e 24 horas após a irradiação (2Gy). **B** – Representação gráfica da expressão proteica de BRCA1 (~220 kDa) e BRIP1 (~145 kDa) após a normalização pela expressão do endógeno Laminina B1 (~68 kDa) nas condições sem danos (UT) e 1 hora após a irradiação (2Gy). **C** – Representação gráfica da expressão proteica de BRCA1 (~220 kDa) e BRIP1 (~145 kDa) após a normalização pela expressão do endógeno Laminina B1 (~68 kDa) nas condições 4 e 24 horas após a irradiação (2Gy). Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (\*).

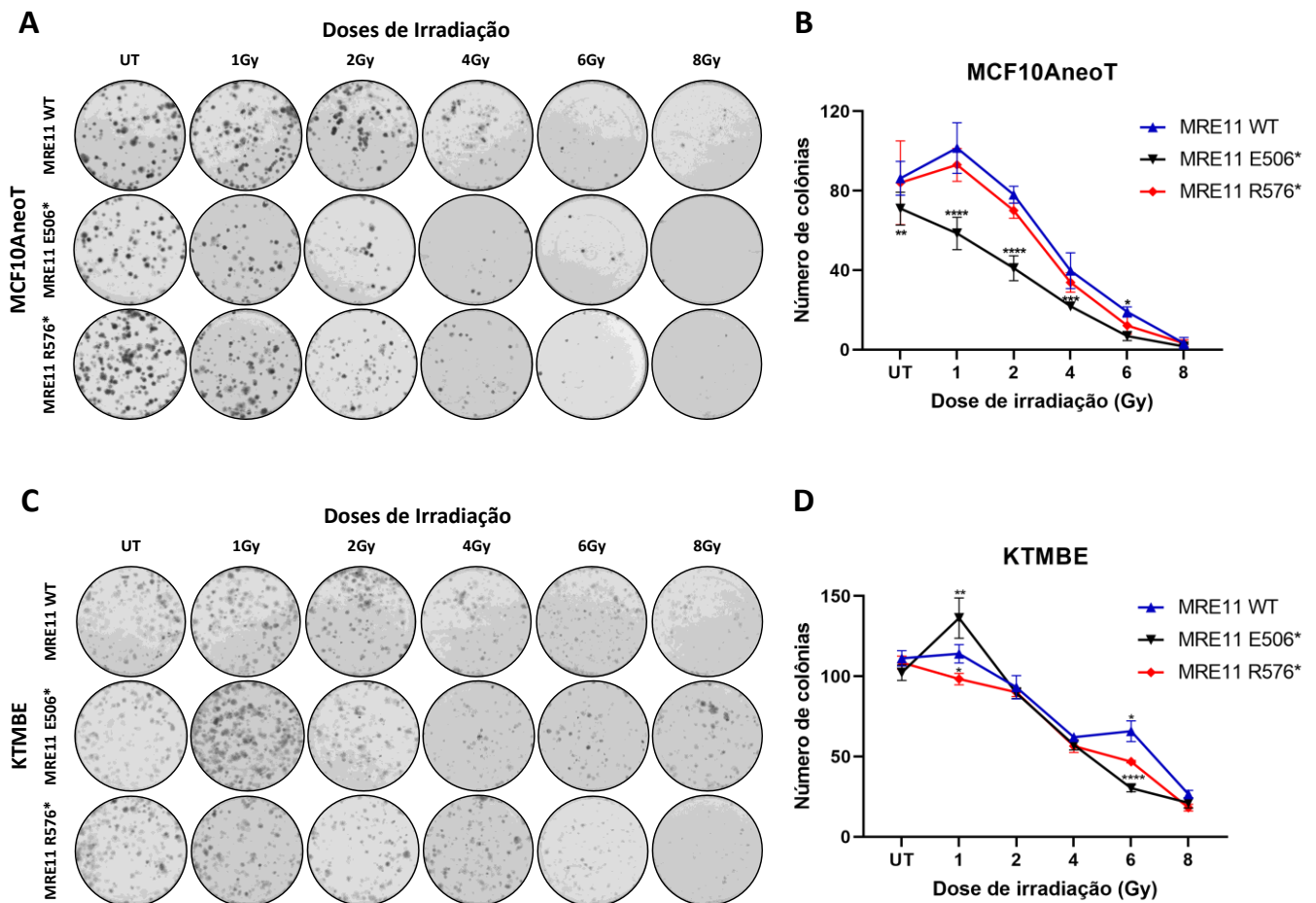


**Figura 20.** Avaliação da expressão proteica de RAD51 e p-H2A.X diante do dano na linhagem T-47D. Foram avaliadas a linhagem parental ou transfectada com as construções do vetor pcDNA<sup>TM</sup>3.1 vazio (EV) ou com a sequência de BRIP1 WT ou na presença de variantes (R707C e P47A). **A** – Imagem representativa da expressão proteica de RAD51 (~37 kDa), p-H2A.X (~15 kDa) e o endógeno Laminina B1 (~68 kDa) nas condições sem danos (UT) e 1, 4 e 24 horas após a irradiação (2Gy). **B** – Representação gráfica da expressão proteica de RAD51 (~37 kDa) e p-H2A.X (~15 kDa) após a normalização pela expressão do endógeno Laminina B1 (~68 kDa) nas condições sem danos (UT) e 1 hora após a irradiação (2Gy). **C** – Representação gráfica da expressão proteica de BRCA1 RAD51 (~37 kDa) e p-H2A.X (~15 kDa) após a normalização pela expressão do endógeno Laminina B1 (~68 kDa) nas condições 4 e 24 horas após a irradiação (2Gy). Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,005$  (\*\*).

#### 5.2.4.3. Avaliação da capacidade clonogênica na presença de variantes em *MRE11*

Para avaliação da capacidade de formar colônias, superexpressamos as construções com *MRE11* WT ou com as variantes E506\* e R576\*, utilizando as linhagens MCF10AneoT e KTMBE (Figura 21). Na linhagem MCF10AneoT, observamos que as condições *MRE11* WT e a variante R576\* (sabidamente patogênica) possuem comportamento semelhante em todos os tratamentos (Figura 21A e B). Já a condição com a variante E506\* (variante de interesse) demonstrou uma sensibilidade maior aos tratamentos e, ainda, um impacto na capacidade de formar colônias até mesmo na condição não tratada (UT), quando comparada à condição WT (Figura 21A e B). Com exceção do tratamento com 8Gy, todos os outros tratamentos apresentaram diferença significativa (\* $p < 0,05$ ).

Ao analisarmos o ensaio para a linhagem KTMBE, não observamos impacto de nenhuma das variantes na condição não tratada (Figura 21C e D). Para a condição tratada com 1Gy, observamos uma maior proliferação para a variante E506\* ( $p < 0,005$ ) e menor proliferação para a variante R576\* ( $p < 0,05$ ), quando comparadas à condição WT (Figura 21C e D). No entanto, ao observarmos o tratamento com 6Gy, as condições com ambas as variantes possuem maior sensibilidade à irradiação, quando comparadas à condição WT, sendo a condição com a variante E506\* a que apresentou maior sensibilidade ( $p < 0,0001$ ) (Figura 21C e D).



**Figura 21.** Avaliação da capacidade clonogênica nas linhagens MCF10AneoT e KTMBE na presença de variantes em *MRE11*. **A** – Representação do ensaio clonogênico para a linhagem MCF10AneoT com a superexpressão das construções de *MRE11* WT ou na presença das variantes E506\* e R576\*, em diferentes doses de tratamento de irradiação (Gy). UT = sem tratamento. **B** – Representação gráfica da capacidade clonogênica de MCF10AneoT frente às diferentes doses de tratamento com irradiação (Gy) quando superexpressa com as construções *MRE11* WT ou na presença das variantes E506\* e R576\*. Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. Foram considerados significativos  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). **C** – Representação do ensaio clonogênico para a linhagem KTMBE com a superexpressão das construções de *MRE11* WT ou na presença das variantes E506\* e R576\*, em diferentes doses de tratamento de irradiação (Gy). UT = sem tratamento. **D** – Representação gráfica da capacidade clonogênica de KTMBE frente às diferentes doses de tratamento com irradiação (Gy) quando

superexpressa com as construções MRE11 WT ou na presença das variantes E506\* e R576\*. Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. Foram considerados significativos  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*) e  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*), a partir de três experimentos independentes.

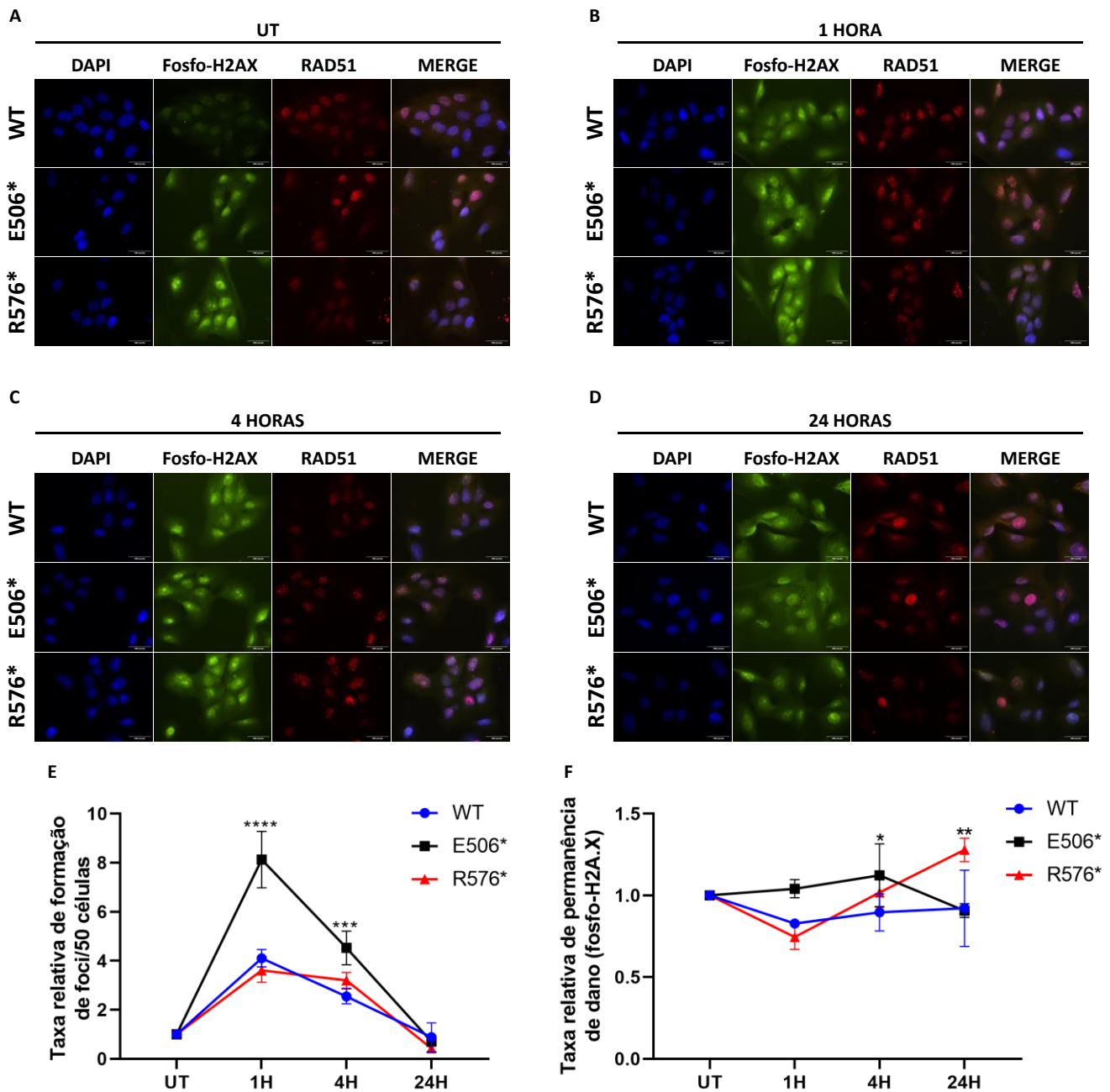
#### **5.2.4.4. Avaliação de reparo de danos do DNA por imunofluorescência: formação de *foci* (RAD51) e permanência de dano (p-H.2AX) na presença de variantes em MRE11**

Para avaliar a capacidade de reparo no DNA, avaliamos número de *foci* (RAD51) por célula e permanência de dano (p-H2A.X) utilizando abordagens de imunofluorescência. As Figuras 22 e 23 evidenciam imagens representativas e gráficos referentes à quantificação de fluorescência do ensaio.

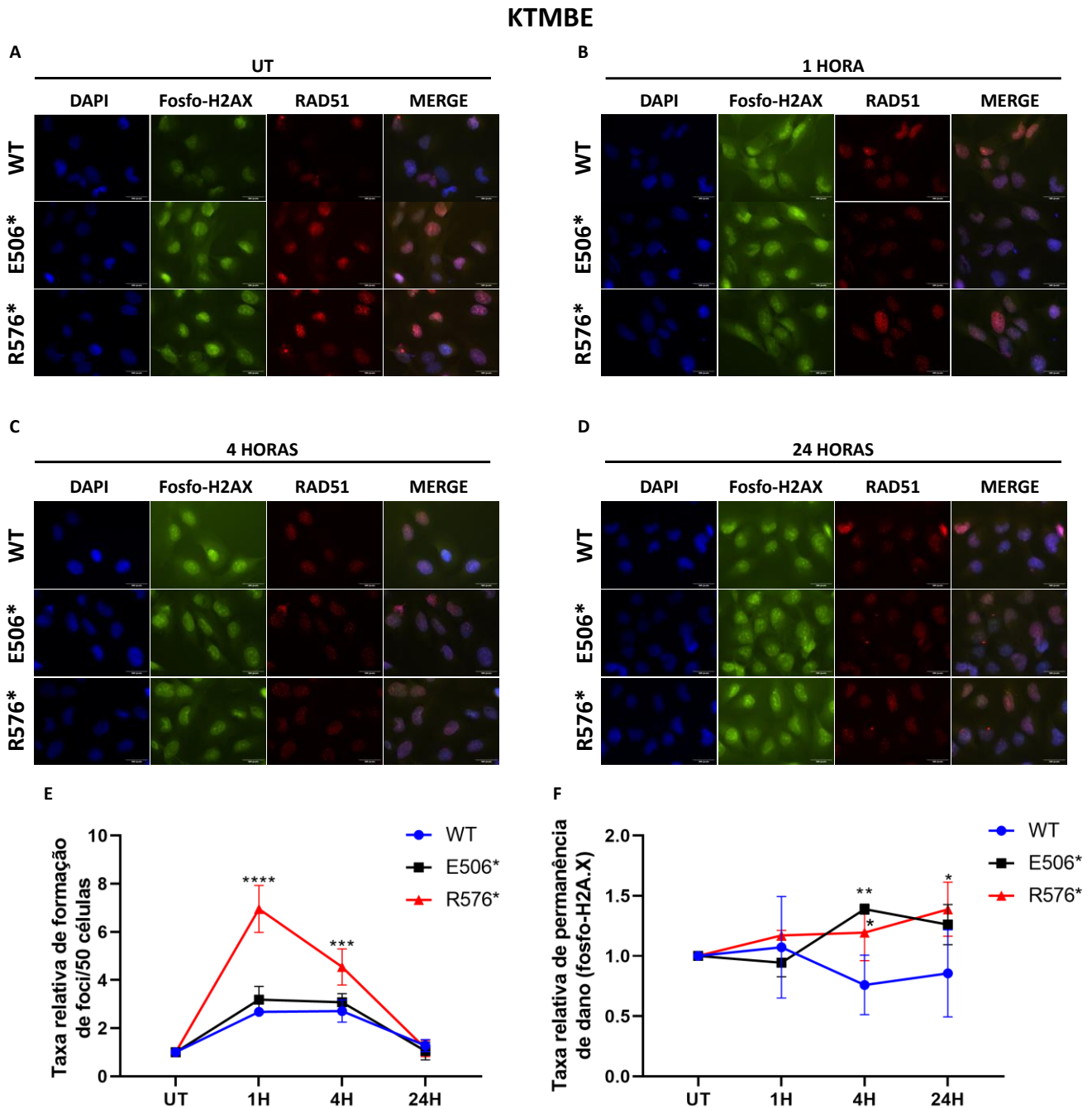
Os resultados na linhagem MCF10AneoT demonstram que, na presença da variante E506\*, há o aumento o número de *foci* de RAD51 nos tempos de 1 ( $p < 0,0001$ ) e 4 horas ( $p < 0,001$ ) após a irradiação, voltando a níveis semelhantes ao WT em 24 horas após a irradiação (Figura 22E). Ao analisarmos a permanência de danos na presença das variantes, observamos que na presença da variante E506\*, há um aumento de dano 4 horas após a irradiação ( $p < 0,05$ ), mas que em 24 horas esse dano é resolvido, quando comparamos à condição WT. Já para a variante R576\* há uma tentativa de resolução de danos nas primeiras horas após a irradiação, no entanto esse dano é aumentado em 24 horas em relação à MRE11 WT ( $p < 0,005$ ) (Figura 22F).

Para KTMBE (Figura 23), observamos que, na presença das variantes, há o aumento o número de *foci* de RAD51 nos tempos de 1 e 4 horas após irradiação, e o número de *foci* diminui, voltando a níveis semelhantes ao WT em 24 horas após a irradiação (Figura 23E). Por outro lado, quando consideramos a condição WT, observamos a queda dos níveis de p-H2A.X, nos indicando a resolução do dano. Ao fazermos a mesma análise com as variantes, observamos que há permanência de dano nas condições em que as variantes E506\* e R576\* estão presentes (Figura 23F). Encontramos significância estatística para a presença variante R576\* nos tempos de 1 ( $p < 0,01$ ), 4 ( $p < 0,0005$ ) e 24 horas ( $p < 0,0001$ ) após a irradiação, e para a variante E506\* nos tempos de 4 ( $p < 0,0005$ ) e 24 horas ( $p < 0,0005$ ) após a irradiação, quando comparadas à condição WT.

## MCF10AneoT



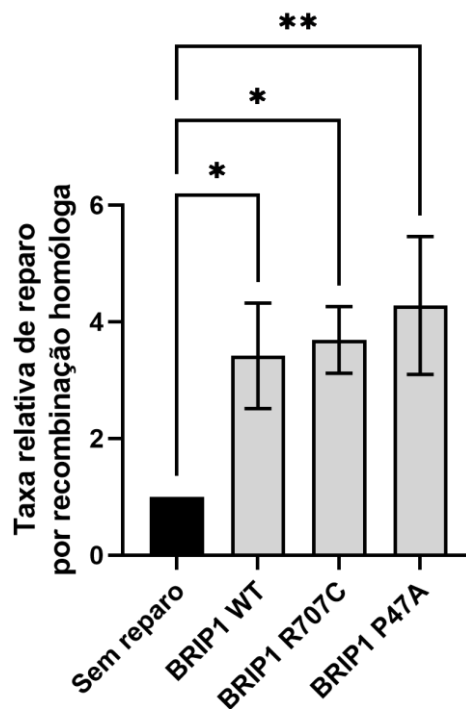
**Figura 22.** Avaliação da capacidade de reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga com MRE11 WT ou na presença das variantes E506\* e R576\* na linhagem MCF10AneoT (barra de escala = 300 pixels). Avaliação da formação de *foci* (RAD51) e permanência de dano (p-H2A.X), além da marcação de DAPI, sem irradiação (UT) (**A**), 1 hora (**B**), 4 horas (**C**) e 24 horas (**D**) após a irradiação por 2Gy. **E** – Representação gráfica do número de *foci* de RAD51 por 50 células, nas condições MRE11 WT ou com as variantes E506\* e R576\*, UT, após 1, 4 e 24 horas de tratamento. **F** – Representação gráfica da permanência de danos por fosfo-H.2AX, nas condições MRE11 WT ou com as variantes E506\* e R576\*, UT, após 1, 4 e 24 horas de tratamento. Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. As diferenças estatísticas entre condições foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).



**Figura 23.** Avaliação da capacidade de reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga com MRE11 WT ou na presença das variantes E506\* e R576\* na linhagem celular KTMBE (barra de escala = 300 pixels). Avaliação da formação de *foci* (RAD51) e permanência de dano (p-H2A.X), além da marcação de DAPI, sem irradiação (UT) (A), 1 hora (B), 4 horas (C) e 24 horas (D) após a irradiação por 2Gy. E – Representação gráfica do número de *foci* de RAD51 por 50 células, nas condições MRE11 WT ou com as variantes E506\* e R576\*, UT, após 1, 4 e 24 horas de tratamento. F – Representação gráfica da permanência de danos por fosfo-H.2AX, nas condições MRE11 WT ou com as variantes E506\* e R576\*, UT, após 1, 4 e 24 horas de tratamento. Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. As diferenças estatísticas entre condições foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

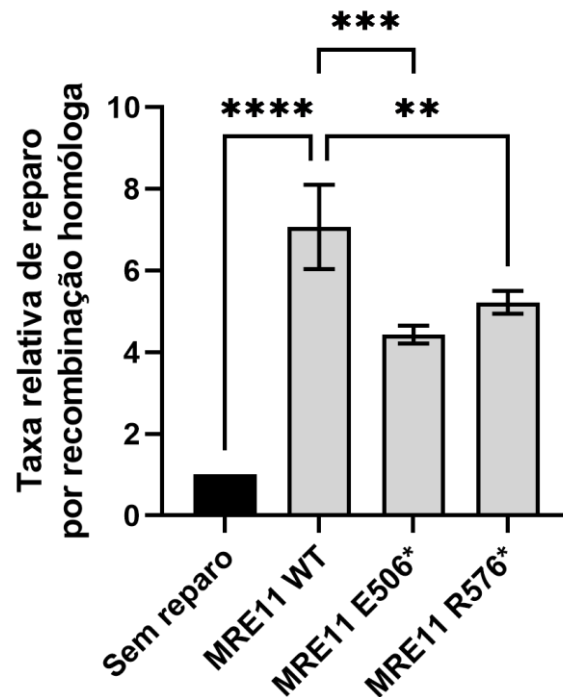
#### 5.2.4.5. Avaliação de reparo de danos do DNA por restauração de fluorescência: taxa de reparo por RH na presença de variantes em *BRIP1* e *MRE11*

Na avaliação da taxa de reparo do DNA por RH, na presença de variantes em *BRIP1*, notamos que todas as condições (WT ou com as variantes R707C e P47A) apresentaram diferenças significativas na taxa de reparo, em relação à condição considerada sem reparo (Figura 24). Vale ressaltar que *BRIP1* com as variantes R707C (média = 3,69) e P47A (patogênica) (média = 4,28) não apresentaram diferença estatística em relação à taxa de reparo de *BRIP1* WT (média = 3,42).



**Figura 24.** Taxa relativa de reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga na presença de variantes em *BRIP1*. A condição sem reparo foi considerada = 1 (barra preta) e as demais condições (*BRIP1* WT ou com as variantes R707C e P47A) foram relativizadas à condição sem reparo. Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*).

Ao avaliarmos a taxa de reparo ao DNA por RH na presença de variantes em *MRE11*, observamos que todas as condições com as variantes E506\* (média = 4,43) e R576\* (média = 5,22) apresentaram diferença estatística em relação à condição WT (média = 7,07) –  $p < 0,005$  e  $p < 0,001$ , respectivamente – (Figura 25). Vale ressaltar que todas as condições WT ( $p < 0,0001$ ) ou com as variantes E506\* ( $p < 0,001$ ; estatística não demonstrada graficamente) e R576\* ( $p < 0,0001$ ; estatística não demonstrada graficamente) apresentaram diferença estatística significativa em relação à condição em que não há reparo (sem reparo).

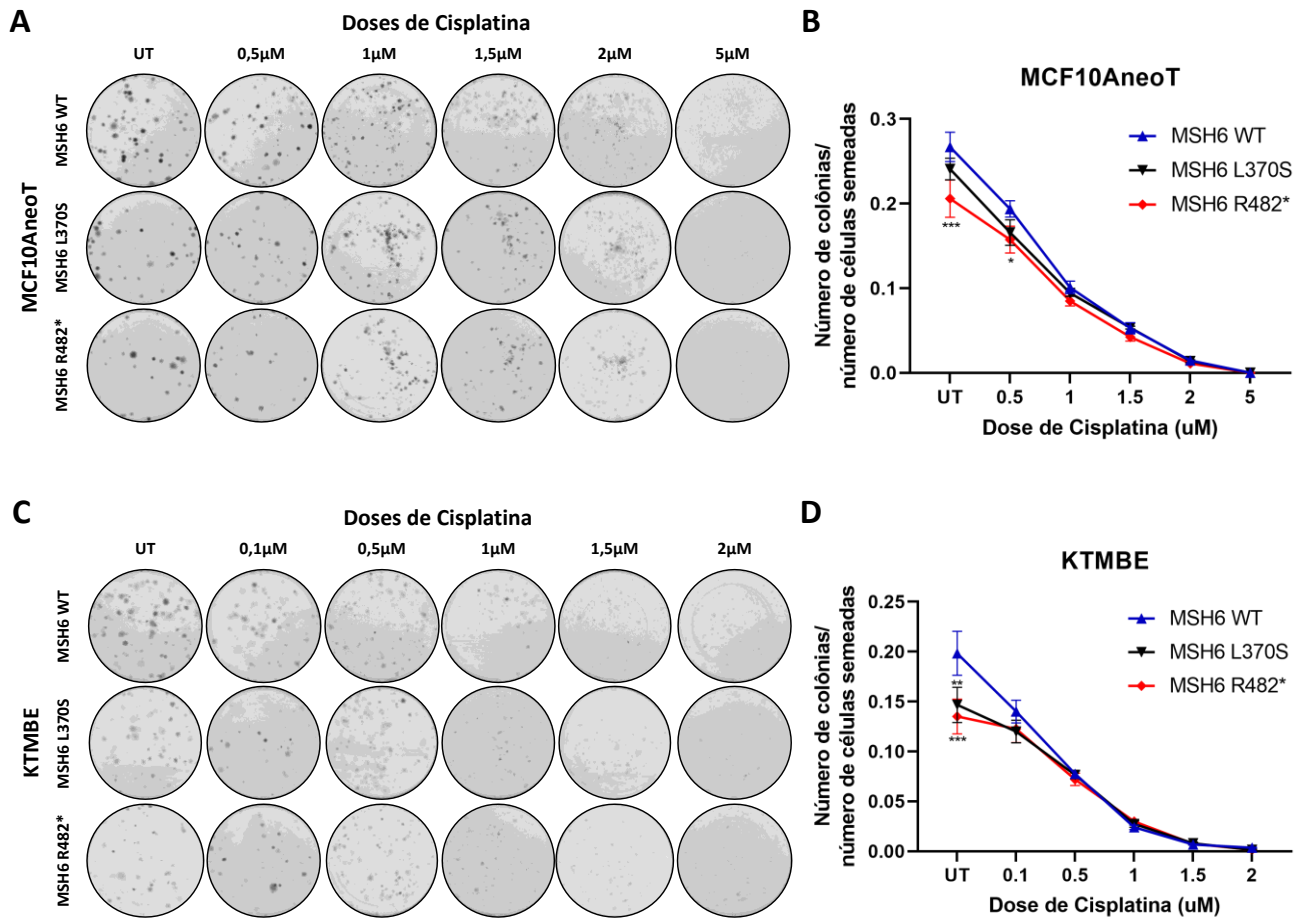


**Figura 25.** Taxa relativa de reparo de danos ao DNA por recombinação homóloga na presença de variantes em *MRE11*. A condição sem reparo foi considerada = 1 (barra preta) e as demais condições (*MRE11* WT ou com as variantes E506\* e R576\*) foram relativizadas à condição sem reparo. Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$  (\*);  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

#### 5.2.4.6. Avaliação da capacidade clonogênica na presença de variantes em *MSH6*

Ao avaliarmos a capacidade de formar colônias na linhagem MCF10AneoT superexpressando *MSH6* WT ou com as variantes L370S e R482\*, observamos que, apenas a variante R482\* (sabidamente patogênica) teve uma diferença significativa normais (UT) ou com uma baixa dose de cisplatina (0,5  $\mu$ M) quando comparada à condição WT. Já a variante L370S (de interesse) se assemelha à condição WT, independente de tratamento.

Para a linhagem KTMBE, observamos diferença significativa na capacidade de formar colônias para ambas as variantes, quando comparadas à condição WT, apenas para as células não tratadas (L370S  $p < 0,005$  e R482\*  $p < 0,001$ ) (Figura 26C e D).

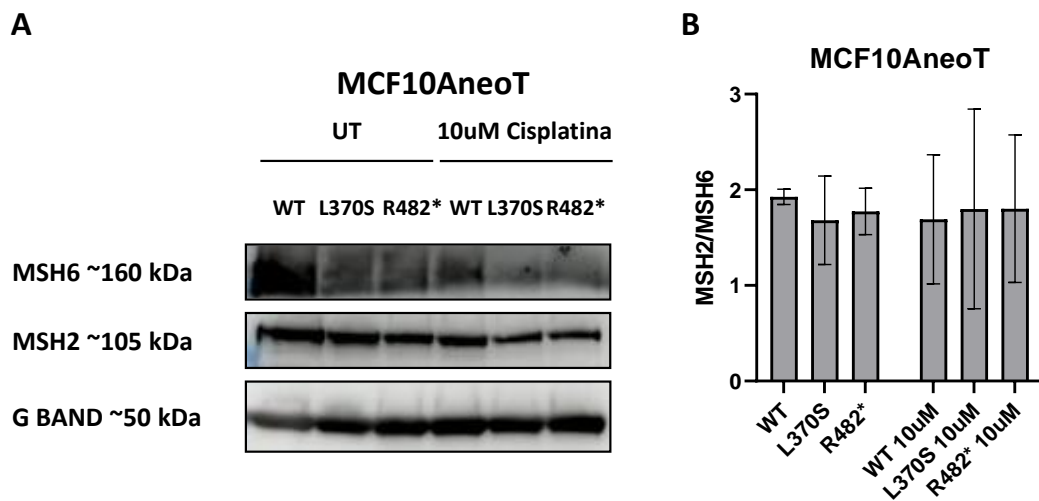


**Figura 26.** Avaliação da capacidade clonogênica nas linhagens MCF10AneoT e KTMBE na presença de variantes em *MSH6*. **A** – Representação do ensaio clonogênico para a linhagem MCF10AneoT com a superexpressão das construções de MSH6 WT ou na presença das variantes L370S e R482\*, em diferentes doses de tratamento de irradiação (Gy). UT = sem tratamento. **B** – Representação gráfica da capacidade clonogênica de MCF10AneoT frente às diferentes doses de tratamento com irradiação (Gy) quando superexpressa com as construções MSH6 WT ou na presença das variantes L370S e R482\*. Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. Foram considerados significativos  $p < 0,05$  (\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). **C** – Representação do ensaio clonogênico para a linhagem KTMBE com a superexpressão das construções de MSH6 WT ou na presença das variantes L370S e R482\*, em diferentes doses de tratamento de irradiação (Gy). UT = sem tratamento. **D** – Representação gráfica da capacidade clonogênica de KTMBE frente às diferentes doses de tratamento com irradiação (Gy) quando superexpressa com as construções MSH6 WT ou na presença das variantes L370S e R482\*. Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. Foram considerados significativos  $p < 0,005$  (\*\*) e  $p < 0,001$  (\*\*\*). Foram realizados três experimentos independentes.

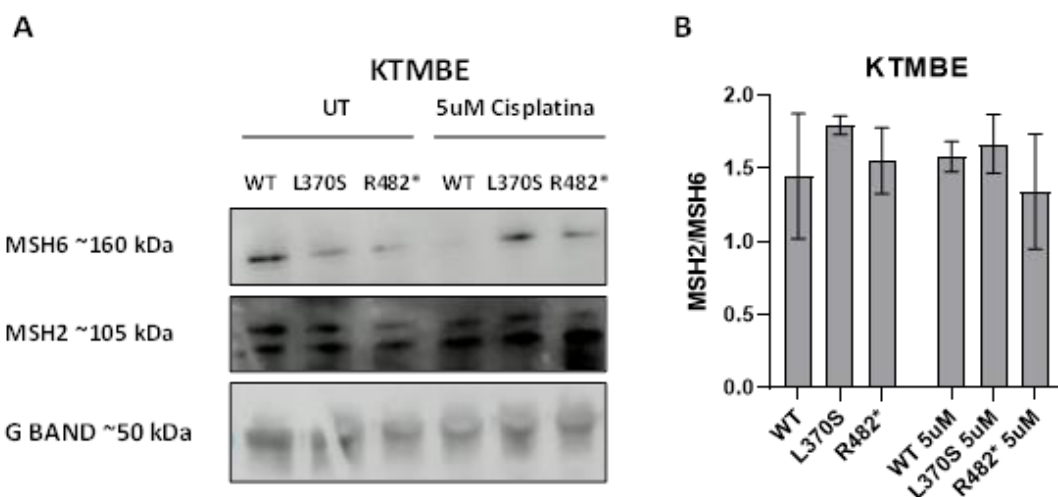
#### 5.2.4.7. Avaliação da capacidade de formação do heterodímero MSH2-MSH6 na presença de variantes em *MSH6*

Para a avaliação da formação do heterodímero MSH2-MSH6 realizamos o ensaio de imunoprecipitação. Não foram observadas diferenças estatísticas significantes para as condições

normais (UT), ou com a indução de dano causado pela Cisplatina, tanto para as análises na linhagem MCF10AneoT (Figura 27), quanto para a linhagem KTMBE (Figura 28).



**Figura 27.** Análise de capacidade de formação do heterodímero MSH2-MSH6 por imunoprecipitação para a linhagem MCF10AneoT. Foram avaliadas as proteínas MSH6 (~160kDa), MSH2 (~105kDa) e Banda G (~50kDa). **A** – Western Blot (WB) para expressão de MSH2 e MSH6 após a técnica de imunoprecipitação para as condições MSH6 WT ou na presença das variantes L370S e R482\*, sem tratamento (UT) ou com o tratamento com 10 $\mu$ M de cisplatina como agente causador de dano. **B** – Quantificação de área das bandas presentes no WB e cálculo da taxa de MSH2 em relação à MSH6, nas condições MSH6 WT ou na presença das variantes L370S e R482\*, sem tratamento (UT) ou com o tratamento com 10 $\mu$ M de cisplatina como agente causador de dano. Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. Foram realizados dois experimentos independentes.



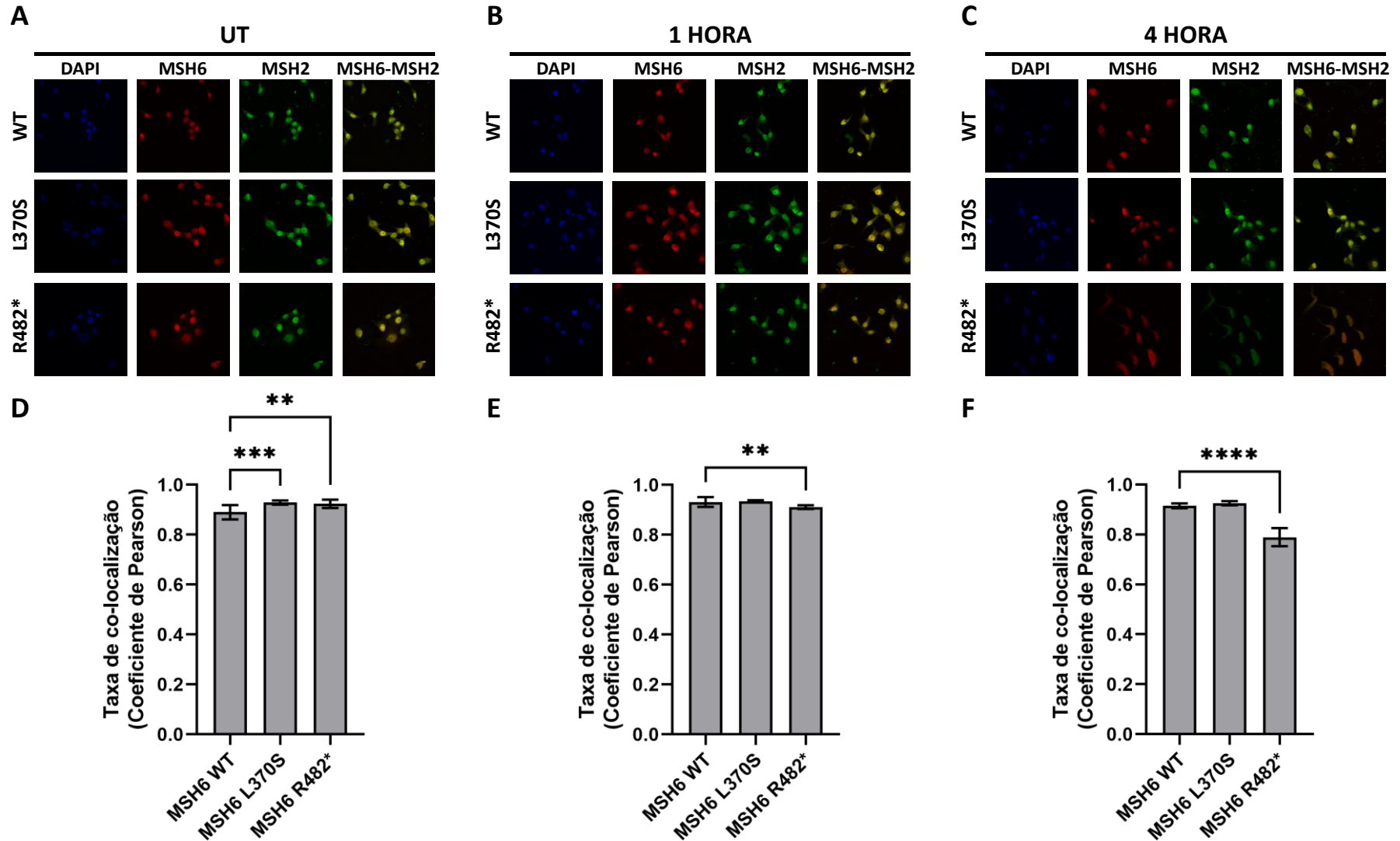
**Figura 28.** Análise de capacidade de formação do heterodímero MSH2-MSH6 por imunoprecipitação para a linhagem KTMBE. Foram avaliadas as proteínas MSH6 (~160kDa), MSH2 (~105kDa) e Banda G (~50kDa). **A** – Western Blot (WB) para expressão de MSH2 e MSH6 após a técnica de imunoprecipitação para as condições MSH6 WT ou na presença das variantes L370S e R482\*, sem tratamento (UT) ou com o tratamento com 5 $\mu$ M de cisplatina como agente causador de dano. **B** – Quantificação de área das bandas presentes no WB e cálculo da taxa de MSH2 em relação à MSH6,

nas condições MSH6 WT ou na presença das variantes L370S e R482\*, sem tratamento (UT) ou com o tratamento com 5 $\mu$ M de cisplatina como agente causador de dano. Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. Foram realizados dois experimentos independentes.

#### **5.2.4.8. Avaliação da capacidade de co-localização de MSH2-MSH6 na presença de variantes em MSH6**

Para avaliar a co-localização de MSH2-MSH6 após o dano, superexpressamos as construções contendo a sequência de MSH6 WT ou com as variantes L370S e R482\*. Induzimos um dano agudo com cisplatina (10 $\mu$ M) e avaliamos a co-localização das 2 proteínas nas condições sem o dano, 1 e 4 horas após o dano (Figura 29).

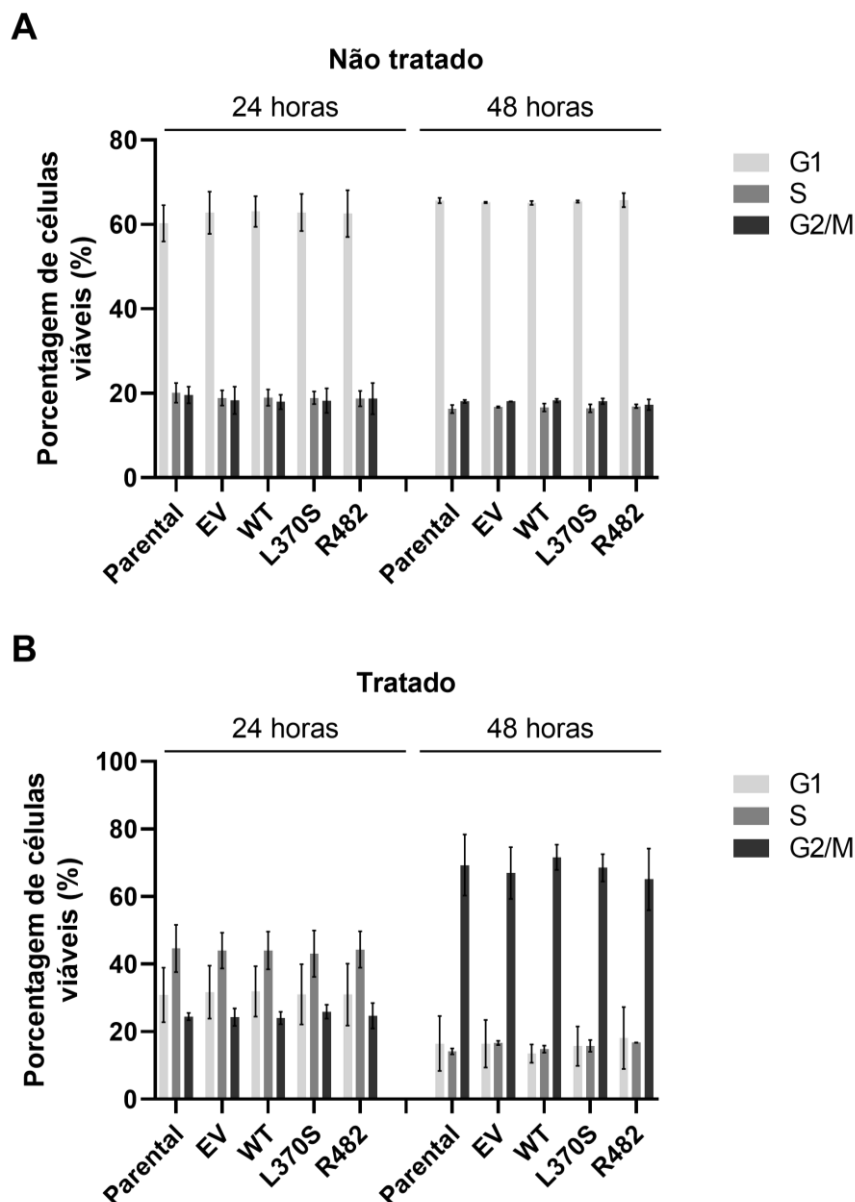
Na condição em que não houve dano (sem tratamento com cisplatina), observamos que a presença das variantes L370S e R482\* aumenta a co-localização das proteínas MSH2 e MSH6, em relação à MSH6 WT (Figura 29A e D). Quando avaliamos as condições 1 e 4 horas após o dano com cisplatina, observamos que a presença da variante L370S em MSH6 não interfere seu nível de co-localização com MSH2 em relação à proteína WT (Figura 29B, C, E e F). Já a presença da variante R482\* em MSH6 diminui a co-localização da proteína MSH2 (Figura 29B, C, E e F), sendo que no tempo de 4 horas após o dano, essa co-localização apresenta menores níveis, quando comparada à MSH6 WT (Figura 29C e F).



**Figura 29.** Avaliação da co-localização das proteínas MSH2-MSH6 na linhagem celular T-47D superexpressando MSH6 WT ou com as variantes L370S e R482\*. Representação das condições não tratadas (**A**), 1 hora (**B**) e 4 horas (**C**) após o tratamento com cisplatina (10 $\mu$ M), para MSH6 WT ou na presença das variantes L370S e R482\*. Estão demonstradas as marcações de DAPI, MSH6, MSH2 e a combinação de MSH2-MSH6. Representação gráfica da quantificação através do cálculo do Coeficiente de Pearson para a co-localização das proteínas MSH2-MSH6 nas condições sem tratamento (**D**), 1 hora (**E**) e 4 horas (**F**) após o tratamento com cisplatina (10 $\mu$ M). Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. Foram considerados significantes as diferenças com  $p < 0,05$ , com  $p < 0,005$  (\*\*),  $p < 0,0005$  (\*\*\*),  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

### 5.2.4.9. Análise de ciclo celular na presença de variantes em *MSH6*

A análise das fases do ciclo celular na linhagem T-47D parental, contendo a construção pCI-neo (EV), ou as construções de *MSH6* WT e com as variantes L370S e R482\*, foi realizada nos tempos de 24 e 48 horas, na presença ou ausência do indutor de dano, cisplatina (Figura 30). Nas condições sem o tratamento com cisplatina, os ciclos permaneceram com pico na fase G1 (Figura 30A). Com a utilização da Cisplatina, em 24 horas observamos um aumento da fase S e, 48 horas após o tratamento, observamos uma parada na fase G2/M (Figura 30B). Nenhuma diferença estatística foi observada entre as condições avaliadas.

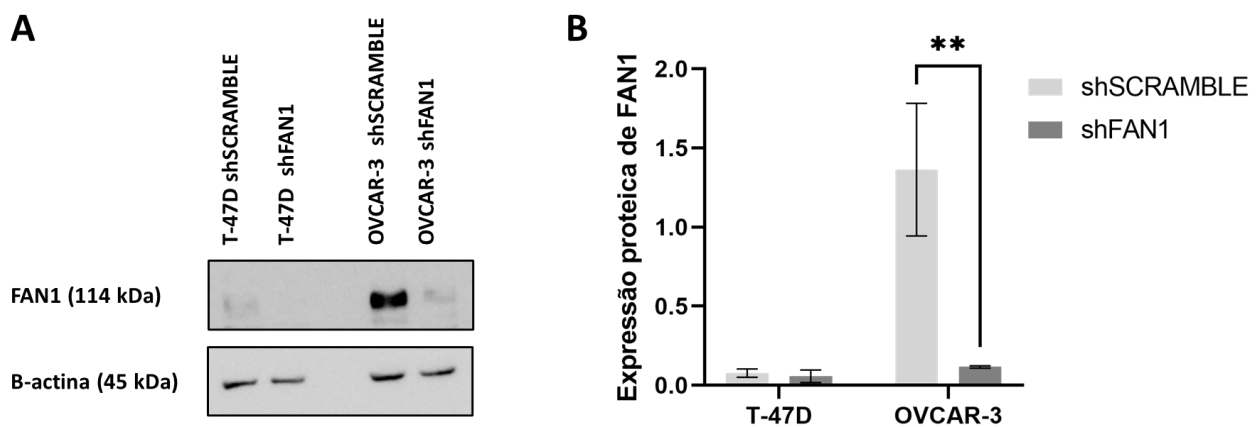


**Figura 30.** Análise das fases do ciclo celular na linhagem T-47D na presença de variantes em *MSH6*. Avaliação do ciclo celular em 24 e 48 horas na ausência (A) ou presença (B) de um agente indutor de danos (Cisplatina) para a linhagem T-47D parental, a construção de pCI-neo (EV), ou as construções de *MSH6* WT e com as variantes L370S e R482\*.

### 5.3. Etapa II – Edição gênica e ensaios funcionais para as variantes consideradas VUS pelas predições *in silico*

#### 5.3.1. Edição Gênica: silenciamento do gene *FAN1* através do sistema *short hairpin RNA (shRNA)*

Após o *cell sorting*, a análise do clone obtido da linhagem T47-D não evidenciou uma alteração na expressão da proteína FAN1 na linhagem controle (*shSCRAMBLE*) comparado à linhagem silenciada (*shFAN1*). Para as linhagens OVCAR-3, observamos uma diminuição significativa na expressão de FAN1 ( $p < 0,005$ ) após o silenciamento (*shFAN1*), quando comparamos ao controle (*shSCRAMBLE*) (Figura 31B). Os resultados demonstram ainda um maior nível de expressão basal da proteína FAN1 na linhagem T-47D comparado à linhagem OVCAR-3.



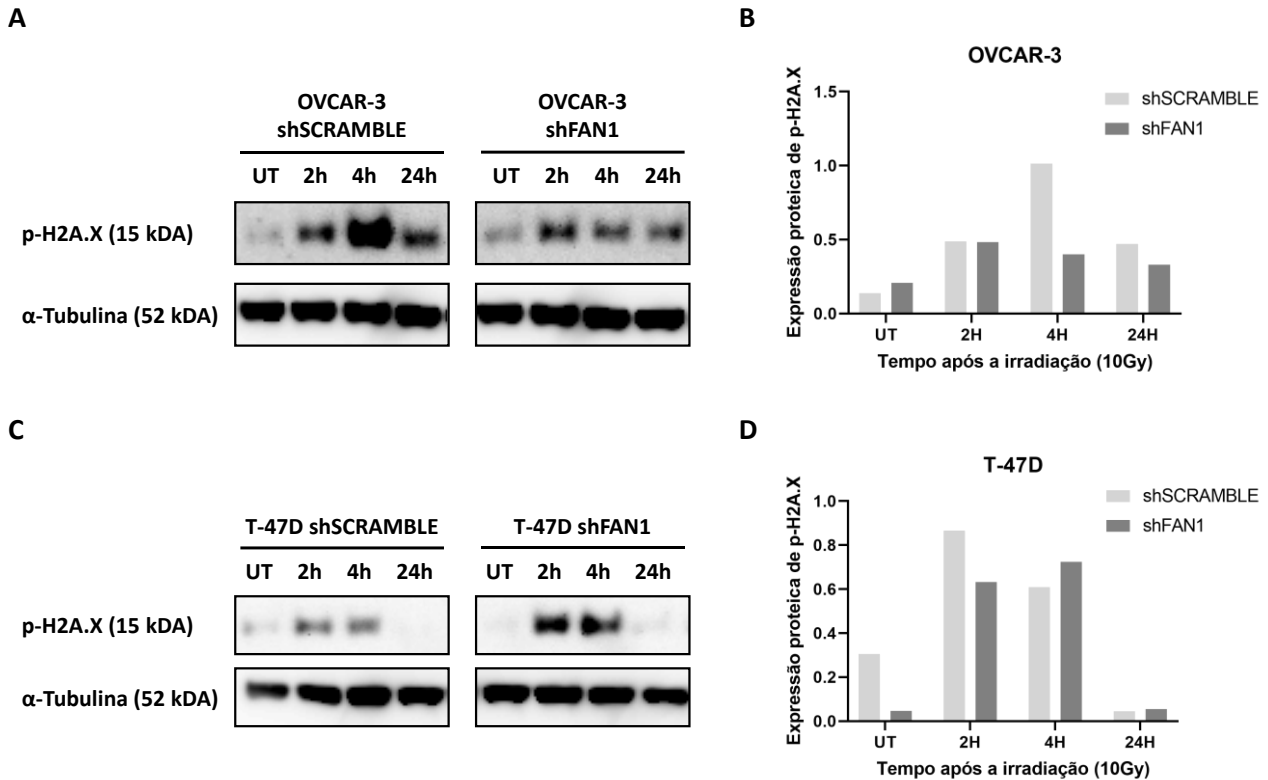
**Figura 31.** Avaliação da expressão proteica de FAN1 (~114 kDa) nas linhagens T-47D e OVCAR-3 após o silenciamento com *shRNA*. **A** – Imagem representativa da expressão proteica de FAN1 (~114 kDa) e da proteína endógena  $\beta$ -Actina (~37 kDa) nas linhagens controle (*shSCRAMBLE*) e silenciadas (*shFAN1*) de T-47D e OVCAR-3. **B** – Representação gráfica da expressão proteica de FAN1 (~114 kDa) após a normalização pela expressão da proteína endógena  $\beta$ -Actina (~37 kDa) nas linhagens controle (*shSCRAMBLE*) e silenciadas (*shFAN1*) de T-47D e OVCAR-3. Foram consideradas significantes as diferenças com  $p < 0,05$ (\*);  $p < 0,005$ (\*\*).

#### 5.3.2. Análise de permanência de danos ao DNA (p-H2A.X) em diferentes tempos após a irradiação

Para avaliar a permanência do dano ao DNA, analisamos a expressão dos níveis de atividade da proteína p-H2AX. Para o modelo de ovário (OVCAR-3), foi possível verificar o pico de expressão 4 horas após a irradiação na condição controle (*shSCRAMBLE*), enquanto na linhagem silenciada para o gene *FAN1* (*shFAN1*), observou-se os mesmos níveis de expressão entre os tempos avaliados (Figura 32A e B). Também observamos a expressão de p-H2A.X 24 horas após a irradiação nas condições *FAN1* silenciada (*shFAN1*) e controle (*shSCRAMBLE*) (Figura 32A e B).

Para o modelo mamário (T-47D) foi possível verificar um aumento da atividade de p-H2A.X ocorreu após os tempos de 2 e 4 horas da irradiação, principalmente na condição *FAN1* silenciada

(Figura 32C e D). A partir do nível de expressão obtido para a proteína p-H2A.X com esse ensaio, selecionamos os tempos de 4 e 2 horas para investigar a resposta ao dano no DNA para as linhagens OVCAR-3 e T-47D, respectivamente.

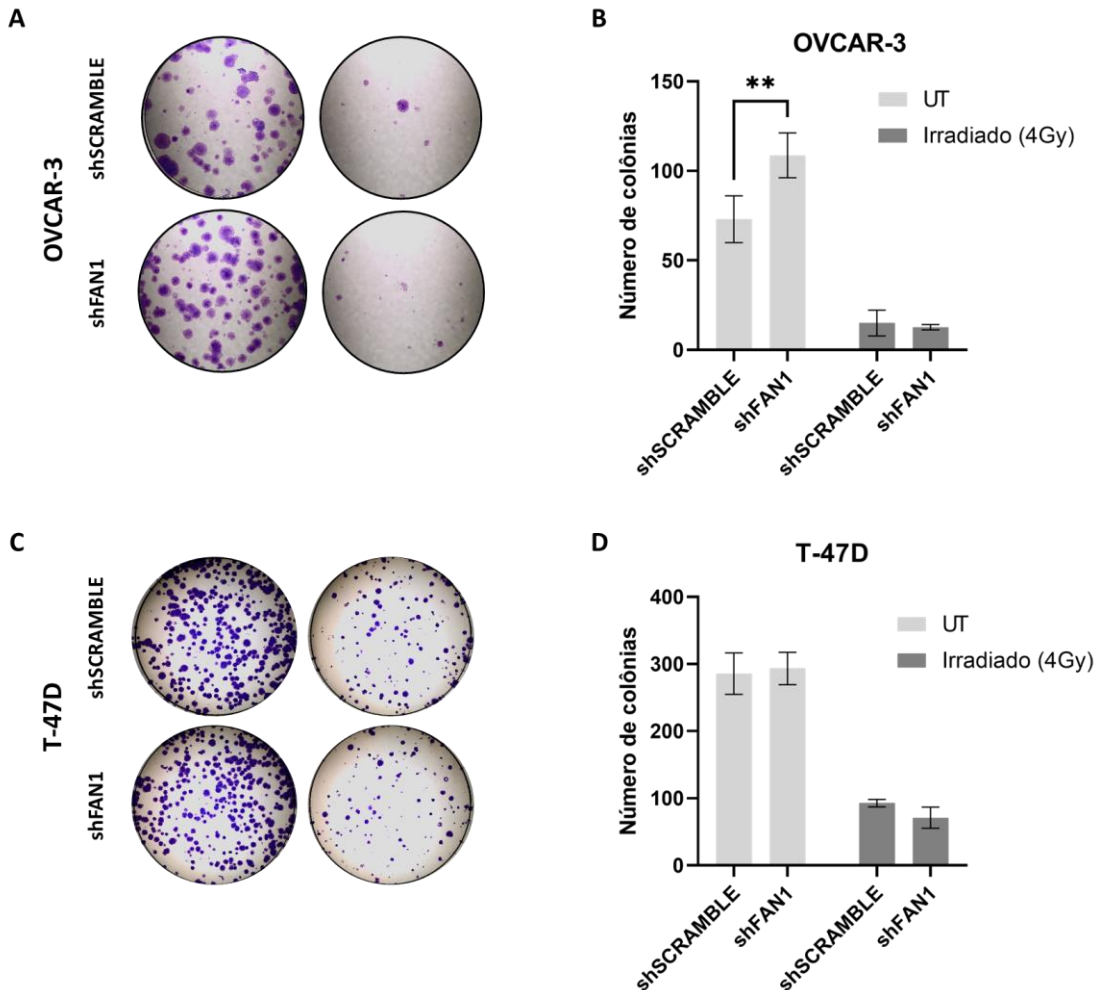


**Figura 32.** Avaliação de permanência de danos (p-H2A.X) ao longo do tempo nas linhagens OVCAR-3 e T-47D. **A** – Avaliação de permanência de danos na condição sem danos (UT) e nos tempos de 2, 4 e 24 horas após a irradiação (10Gy) na linhagem OVCAR-3 controle (*shSCRAMBLE*) e silenciada (*shFAN1*). **B** – Representação gráfica da expressão proteica de p-H2A.X (~15 kDa) após a normalização pela expressão da proteína endógena  $\alpha$ -Tubulina (~52 kDa) na condição sem danos (UT) e nos tempos de 2, 4 e 24 horas após a irradiação (10Gy) na linhagem OVCAR-3 controle (*shSCRAMBLE*) e silenciada (*shFAN1*). **C** – Avaliação de permanência de danos na condição sem danos e nos tempos 2, 4 e 24 horas após a irradiação (10Gy) na linhagem T-47D controle (*shSCRAMBLE*) e silenciada (*shFAN1*). **D** – Representação gráfica da expressão proteica de p-H2A.X (~15 kDa) após a normalização pela expressão da proteína endógena  $\alpha$ -Tubulina (~52 kDa) na condição sem danos (UT) e nos tempos de 2, 4 e 24 horas após a irradiação (10Gy) na linhagem T-47D controle (*shSCRAMBLE*) e silenciada (*shFAN1*).

### 5.3.3. Ensaio recuperação de radiosensibilidade (RRS) para linhagens editadas com *shRNA*

A capacidade de formar colônias após irradiação foi avaliada para ambas as linhagens celulares (OVCAR-3 e T-47D), nas condições silenciada (*shFAN1*) e controle (*shSCRAMBLE*). A capacidade de formar colônias foi reduzida em todas as condições quando submetidas à irradiação, confirmando a sensibilidade das linhagens a esse tipo de dano (Figura 33).

Para a linhagem OVCAR-3, foi possível observar um aumento na capacidade clonogênica na condição *shFAN1* em relação ao controle (*shSCRAMBLE*) (Figura 33A e B). Para a linhagem T-47D, não observamos diferenças estatísticas significantes entre as condições *shSCRAMBLE* e *shFAN1*, UT ou irradiadas (Figura 33C e D).

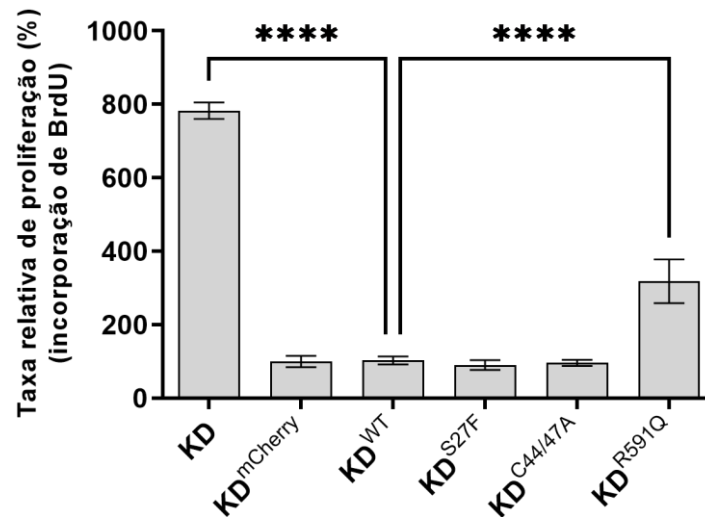


**Figura 33.** Análise da capacidade de recuperação à radiosensibilidade (RRS) nas linhagens OVCAR-3 e T-47D. Imagem representativa do ensaio de RRS para as condições sem irradiação e irradiadas (4Gy) nas linhagens OVCAR-3 (A) e T-47D (C). Representação gráfica da quantificação do número de colônias nas condições sem irradiação e irradiadas (4Gy) nas linhagens OVCAR-3 (B) e T-47D (D). Foram considerados significantes as diferenças com  $p < 0,05$  (\*), com  $p < 0,005$  (\*\*).

#### 5.3.4. Proliferação celular na linhagem OVCAR-3 na presença de variantes em *FAN1*

Na análise da proliferação das linhagens celulares OVCAR-3, consideramos a condição  $KD^{mCherry}$  como 100% e as taxas de proliferação foram calculadas em relação a ela. Isso se deu porque observamos que a presença de qualquer transfecção impactava na proliferação. Diante disso, observamos um aumento significativo na proliferação da condição *FAN1* KD em relação às demais condições (Figura 34). Quando comparamos a proliferação de OVCAR-3 na presença das variantes

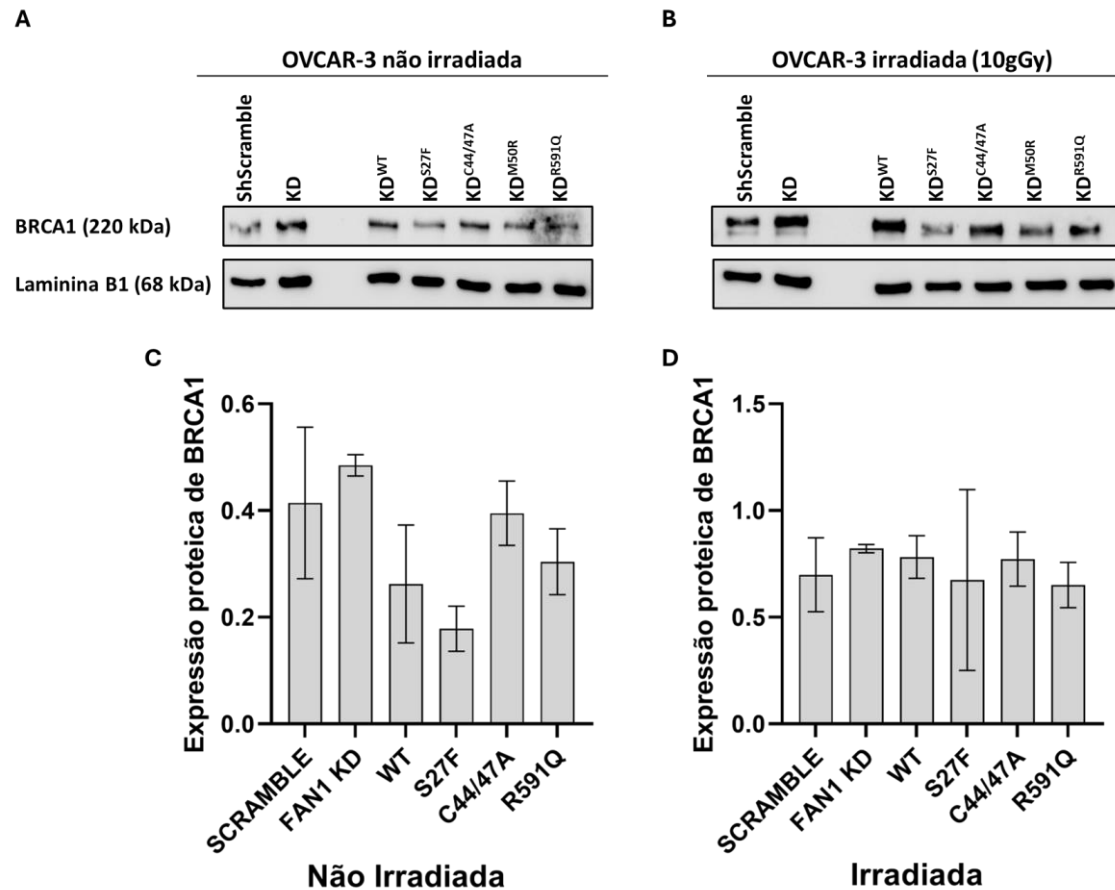
selecionadas com *FAN1* WT, observamos um aumento significativo da proliferação celular na presença da variante R591Q em *FAN1* (Figura 34). As condições *FAN1* KD e *FAN1* R591Q ainda apresentaram diferenças significativas de proliferação celular em relação ao controle KD mCherry (estatística não demonstrada graficamente; ambos com  $p < 0,0001$ ).



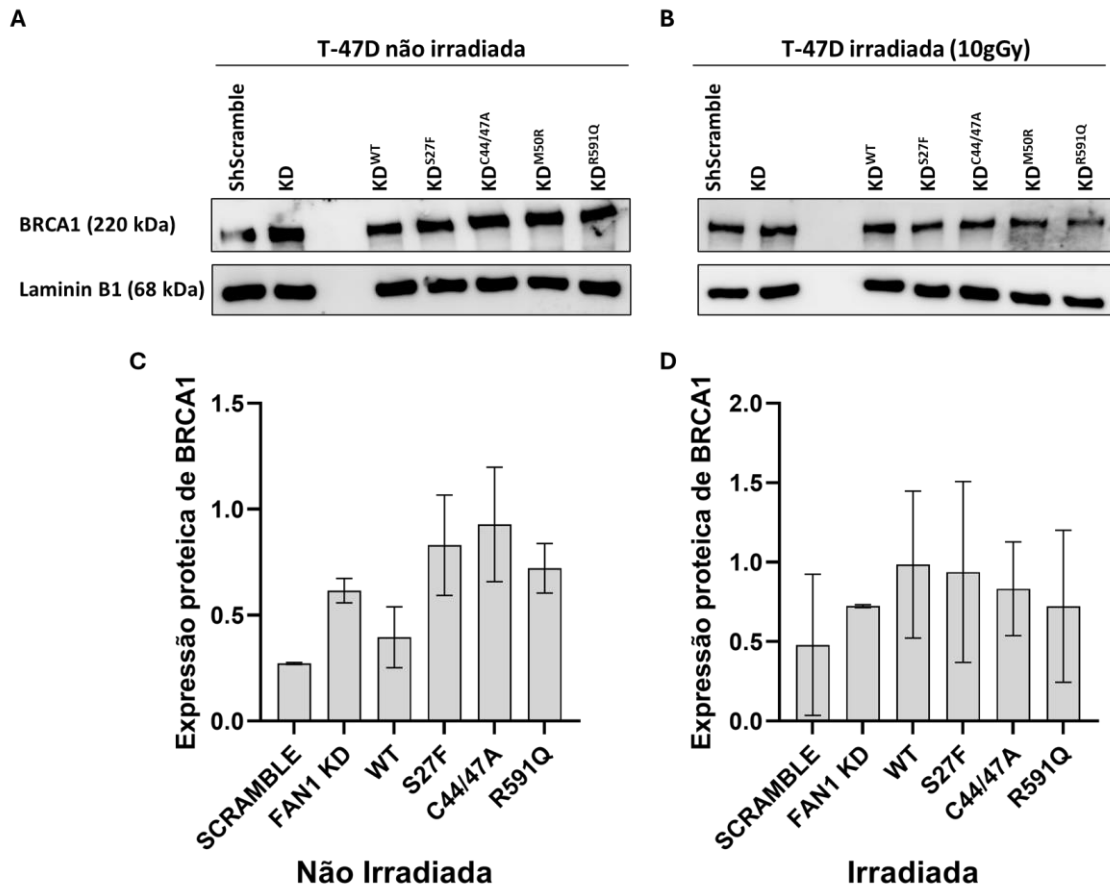
**Figura 34.** Taxa relativa de proliferação pelo método de incorporação de BrdU para *FAN1* na presença de variantes, na linhagem OVCAR-3. Foram avaliadas as condições da linhagem OVCAR-3 *knockdown* (KD), ou KD transfectada com as construções WT, na presença das variantes S27F, C44/47A ou R591Q, e transfectada com a construção pCI-neo-mCherry (utilizada como controle). A taxa relativa foi calculada de acordo com a condição OVCAR-3 *FAN1* KD transfectada com a construção pCI-neo-mCherry (considerada 100%). Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. Foram considerados significantes as diferenças com  $p < 0,05$ (\*);  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*).

### 5.3.5. Análise de reparo de danos ao DNA por Recombinação Homóloga (RH) na presença de variantes em *FAN1*

Foi realizada a análise de expressão das proteínas BRCA1 e RAD51, envolvidas na via de reparo por RH, bem como da proteína *FAN1*, nas linhagens OVCAR-3 e T-47D na presença de variantes em *FAN1*. Na avaliação da atividade de BRCA1, não observamos diferença estatística significativa entre as condições avaliadas, quando comparadas à condição *FAN1* WT, nas condições com ou sem indução de dano, tanto na linhagem OVCAR-3 (Figura 35), quanto na linhagem T-47D (Figura 36).

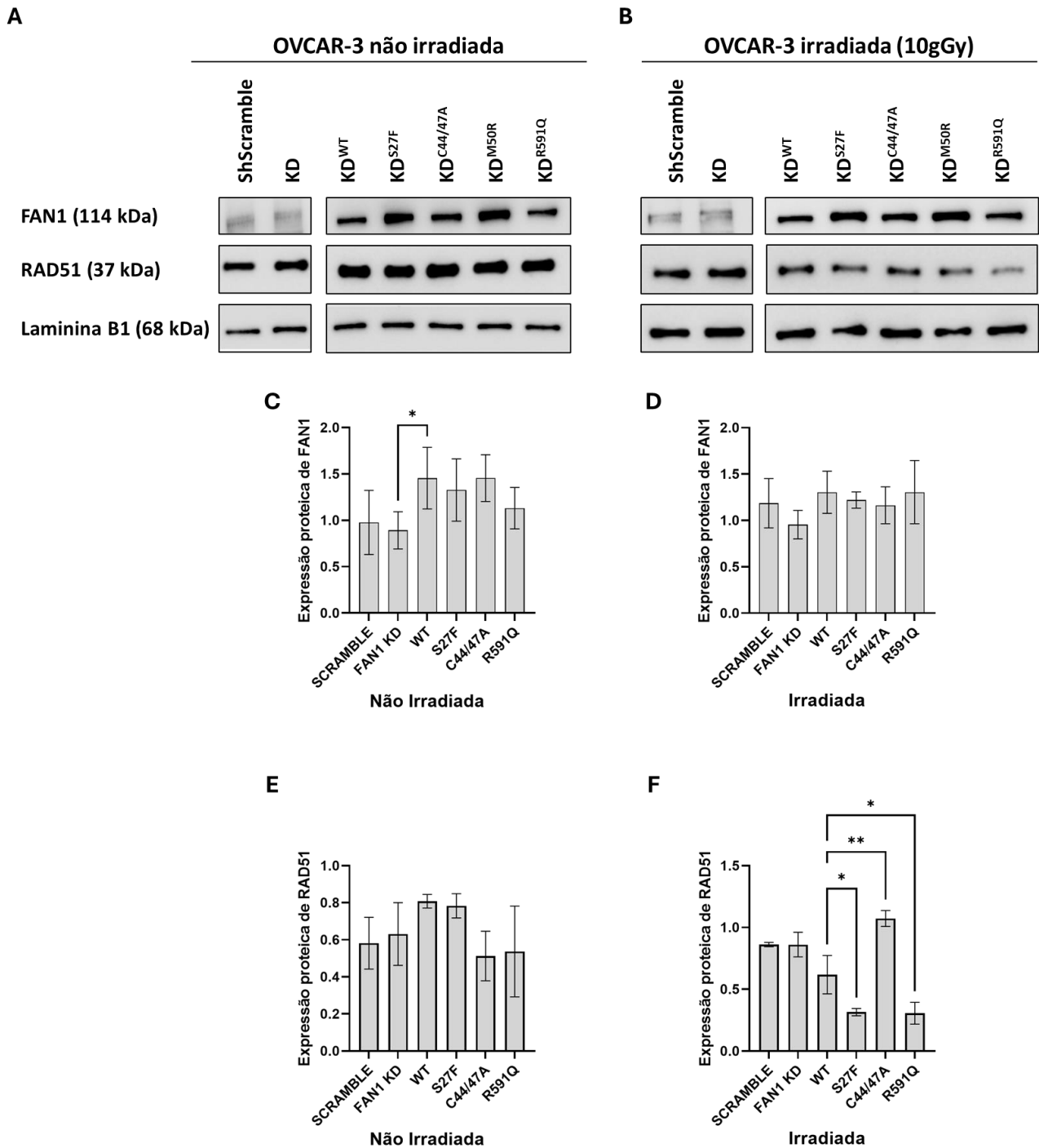


**Figura 35.** Avaliação da expressão de BRCA1 na linhagem OVCAR-3 na presença de variantes em *FAN1*. Imagem representativa da expressão proteica de BRCA1 (~220 kDa) e da proteína endógena Laminina B1 (~68 kDa) nas condições sem irradiação (**A**) e irradiadas (10Gy) (**B**). Representação gráfica da expressão proteica de BRCA1 (~220 kDa) após a normalização pela expressão do endógeno Laminina B1 (~68 kDa) nas condições sem irradiação (**C**) e irradiadas (10Gy) (**D**). Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. Foram considerados significantes as diferenças com  $p < 0,05$  (\*). A variante M50R foi excluída das análises desse trabalho por não fazer parte da amostra de estudo.



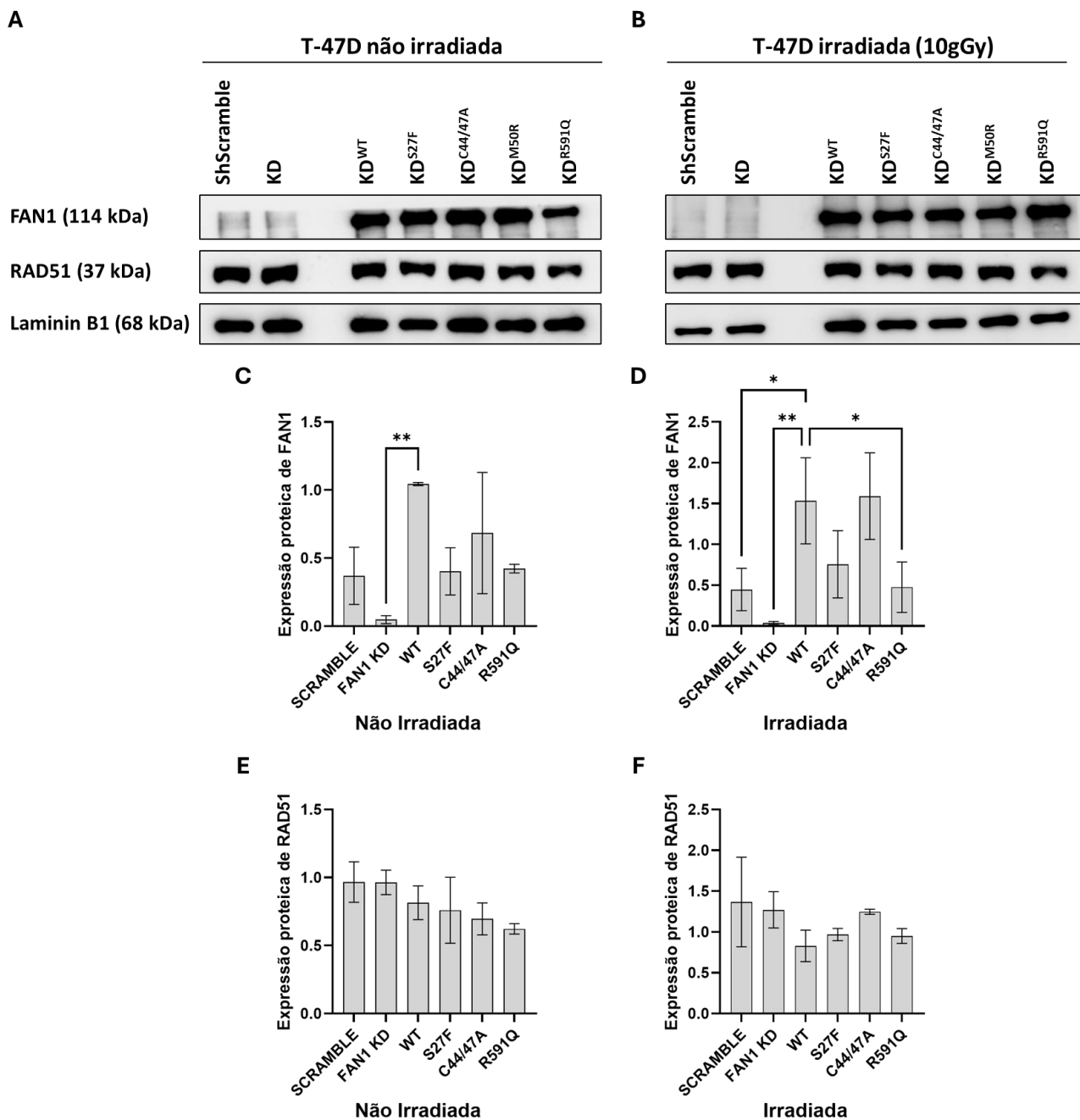
**Figura 36.** Avaliação da expressão de BRCA1 na linhagem T-47D na presença de variantes em *FAN1*. Imagem representativa da expressão proteica de BRCA1 (~220 kDa) e da proteína endógena Laminina B1 (~68 kDa) nas condições sem irradiação (**A**) e irradiadas (10Gy) (**B**). Representação gráfica da expressão proteica de BRCA1 (~220 kDa) após a normalização pela expressão do endógeno Laminina B1 (~68 kDa) nas condições sem irradiação (**C**) e irradiadas (10Gy) (**D**). Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. Foram considerados significantes as diferenças com  $p < 0,05$  (\*). A variante M50R foi excluída das análises desse trabalho por não fazer parte da amostra de estudo.

As expressões proteicas de *FAN1* e de *RAD51*, também foram avaliadas nas condições com e sem indução de dano. Para a linhagem OVCAR-3 (Figura 37), em condições normais (sem irradiação), observamos uma diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na atividade de *FAN1* para a condição *FAN1* KD, em comparação à *FAN1* WT (Figura 37A e C). Quando as células não irradiadas, não observamos diferenças estatísticas (Figura 37B e D). Para a atividade de *RAD51*, não observamos diferenças na ausência do dano (irradiação) (Figura 37A e E). Para as células irradiadas, observamos uma diminuição significativa na expressão proteica de *RAD51* nas condições *FAN1* S27F e *FAN1* R591Q ( $p < 0,05$  para ambas), quando comparadas à condição *FAN1* WT (Figura 37B e F). Já para a condição *FAN1* C44/47A, a atividade de *RAD51* aumentou ( $p < 0,01$ ), em relação à condição *FAN1* WT (Figura 37B e F).



**Figura 37.** Avaliação da expressão de FAN1 e RAD51 na linhagem OVCAR-3 na presença de variantes em *FAN1*. Imagem representativa da expressão proteica de FAN1 (~114 kDa), RAD51 (~37 kDa) e da proteína endógena Laminina B1 (~68 kDa) nas condições sem irradiação (**A**) e irradiadas (10Gy) (**B**). Representação gráfica da expressão proteica de FAN1 (~114 kDa) após a normalização pela expressão do endógeno Laminina B1 (~68 kDa) nas condições sem irradiação (**C**) e irradiadas (10Gy) (**D**). Representação gráfica da expressão proteica de RAD51 (~37 kDa) após a normalização pela expressão do endógeno Laminina B1 (~68 kDa) nas condições sem irradiação (**E**) e irradiadas (10Gy) (**F**). Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. Foram considerados significantes as diferenças com  $p < 0,05$  (\*).  $P < 0,01$  (\*\*). A variante M50R foi excluída das análises desse trabalho por não fazer parte da amostra de estudo.

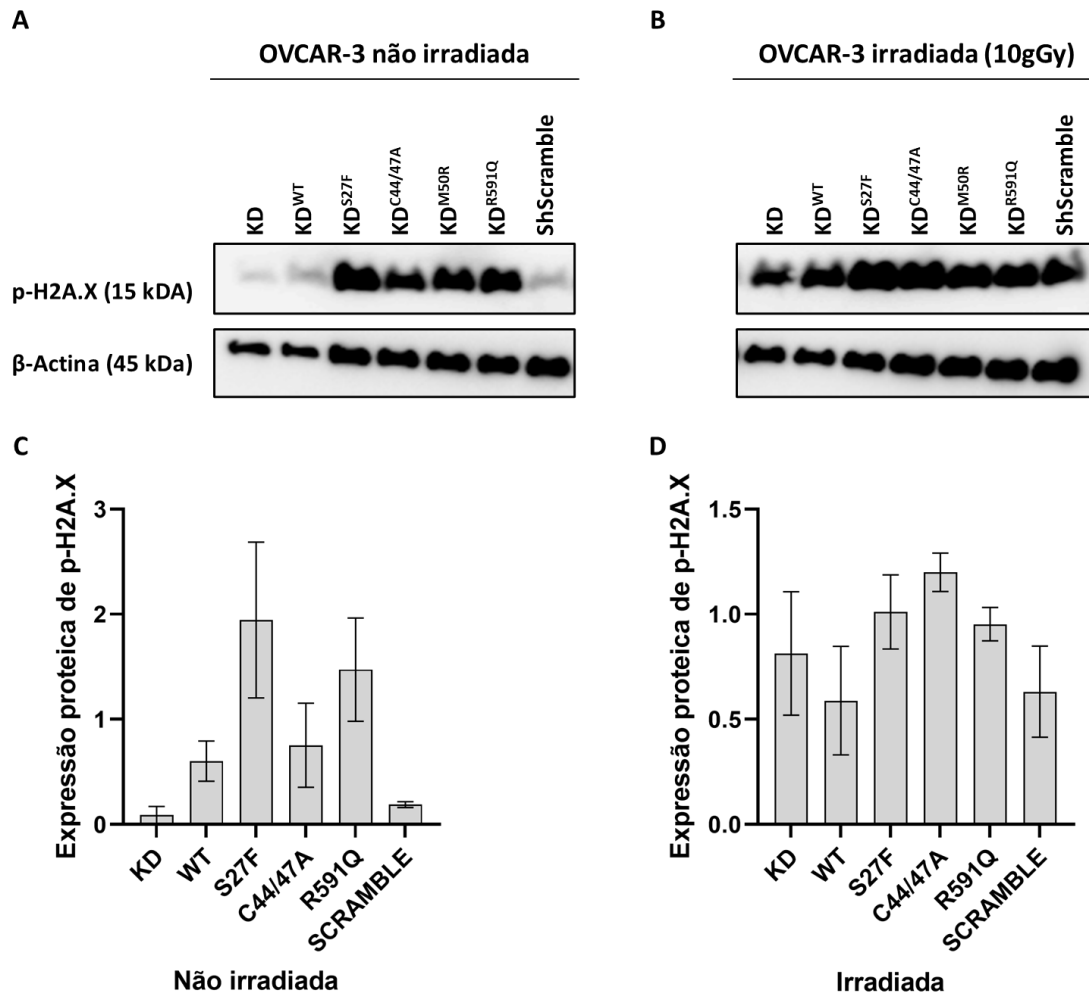
Para a linhagem T-47D (Figura 38), observamos uma diminuição significativa na atividade de FAN1, quando comparamos a condição *FAN1* KD com *FAN1* WT ( $p < 0,01$ ), sem a indução do dano (Figura 38A e C). Quando as células são irradiadas, observamos diminuição estatisticamente significativa nas condições *shSCRAMBLE* ( $p < 0,05$ ), *FAN1* KD ( $p < 0,01$ ) e *FAN1* R591Q ( $p < 0,05$ ), quando comparadas à condição *FAN1* WT (Figura 38B e D). não foram observadas diferenças estatísticas significantes na atividade de RAD51, em nenhuma das condições, quando comparamos com *FAN1* WT (Figura 38A, B, C e D).



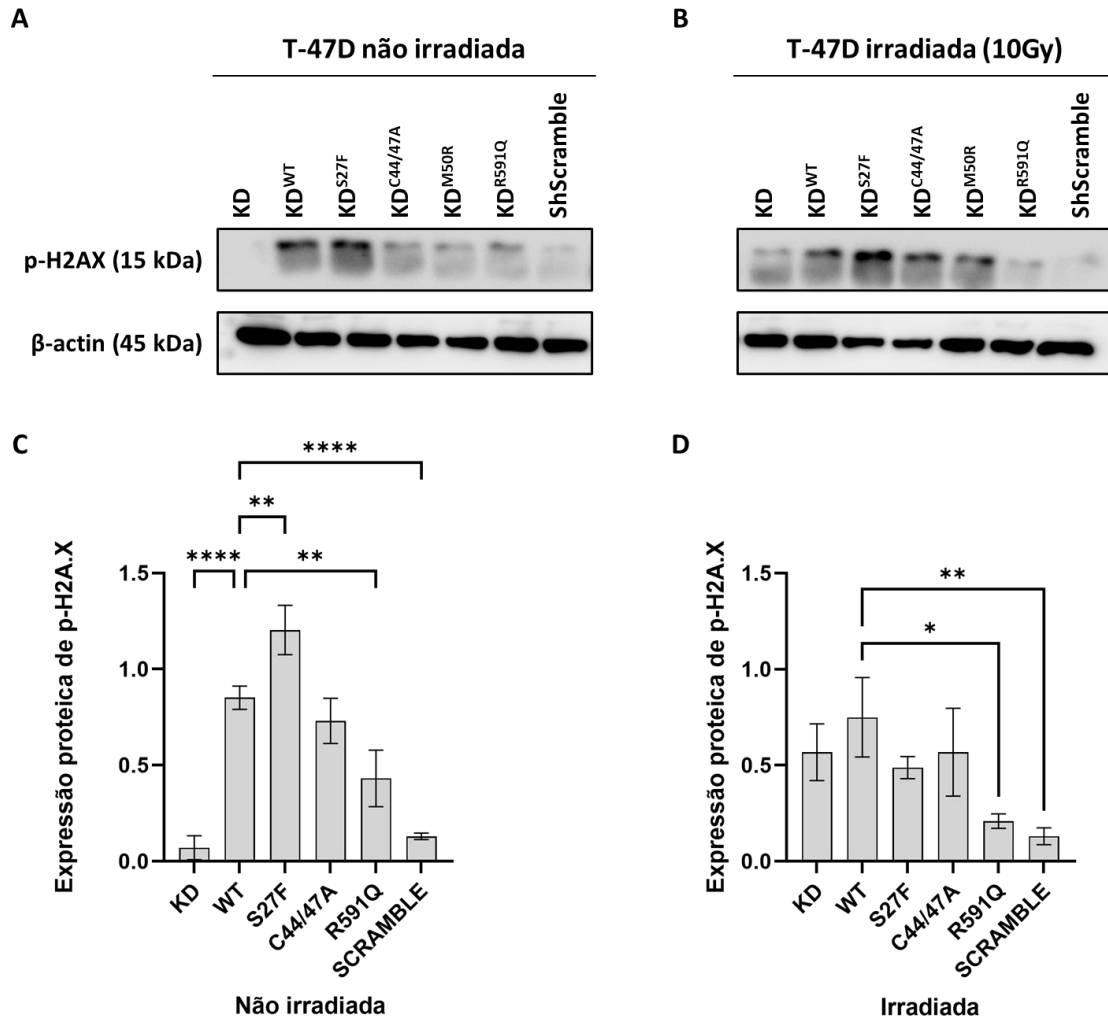
**Figura 38.** Avaliação da expressão de FAN1 e RAD51 na linhagem T-47D na presença de variantes em *FAN1*. Imagem representativa da expressão proteica de FAN1 (~114 kDa), RAD51 (~37 kDa) e da

proteína endógena Laminina B1 (~68 kDa) nas condições sem irradiação **(A)** e irradiadas (10Gy) **(B)**. Representação gráfica da expressão proteica de FAN1 (~114 kDa) após a normalização pela expressão do endógeno Laminina B1 (~68 kDa) nas condições sem irradiação **(C)** e irradiadas (10Gy) **(D)**. Representação gráfica da expressão proteica de RAD51 (~37 kDa) após a normalização pela expressão do endógeno Laminina B1 (~68 kDa) nas condições sem irradiação **(E)** e irradiadas (10Gy) **(F)**. Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. Foram considerados significantes as diferenças com  $p < 0,05$ (\*);  $p < 0,01$ (\*\*). A variante M50R foi excluída das análises desse trabalho por não fazer parte da amostra de estudo.

Além da expressão de proteínas envolvidas no reparo de danos ao DNA, também avaliamos a atividade de p-H2A.X, que indica a permanência de danos, nas condições com e sem indução de dano. A análise das linhagens OVCAR-3 (Figura 39) na presença das variantes em *FAN1*, não demonstraram diferença estatística significativa, quando comparadas a *FAN1* WT, em nenhuma das condições (irradiadas ou não). Quando consideramos a linhagem T-47D (Figura 40), observamos que, com exceção da condição *FAN1* C44/47A, todas as condições apresentaram diferença estatística significativa na presença do dano (irradiação), quando comparadas à condição *FAN1* WT (Figura 40A e C). As condições KD ( $p < 0,0001$ ), *sh*SCRAMBLE ( $p < 0,0001$ ) e *FAN1* R591Q ( $p < 0,01$ ) demonstraram diminuição na atividade da proteína, enquanto a condição *FAN1* S27F ( $p < 0,01$ ) demonstrou aumento da expressão proteica. Quando as células foram irradiadas, as condições *FAN1* R591Q e *sh*SCRAMBLE apresentaram redução significativa na atividade de p-H2A.X, em comparação à condição WT.



**Figura 39.** Avaliação da expressão de p-H2A.X e  $\beta$ -Actina na linhagem OVCAR-3 na presença de variantes em *FAN1*. Imagem representativa da expressão proteica de p-H2A.X (~15 kDa) e da proteína endógena  $\beta$ -Actina (~45 kDa) nas condições sem irradiação (**A**) e irradiadas (10Gy) (**B**). Representação gráfica da expressão proteica de p-H2A.X (~15 kDa) após a normalização pela expressão do endógeno  $\beta$ -Actina (~45 kDa) nas condições sem irradiação (**C**) e irradiadas (10Gy) (**D**). Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. Foram considerados significantes as diferenças com  $p < 0,05$  (\*). A variante M50R foi excluída das análises desse trabalho por não fazer parte da amostra de estudo.



**Figura 40.** Avaliação da expressão de p-H2A.X e  $\beta$ -Actina na linhagem T-47D na presença de variantes em *FAN1*. Imagem representativa da expressão proteica de p-H2A.X (~15 kDa) e da proteína endógena  $\beta$ -Actina (~45 kDa) nas condições sem irradiação (**A**) e irradiadas (10Gy) (**B**). Representação gráfica da expressão proteica de p-H2A.X (~15 kDa) após a normalização pela expressão do endógeno  $\beta$ -Actina (~45 kDa) nas condições sem irradiação (**C**) e irradiadas (10Gy) (**D**). Todas as comparações estatísticas foram realizadas em relação à condição WT. Foram considerados significantes as diferenças com  $p < 0,05$ (\*);  $p < 0,01$ (\*\*);  $p < 0,0001$ (\*\*\*\*). A variante M50R foi excluída das análises desse trabalho por não fazer parte da amostra de estudo.

## 6. Discussão

O câncer de mama em homens é um tipo tumoral raro e, portanto, pouco estudado. Atualmente, a maioria dos casos de CMM são tratados com a mesma abordagem terapêutica da que é utilizada em indivíduos do sexo feminino (CMF), embora já esteja estabelecido que os casos de câncer de mama diferem entre homens e mulheres em relação ao risco de recorrência<sup>9</sup>, estadiamento ao diagnóstico<sup>105</sup>, às características metastáticas e prognóstico<sup>106, 107</sup>, incluindo taxas de sobrevida global, que são mais baixas entre os homens<sup>8, 105-107</sup>. Essas observações dão ênfase à necessidade de um melhor entendimento do CMM<sup>8, 9, 105-107</sup>, uma vez que apenas os genes *BRCA1*<sup>16, 18</sup>, *BRCA2*<sup>15, 16, 18</sup>, *CHEK2*<sup>15, 16, 18</sup>, *PALB2*<sup>15-18</sup> e, mais recentemente, *ATM*<sup>17, 18</sup> foram associados ao desenvolvimento desse tipo tumoral. O fato de ser um tumor raro, faz com que poucos estudos avaliem fatores genéticos causais ou moduladores a partir de uma abordagem genômica robusta<sup>15, 108</sup>. Diante disso, buscamos identificar variantes consideradas P/PP em genes que ainda não foram associados ao CMM, em probandos em acompanhamento pelos departamentos de Oncogenética do Hospital de Câncer de Barretos e do Hospital das Clínicas de Porto Alegre, em genes que ainda não foram associados ao CMM.

A mediana da idade ao diagnóstico dos participantes do nosso estudo foi de 55 anos (32 – 78; DP: 12,13). Essa mediana foi menor do que os dados descritos na literatura em outros trabalhos com CMM. Em geral, encontramos uma média de idade ao diagnóstico de CMM de mais de 60 anos (com variações em torno de 65 anos)<sup>3, 17, 108-113</sup>.

Um dos principais fatores no conhecimento sobre a doença e dos genes envolvidos na sua suscetibilidade está na possibilidade de prevenção e detecção precoce. A detecção precoce é importante para um bom prognóstico dos pacientes. Em um estudo com a população chinesa, foi demonstrado que pacientes diagnosticados em estágios iniciais apresentam sobrevida de quase 100%, enquanto para aqueles diagnosticados em estágio avançado (IV) esta taxa foi de 0%<sup>114</sup>. De forma semelhante, a taxa de sobrevida relativa em 5 anos dos pacientes diagnosticados no estágio SEER localizado (estágio inicial) foi de 97%, enquanto para aqueles diagnosticados no estágio SEER distante (estágio tardio) essa taxa foi de 22%<sup>115</sup>. Nesta perspectiva, a maior parte dos nossos pacientes foi diagnosticada nos estágios precoces (TNM0 - 6,7%; ou TNM I ou II - 66,7%), consistentes com a literatura<sup>109, 116</sup>. Esse dado não era esperado, visto que já foi demonstrado que a maior parte dos homens (83,9%) não sabia da possibilidade de desenvolver CM antes de serem diagnosticados<sup>111</sup>.

A maioria dos participantes do nosso estudo apresentou tumores positivos para receptores hormonais (estrogênio e/ou progesterona) e nenhum paciente apresentou o subtipo molecular triplo-negativo. Esses dados são consistentes com os da literatura, em que há prevalência dos subtipos moleculares Luminal ou HER2-positivo<sup>116, 117</sup>, com um número baixo de casos triplo-negativo<sup>118</sup>. Da mesma forma, nossos dados em relação à morfologia corroboram a literatura, sendo a maior parte dos tumores ductais<sup>17, 116, 117</sup>.

Entre os participantes do estudo portadores de variantes consideradas P/PP, 44,4% apresentavam variantes em genes previamente associados ao câncer hereditário (4/9). É importante mencionar que este estudo incluiu probandos recrutados pelos departamentos de Oncogenética do Hospital de Câncer de Barretos e do Hospital das Clínicas de Porto Alegre. Esses participantes são considerados de alto risco para o desenvolvimento de câncer, uma vez que a presença de câncer de mama em indivíduos do sexo masculino é, *per se*, um indicativo sugestivo de presença de alterações em genes de alto risco para câncer hereditário<sup>57</sup>. Adicionalmente, metade dos participantes reportou HF significativa de câncer. Também é importante destacar que os participantes com variantes P/PP nos genes *BRCA1/BRCA2*, que são associados a doença e frequentemente mutados neste tipo tumoral, não foram incluídos neste estudo.

Considerando a HF dos participantes, todos apresentam critérios para HBOC – câncer de mama masculino em qualquer idade – de acordo com a NCCN<sup>57</sup>. A maior parte dos participantes reportou outros casos de câncer de mama na família (43,3%), corroborando aos achados de Calip e colaboradores, que também realizaram um estudo com homens diagnosticados com CM e negativos para variantes deletérias em *BRCA1* e *BRCA2*<sup>119</sup>. Neste estudo foi encontrada uma associação do CMM com a presença de outros casos de CM em familiares de primeiro ou segundo grau (OR 4,7; IC95%, 4,1 - 5,3)<sup>119</sup>. As associações com CMM foram mais fortes para HF de CM em 2 ou mais familiares de primeiro grau (FPG) (OR 7,8; IC 95%, 5,2 - 11,6); probandos e FPG diagnosticados em idade < 45 anos (OR 6,9; 95% IC, 3,9 - 12,4) e para HF de CMM (OR 17,9; IC 95%, 7,6 - 42,1)<sup>119</sup>. Ainda podemos destacar a presença de outros tipos tumorais já associados ao CMM na HF dos participantes do nosso estudo, como colorretal, tireoide e sítios primários desconhecidos<sup>120</sup>.

Nesse trabalho, identificamos variantes P/PP potencialmente associadas ao CMM em 30% dos probandos analisados (9/30), através do sequenciamento do exoma dos participantes. Considerando estudos de identificação de variantes em coortes de CMM, negativos para VPs em *BRCA1* e *BRCA2*, encontramos variadas porcentagens de participantes com VPs identificadas em outros genes. Bucalo e colaboradores observaram que, ao utilizar um painel gênico de 50 genes

associados ao câncer, foram identificadas variantes P/PP em 4,8% dos participantes<sup>17</sup>. De maneira semelhantes, Rizzolo e colaboradores, também utilizando um painel gênico de 50 genes associados ao câncer, identificaram que 5,4% dos participantes eram portadores de variantes P/PP<sup>108</sup>. Já no estudo conduzido por Al Saati e colaboradores, esse número foi de 21,2%<sup>113</sup>. A principal explicação para essa variação é o método utilizado para a identificação de variantes, principalmente o número de genes avaliados. Rizzolo e colaboradores utilizaram um painel gênico customizado com 50 genes associados ao câncer, enquanto o painel gênico utilizado por Al Saati e colaboradores contava com 585 genes relacionados à carcinogênese. Por isso, era esperado que em nosso estudo encontrássemos mais participantes portadores de variantes P/PP, uma vez que realizamos o WES e, posteriormente, avaliamos um grupo de mais de 2 mil genes relacionados à carcinogênese, SH e vias de reparo ao DNA. Diante disso, reforçamos que, a utilização de painéis gênicos mais amplos, que contemplem um maior número de genes relacionados à carcinogênese e SH, poderiam auxiliar em um melhor entendimento da etiologia do CMM, bem como na identificação de variantes em pacientes que não possuem VPs em genes já associados ao tipo tumoral. Se considerarmos apenas genes conhecidamente associados com câncer hereditário, o percentual de pacientes com variantes P/PP no presente estudo seria de 13,3%, representando uma parcela significativa, em comparação aos achados de outros estudos, conforme supramencionado.

Foram identificadas 13 variantes consideradas P/PP, representando 4,8% de todas as variantes identificadas, após a exclusão de variantes B/PB. As porcentagens de VPs encontradas em outros estudos variaram, dependendo da metodologia utilizada, sendo 7,5% (neste estudo o total de variantes inclui as classificadas como B/PB)<sup>113</sup>, 14,8%<sup>17</sup> e 25,9%<sup>108</sup>. Nessa análise, o raciocínio é inverso ao da porcentagem de participantes portadores de VPs. Isso porque, quando consideramos um painel gênico pequeno, com genes já associados ao câncer, as chances de identificarmos VPs aumentam, uma vez que o conhecimento sobre aquele gene e os estudos relacionados a ele, tendem a ser maiores. Quando utilizamos painéis gênicos maiores, ou outro tipo de análise em larga escala, como o WES, aumentam as chances de encontrarmos variantes em genes desconhecidos ou poucos estudados e, dessa forma, a tendência é que as variantes presentes nesses genes sejam classificadas como VUS.

Em relação aos genes previamente associados ao CMM, identificamos uma variante no *CHEK2* em um paciente com diagnóstico de câncer de mama e câncer gástrico. Este gene foi um dos mais frequentemente mutados (4,1%) em uma coorte de 716 casos de CMM, em pacientes sem teste genético prévio para variantes em *BRCA1/2*, utilizando um painel multigênico<sup>15</sup>. A variante

c.349A>G (presente em um dos participantes do nosso estudo) foi identificada em 7 pacientes em uma coorte brasileira com CM, utilizando um painel gênico, representando 41,2% entre todas as variantes em *CHEK2* no estudo<sup>121</sup>. Adicionalmente, essa variante foi associada a um aumento significativo do risco para o desenvolvimento de CM (OR 2,22; 95% IC, 1,34 – 3,68)<sup>122</sup>. No nosso caso, o participante possui uma história familiar sugestiva (3 casos de leucemia, 2 casos de câncer de intestino e 1 caso de cada tipo tumoral: mama, próstata, boca e osso) e seus pais são consanguíneos. Sua filha, também diagnosticada com câncer de mama, porta a mesma variante (c.349A>G).

Em uma das famílias com dois casos de CMM (o probando e um familiar de primeiro grau), foi identificada uma variante PP no gene supressor de tumor *BRIP1*. Ensaios funcionais demonstraram que a presença dessa variante conferiu um aumento da sensibilidade à cisplatina<sup>123</sup> e diminuição na dimerização e a processabilidade da helicase<sup>124</sup>. A variante identificada foi classificada como PP com base em sua frequência populacional, ensaios funcionais publicados e previsões *in silico*. Ainda consideramos a história pessoal e familiar reportada pelo participante portador da variante. Além do irmão com diagnóstico de CMM, ele relatou uma irmã diagnosticada com CM e um irmão com câncer não especificado. Apesar disso, vale ressaltar que é necessário um estudo de segregação em sua família para associar a presença da variante *BRIP1* à causalidade da doença. Com relação ao participante ID 1, que também reportou outro caso de CMM na família, não identificamos nenhuma variante classificada como P/PP.

Além de *BRIP1* e *CHEK2*, identificamos uma variante classificada como P/PP no gene *MSH6*, também considerado de predisposição à SH. A variante foi previamente descrita co-segregando em uma família com câncer colorretal jovem<sup>125</sup>, bem como em pacientes com câncer de endométrio em coortes com SL<sup>126, 127</sup>. Curiosamente, Lu *et al.* demonstraram um enriquecimento de variantes patogênicas em *MSH6* em pacientes com alto risco para CM, sugerindo que o gene possa ser um candidato à susceptibilidade da doença e associando o gene a um moderado risco<sup>128</sup>. Entre nossos participantes, o portador da variante em *MSH6* não relatou HF, apresentou MSS e foi positivo para a expressão de todas as proteínas da via de MMR (*MSH2*, *MSH6*, *MLH1* e *PMS2*). Adicionalmente, a avaliação do seu tecido tumoral criopreservado não demonstrou a presença de variantes em *MSH6*, o que nos leva a acreditar que a presença da variante não é o principal fator no desenvolvimento da doença, que pode ser de origem esporádica. O tumor também apresentou variantes em genes envolvidos em vias importantes, com relevância clínica e terapêutica no câncer, como *MTOR*<sup>129</sup>. Apesar dos indícios apontarem para um CM esporádico neste participante, vale ressaltar que a presença da variante patogênica em *MSH6* confere um aumento do risco para o desenvolvimento

de câncer colorretal ou outros dentro do espectro da Síndrome de Lynch, como endométrio, ovário, vias biliares, etc. Esse risco é aumentado tanto para o participante do estudo, quanto para seus familiares que, possivelmente, possam ser portadores da variante. Diante disso, reforçamos a importância da utilização de painéis gênicos expandidos, que englobem a análise de genes presentes em diferentes SH e vias da carcinogênese, que ainda não foram associados à doença e/ou SH investigados<sup>108, 113</sup>. Nessa perspectiva, o fato de o tumor de mama ser MSS, não significa que, caso haja o surgimento de outro tumor, o perfil será o mesmo, podendo apresentar instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês *microsatellite instability*).

A última variante relacionada a genes de predisposição à SH está presente em *MUTYH*. A mesma variante, considerada patogênica foi previamente associada à predisposição do CMM em uma coorte italiana<sup>130</sup>. No estudo realizado na Itália, a variante foi identificada em 8 (de 560) homens com CM (1,6%), sendo que 7 desses pacientes eram portadores da variante monoalélica, como em nosso caso, e um paciente era portador das variantes patogênicas p.Tyr179Cys/p.Arg241Trp (heterozigoto composto). A variante foi associada a um aumento de risco baixo/moderado para o desenvolvimento de CMM (OR, 4.54; 95% CI, 1.17–17.58)<sup>130</sup>. Diante disso, foi sugerido que o CMM fosse adicionado ao espectro tumoral da Síndrome de Polipose associada ao *MUTYH* (MAP, do inglês *MUTYH-associated polyposis*)<sup>130</sup>. Variantes monoalélicas em *MUTYH* (9,9%), foram identificadas em um estudo que utilizava painel gênico para pacientes diagnosticados com CM, na população brasileira<sup>121</sup>. No entanto, esse tipo de variantes não foi associado ao aumento de risco para o CM<sup>121, 131, 132</sup>. Apesar de não haver essa associação, foi observado que, portadores de variantes germinativas monoalélicas em *MUTYH*, podem apresentar maior agressividade da doença quanto ela surge de maneira esporádica<sup>133</sup>. Por fim, o risco cumulativo para desenvolver CM até os 70 anos para portadores de variantes monoalélicas em *MUTYH* é de 11% (8 – 16%; IC 95%)<sup>134</sup>. O participante do nosso estudo (ID 2554) foi diagnosticado aos 32 anos e não reportou HF sugestiva para SH. Esse paciente ainda apresentou uma variante classificada como VUS no gene *APC* (c.8524T>G), que é relacionado à Polipose Adenomatosa Familiar<sup>135</sup>.

Alguns genes nos quais identificamos variantes consideradas P/PP em nosso estudo, não foram previamente associados à SH e/ou predisposição ao CM, como *DACH1*, *LRP1B* E *CTC1*. Em contrapartida, já foi descrito que esses genes estão envolvidos em processos importantes na carcinogênese, no desenvolvimento tumoral ou na resistência a drogas/tratamento<sup>136-138</sup>.

Um achado surpreendente foram 5 participantes (16,6%) cujos pais estão em casamentos consanguíneos. Apesar desse tipo de casamento ser considerado um fator de risco, devido à falta

de variabilidade genética e existir a sugestão para que seja considerado um critério para a susceptibilidade a síndromes de câncer hereditário<sup>139</sup>, não foi considerado um fator de risco para o desenvolvimento de CM<sup>140</sup>. Vale ressaltar que, neste último estudo, os autores destacam o fato da literatura ser limitada em relação a esse tipo de informação<sup>140</sup>. Entre os nossos resultados, não identificamos variantes em homozigose (ou componentes homozigotos) que pudessem apresentar um efeito patogênico, especialmente em genes cuja doença é de origem autossômica recessiva.

Em relação às variantes somáticas identificadas no DNA tumoral dos participantes do estudo, podemos destacar a variante presente no gene *PIK3CA*, no participante ID 1342. Este gene foi considerado um dos mais frequentemente alterados, com variantes somáticas recorrentes em casos de CMM (36%)<sup>141</sup>. Adicionalmente, esse códon foi considerado um *hotspots* para variantes no gene em casos de CM<sup>142</sup>. Em um estudo que analisou o espectro de variantes somáticas em *PIK3CA*, e contou com um painel customizado com 11 variantes, a variante E545G (a mesma do nosso estudo) foi identificada em 13 (0,5%) participantes com CM<sup>143</sup>. Neste mesmo estudo, outra variante no mesmo aminoácido (E545K) foi uma das mais frequentes, representando 17% das variantes identificadas<sup>143</sup>. A presença dessa variante somática pode ser uma possível explicação para a causalidade do tumor, uma vez que o participante não é portador de variantes germinativas patogênicas. Além disso, o participante não reporta HF sugestiva para SH e possui baixa quantidade de VUS, todas presentes em genes não associados ao CM.

Outro caso que merece destaque é o do participante ID 2318, que porta a variante V600E em *BRAF*, sabidamente patogênica e associada a outros tipos tumorais, inclusive impactando no direcionamento do tratamento, como no câncer colorretal metastático<sup>144, 145</sup>. Além disso, esse participante é portador de uma variante em *MAP3K1*, que já foi relatado como predominante em subtipos Luminal<sup>146</sup> e relacionado ao prognóstico<sup>146, 147</sup>. No estudo de Kwong e colaboradores, alterações neste gene foram frequentes, representando 14,3% das variantes P/PP, entre pacientes com teste genético negativo para variantes patogênicas germinativas em *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* e *PTEN*<sup>148</sup>. Apesar da importância clínica e nas vias da carcinogênese das variantes somáticas identificadas no participante ID 2318, não fica bem estabelecido se o tumor pode ser de origem esporádica. O participante não reportou HF sugestiva para SH, no entanto possui uma história pessoal importante, com diagnóstico de câncer de mama aos 35 anos e de tireoide em idade não especificada. Por fim, foram identificadas duas variantes classificadas como VUS em genes já associados ao CMM, uma em *BRCA1* (c.4390C>G) e outra em *ATM* (c.1444A>C). Essas variantes

podem não ser diretamente relacionadas à causalidade da doença, mas juntas podem conferir um risco maior para o desenvolvimento tumoral.

Após a exclusão de variantes B/PB das análises, a maior parte das variantes germinativas identificadas foi classificada como VUS (95,2%). Esse alto número se deve ao fato de utilizarmos um método de larga escala, com a avaliação de mais de 2 mil genes (relacionados às vias de carcinogênese, reparo ao DNA e SH). Nessa perspectiva, em outros estudos com coortes de CMM, também negativos para VPs em *BRCA1* e *BRCA2*, mas com abordagens de painéis com genes já associados ao câncer, as porcentagens de VUS encontradas foram de, aproximadamente, 74%<sup>108</sup> e 85,2%<sup>17</sup>, menores do que a encontrada em nosso estudo. Para um estudo com uma coorte com os mesmos critérios, que utiliza um painel que engloba mais genes, a porcentagem foi de 77,6%<sup>113</sup>, mas a análise também contempla variantes B/PB no número de variantes total. Se considerarmos apenas variantes P/PP e VUS, essa porcentagem aumenta para, aproximadamente, 91,2%<sup>113</sup>, ficando mais próximo da porcentagem encontrada no nosso estudo. Como já discutido nesse trabalho, quando utilizamos metodologias que contemplem mais genes, principalmente aqueles que ainda não foram associados a SH, a chance de encontrarmos variantes classificadas como VUS é maior, uma vez que o conhecimento acerca dos genes é limitado, não só em relação às suas associações a doenças, mas também a suas funções e domínios importantes. Portanto, a utilização de métodos que contemplem um maior número de genes, especialmente aqueles que ainda não estão associados à doença, é de suma importância para que possamos associar outros genes e/ou variantes ao desenvolvimento tumoral. No entanto, a utilização de técnicas que nos trazem um grande número de informações também é um desafio, principalmente quanto à sua análise e interpretações<sup>24</sup>.

Diante dos achados, gostaríamos de destacar a importância da padronização na classificação de variantes, definidas pelos critérios sugeridos pela ACMG<sup>25</sup>. A análise de parâmetros já estabelecidos facilita a classificação das variantes de maneira geral e, até mesmo, os desenhos experimentais dos estudos que farão esse tipo de análise. Adicionalmente, direciona os pesquisadores para, cada vez mais, buscarmos o aprimoramento das análises gene-específicas. Nessa perspectiva, alguns grupos já publicaram trabalhos com diretrizes da ACMG específicas para alguns genes, por exemplo *BRCA1/BRCA2*<sup>29, 30</sup>, *TP53*<sup>31</sup>, *CDH1*<sup>32</sup>, *CHEK2*<sup>33</sup>, dentre outros. Essas análises diferenciadas pretendem fazer com que o número de variantes classificadas como VUS possa ser menor, para que esses pacientes possam receber o manejo adequado.

As limitações para a Etapa I do projeto incluem aspectos técnicos/metodológicos, como regiões intrônicas e/ou não traduzidas ausentes da análise, e supostos elementos regulatórios/rearranjos longos e variação do número de cópias (CNVs, do inglês *Copy number variation*) que não foram avaliados. No entanto, apesar destas limitações, fomos capazes de identificar variantes classificadas como P/PP em genes de predisposição ao câncer, bem como em genes não associados a síndromes hereditárias, mas que desempenham papéis importantes no reparo de danos ao DNA, apoptose, ciclo e sinalização celular, por exemplo. Vale ressaltar que outros parâmetros devem ser analisados para associar esses genes ao CMM, uma vez que não conseguimos comparar diferentes grupos (casos de CMM e controles sem doença) para determinar o OR dessas variantes. Além disso, seria interessante uma amostra maior de pacientes para que houvesse esse tipo de comparação, no entanto, nosso número amostral se deu em razão da raridade desse tipo de ocorrência e ao fato de o estudo ter trabalhado com uma amostra de conveniência representada pelo número de casos atendidos pelo Departamento de Oncogenética e sem variantes P/PP em *BRCA1/BRCA2* e *TP53*, genes esses que são testados na rotina assistencial do Departamento.

Diante dos resultados obtidos na Etapa I, foram selecionadas 3 variantes classificadas como P/PP para os ensaios funcionais. Como descrito no tópico “*Seleção de variantes para os ensaios funcionais*”, essa escolha se baseou em uma série de informações disponíveis sobre as variantes e/ou genes, história pessoal e familiar dos participantes do estudo, localização da variante e papel da proteína resultante em vias celulares. Brevemente, selecionamos variantes consideradas P/PP presente nos genes *BRIP1* e *MRE11*, envolvidos na via de reparos ao DNA<sup>80</sup>, além de estarem relacionadas a importantes síndromes hereditárias<sup>81, 82, 149</sup>; e no gene *MSH6*, que predispõem à SL<sup>150-152</sup>, e desempenha um papel importante na via de reparo de danos ao DNA por MMR<sup>83, 153</sup>. Apesar dessas variantes serem consideradas P/PP, não há uma associação clara entre a presença delas e o desenvolvimento do CMM nesses pacientes. Com relação ao gene *MSH6*, ainda há uma discussão sobre a presença do câncer de mama no espectro da Síndrome de Lynch. Dessa forma, seria importante um maior conhecimento sobre os genes que predispõem ao tipo tumoral, por se tratar de um tumor raro e com conhecimento limitado sobre suas causas genéticas. Ao conseguirmos associar a presença de variantes em determinados genes à uma doença, também é possível melhorar o rastreio e manejo dos pacientes e/ou famílias portadores de variantes nesses genes, como, por exemplo, a utilização de painéis personalizados que contemplem os genes associados.

Além das variantes consideradas P/PP, também selecionamos duas variantes presentes em *FAN1* e classificadas como VUS para a realização dos ensaios funcionais. *FAN1* também um gene relacionado à Anemia de Fanconi<sup>84-86</sup> e atua no reparo de danos de ICL, podendo participar de múltiplas vias de reparo de DNA, incluindo RH<sup>87</sup>, ou estar envolvido em etapas posteriores deste modelo, como excisão de DNA e RH<sup>88</sup>. Desse modo, seria importante fornecer mais dados que possam ajudar na classificação dessas variantes como benigna ou patogênica. A realização de ensaios funcionais é uma das ferramentas de avaliação com maior robustez para definir se a presença da variante de interesse impacta ou não na funcionalidade da proteína resultante<sup>25</sup>. Uma vez analisados os parâmetros referentes a dados funcionais, que podem trazer maiores evidências na definição da patogenicidade de uma variante, pacientes e/ou famílias que portam essa variante podem ter o manejo adequado a partir dos achados genéticos.

É importante ressaltar que a forma de avaliação das variantes em razão da via na qual está envolvida, pelo contexto dos projetos nos quais elas foram avaliadas e/ou disponibilidade de linhagens celulares e reagentes. Para as análises das variantes presentes em *MRE11* e *MSH6*, a maioria dos ensaios foram realizados em duas linhagens diferentes, em parceria com a *Queen's University of Belfast*, e para a deleção gênica, utilizamos o sistema CRISPR/*Cas9*. Para a variante presente em *BRIP1*, os ensaios foram realizados no Hospital de Câncer de Barretos, através da superexpressão das variantes. Com relação à avaliação das variantes presentes em *FAN1*, a metodologia para silenciamento gênico utilizada foi o *shRNA*.

Apesar da ampla experiência com a utilização do sistema CRISPR/*Cas9* pelo grupo de pesquisa norte-irlandês, não conseguimos obter clones viáveis após a deleção gênica de *MRE11* e *MSH6*. A nossa hipótese para a inefetividade da técnica, é de que os genes avaliados desempenham papéis importantes em vias de reparo de danos ao DNA e, portanto, seriam indispensáveis para o funcionamento das células. Nessa perspectiva já foi descrito que *MRE11* é essencial para a proliferação celular, bem como para o reparo de danos de quebra de dupla fita no DNA em células tronco embrionárias de murinos<sup>154</sup>. Além disso, Kim e colaboradores observaram que a interação NBN-MRE11 (parte do complexo MRN) é necessária para a supressão tumoral e a integridade genômica<sup>155</sup>. Sendo assim, a deleção gênica faria com que não houvesse a ligação de MRE11 com NBN, prejudicando a formação do complexo MRN, promovendo a instabilidade genômica e, posteriormente, morte celular. De forma semelhante, foi observado que camundongos *knockout* para *MSH6*, com deficiência em *TP53*, apresentaram um aumento na instabilidade de microssatélites e a integridade genômica foi inversamente correlacionada com a sobrevivência dos

animais<sup>156</sup>. Em outro trabalho, Hegan e colaboradores observaram que, camundongos nulizigotos para *MSH6*, foram alguns dos mais mutados em comparação com os camundongos selvagens<sup>157</sup>. Esses dois resultados podem corroborar à nossa hipótese inicial, visto que, diante do *knockout* para *MSH6*, as células começam a se proliferar sem o reparo dos erros no DNA e acumulam cada vez mais variantes, levando à instabilidade genômica e, conseqüentemente à morte celular. No trabalho de Young e colaboradores<sup>156</sup>, foi observada uma maior letalidade para os animais que apresentaram essa instabilidade genômica.

Entre as variantes consideradas P/PP selecionadas para o estudo funcional, duas estão presentes em genes envolvidos no reparo de dano ao DNA por RH, *BRIP1* e *MRE11*, e uma em *MSH6*, gene envolvido na via MMR. Ainda foram selecionadas duas variantes classificadas como VUS, presentes em *FAN1*, um gene que possui íntimo envolvimento com a via de reparo por RH. Na tentativa de uma melhor avaliação sobre a funcionalidade das proteínas resultantes na presença das variantes selecionadas, realizamos ensaios que pudessem nos dar indícios sobre o impacto na função dessas proteínas nas vias de reparo com as quais elas estão envolvidas. Para isso, caracterizamos essas proteínas em condição basal e após a indução de danos. Para a indução do dano de quebra de dupla fita, utilizamos a irradiação e, para a indução do dano de pareamento errôneo, utilizamos a Cisplatina.

Ao considerarmos a avaliação funcional da variante R707C, presente *BRIP1*, não observamos diferenças estatísticas quando comparada à condição WT. *BRIP1* se liga à *BRCA1* através de dois domínios BRCT na região C-terminal de *BRCA1*, formando um complexo heterodimérico para atuar na via de reparo de danos ao DNA por RH<sup>80</sup>. A presença de variantes próximas ao domínio, como a variante R707C, poderia fazer com que essa ligação fosse perturbada, mas não ao ponto de prejudicar o funcionamento da via de forma significativa. Nossos resultados não demonstraram significância estatística da atividade de *BRCA1*, na presença de variantes em *BRIP1*, no entanto, é necessário realizarmos outros ensaios e/ou réplicas experimentais para que essa observação seja confirmada.

Como esperado, nas condições em que superexpressamos *BRIP1* WT ou com as variantes, a atividade da proteína é aumentada nas condições sem danos (UT), 1 (com exceção da variante patogênica P47A) e 4 horas após a indução do dano. Isso ocorre porque a técnica utilizada conta com a transfecção de um vetor que promove uma alta expressão constitutiva do inserto de interesse em células de mamíferos, através de promotores de *Cytomegalovirus* (CMV)<sup>158, 159</sup>.

Para atividade de p-H2A.X, notamos que, com exceção de BRIP1 modificado com a variante P47A, todas as condições demonstram um aumento da expressão da proteína 1 e 4 horas após a irradiação, e uma diminuição em 24 horas. Esse resultado é esperado, uma vez que p-H2A.X está presente no início da via de reparo, na sinalização celular, tendendo a diminuir sua atividade após o reparo do dano<sup>160-162</sup>. Isso nos indica que, apenas na condição com a variante P47A, as células não são capazes de resolver o dano gerado após 24 horas. Em contrapartida, a variante considerada patogênica teve uma alta taxa de reparo por RH no ensaio de restauração de fluorescência, avaliada 72 horas após a indução de danos. Uma das possíveis explicações é que a presença dessa variante possa retardar as funções de BRIP1, no entanto, células sobreviventes ao dano gerado são capazes de realizar o reparo por RH em tempos maiores. Corroborando à essa hipótese, a capacidade clonogênica das condições na presença de variantes não demonstrou diferença significativa em relação à condição WT.

Com relação a *BRIP1*, sua expressão proteica anormal foi relacionada ao prognóstico de diversos tipos tumorais, sendo a amplificação o tipo mais comum<sup>163</sup>. Ainda foi observada uma correlação significativa com a alteração do número de cópias do gene em 23 tipos tumorais, e com a metilação do DNA em 16 tipos de câncer diferentes<sup>163</sup>. A expressão aumentada de BRIP1 foi constatada em 28 tipos tumorais, quando comparados ao tecido normal, sendo que, na maioria deles, esse aumento foi relacionado ao prognóstico<sup>163</sup>. Neste estudo, o CM não foi um dos tipos tumorais que apresentaram diferença significativa de expressão nas análises<sup>163</sup>. No entanto, em outro estudo, que avaliava uma coorte que contava apenas com pacientes diagnosticados com CM, a alta expressão de BRIP1 também demonstrou estar correlacionada ao prognóstico (piores taxas de sobrevida, sobrevida livre de doença, sobrevida livre de metástase e recidivas) e ao *status* de metilação do promotor<sup>164</sup>. Ainda foi observado que os participantes do estudo portavam tanto variantes germinativas, quanto somáticas<sup>164</sup>. VPs germinativas patogênicas em *BRIP1* estão associadas a um alto risco para o desenvolvimento de câncer de ovário (OR 4,94; IC 95%, 4,07-6,00)<sup>78</sup>, representando uma importância ainda maior para as mulheres, quando essas variantes segregam em famílias com HBOC. Diante disso, a classificação definitiva de variantes presentes nesse gene faz-se necessária para que os/as portadores possam receber o manejo adequado.

Nossos resultados sugerem que a presença da variante R707C não impacta as funções avaliadas da proteína BRIP1 se assemelhando à condição WT, diferente do que foi observado por Bharti e colaboradores<sup>124</sup>, que demonstraram o comprometimento na dimerização e possessividade da enzima na presença dessa variante. Uma das possíveis explicações para essa diferença é que a

maioria dos ensaios realizados no estudo citado são bioquímicos, e as avaliações funcionais realizadas pelos autores, contaram com uma linhagem celular proveniente do linfoblasto de uma ave (linhagem DT40). Em nosso estudo, foram utilizadas linhagens humanas, representando um modelo mais fidedigno ao que é observado no desenvolvimento tumoral, já que se trata de uma proteína sendo expressa em uma linhagem da mesma espécie. Nesse sentido, já foi demonstrado que, apesar de alguns modelos animais apresentarem alta similaridade à fisiologia humana, algumas proteínas podem ser expressas de maneira diferente em determinadas células e/ou tecidos específicos<sup>165-167</sup>. Nessa perspectiva, é importante considerarmos as diferenças fisiológicas e de expressão proteica em tecidos ao escolhermos os modelos para a realização de estudos de doenças específicas<sup>165</sup>, já que podem haver divergências de mecanismos compensatórios ou de expressão proteica entre espécies<sup>167</sup>.

Por fim, nossos resultados nos levariam a atribuir o parâmetro de classificação BP6, segundo as recomendações da ACMG<sup>25</sup>. Atualmente (maio de 2024), a ferramenta Franklin (<https://franklin.genoox.com>) atribui o parâmetro PP5 (contrariando o que observamos), no entanto não atribui influência para ele (suporte, moderado ou forte). A falta de influência é marcada quando não há registros de que a própria ferramenta extraiu a informação e, além disso, ela considera que o nível de evidência encontrado na literatura não é o suficiente para atribuir esse parâmetro.

Outro gene avaliado em nosso trabalho foi o *MRE11*. Sua proteína resultante é indispensável para o reparo de danos ao DNA por RH, se ligando à RAD50 e NBS1, para formar o complexo MRN. Esse complexo exibe uma grande versatilidade, participando de diversos processos celulares para o reparo de danos ao DNA<sup>168</sup>. Uma variante patogênica no gene codificante da proteína pode representar a perda de funcionalidade da proteína na via de reparo por RH. Apesar da avaliação de LoH ter demonstrado que, no tumor, a variante não apresenta VAF que indique sua presença, essa perda de heterozigose pode ter se dado de outras maneiras pelas quais a metodologia utilizada não foi capaz de identificar.

Os resultados obtidos no ensaio clonogênico nos indicam que a presença da variante E506\* em *MRE11* pode afetar a capacidade das células desempenharem seu papel de reparo de danos ao DNA, ainda que isso ocorra apenas em doses maiores de irradiação, como no caso da linhagem KTMBE. Isso faz com que as células não sobrevivam e, conseqüentemente, não consigam se proliferar até formar colônias. A variante E506\* está presente em uma posição de ligação de *MRE11* com RAD50. Essa ligação pode ser perturbada com a presença dessa variante, inserindo um *stop*

*códon* precoce. A ligação com RAD50, entre outros processos que ocorrem dentro do reparo de danos ao DNA, limita a atividade exonuclease 3'>5' de MRE11. Dessa forma, o DNA não é extensivamente degradado em sua porção terminada em 3' <sup>168, 169</sup>. A formação de uma proteína truncada, perturbando a ligação MRE11-RAD50, poderia fazer com que essa atividade não fosse limitada e o DNA fosse degradado, levando a célula à morte, o que explicaria a perda da capacidade clonogênica. Além disso, já foi descrito que, assim como no reparo de danos, MRE11 é essencial para a proliferação celular<sup>154</sup>.

Ao analisarmos o ensaio de imunofluorescência para a avaliação da formação de *foci* RAD51 e permanência de danos (p-H2A.X), notamos o aumento de número de *foci* RAD51. Apesar disso, observamos a permanência do dano (p-H2A.X) na linhagem MCF10AneoT após 24 horas de irradiação, nos indicando que a via de reparo de danos por RH está deficiente. Para a linhagem KTMBE, observamos a permanência do dano após 24 horas de irradiação apenas na presença da variante R576\*. A histona H2A.X é fosforilada por ATM e ATR no início da sinalização da quebra de dupla fita. Depois disso, outras proteínas são recrutadas para o sítio de dano e o reparo ao DNA é realizado<sup>160-162</sup>. Portanto, a expressão de p-H2A.X após 24 horas de irradiação indica a permanência de dano, uma vez que ela é uma proteína presente no início da via. Em condições normais, essa expressão voltaria a níveis basais, demonstrado na condição UT. Já os *foci* nucleares de RAD51 são formados após a proteína ser recrutada ao local do dano. Em seguida, RAD51 invade a cromátide irmã em busca da sequência homóloga para a realização do reparo<sup>161, 170</sup>. Dessa forma, o esperado é observarmos um aumento do número de *foci* nas primeiras horas após o dano e, 24 horas depois, a diminuição, chegando aos níveis basais (condição UT), uma vez que as células capazes de realizar o reparo ao DNA não precisam mais recrutar RAD51 e as que não foram capazes acumularam danos e, possivelmente foram enviadas para a morte.

Ainda observamos que a presença das variantes E506\* e R576\* (patogênica) em *MRE11* demonstrou grande redução na taxa de reparo, quando comparadas à condição *MRE11* WT. Embora as taxas não representem a falta de reparo, a diminuição foi o suficiente para concluirmos que a presença dessas variantes causa deficiência no reparo de danos ao DNA por RH, corroborando aos outros achados nos ensaios funcionais.

Ainda vale ressaltar que a variante E506\* em *MRE11*, pode estar mais associada à perda de funcionalidade sexo-específico, reforçando a ideia de que o desenvolvimento tumoral em homens e mulheres podem diferir em relação a suas causalidades genéticas e mecanismos moleculares, assim como diferem nos aspectos clínico-patológicos e de prognóstico<sup>9, 105-107</sup>. Isso porque os

resultados observados diferiram entre as linhagens analisadas. Os ensaios realizados na linhagem KTMBE, proveniente de um paciente do sexo masculino, não demonstrou o mesmo impacto dos efeitos observados na linhagem MCF10AneoT. Com relação ao ensaio de restauração de fluorescência para determinação da taxa de recombinação homóloga, não podemos fazer essa comparação, já que contamos apenas com uma linhagem de CMF para sua realização.

A avaliação da patogenicidade de variantes presentes em vias de reparo ao DNA, principalmente na via da RH, como *BRIP1* e *MRE11*, se faz necessária para uma classificação definitiva de variantes identificadas nesses genes. Portadores de VPs em genes envolvidos nessa via e que, portanto, apresentam deficiência no seu funcionamento poderiam se beneficiar de tratamentos alternativos (aprovados em casos específicos)<sup>42, 43</sup>. Além dos *iPARP*, já aprovados para alguns casos, é crescente o número de estudos que investigam o benefício da imunoterapia para o tratamento do CM. Nessa perspectiva, *BRIP1* demonstrou ser um potencial preditor de resposta à imunoterapia, representando um biomarcador para diversos tipos de câncer<sup>163</sup>. Adicionalmente, alterações de genes da via de reparo por RH também foram considerados bons biomarcadores de resposta à imunoterapia<sup>171</sup>. De forma semelhante, a classificação definitiva de variantes em genes da via MMR, como o *MSH6*, permitiria que portadores dessas variantes pudessem se beneficiar de tratamentos diferentes dos comumente utilizados. Foi observado que os inibidores de ATR demonstraram uma capacidade de selecionar as células tumorais MMR deficientes como alvo, induzindo à letalidade sintética. Essa seria uma estratégia promissora em complemento à imunoterapia, uma vez que parte dos tumores com a via MMR deficiente não respondem a esse tipo de tratamento<sup>172</sup>.

A variante selecionada em *MSH6*, contempla a troca de uma Lisina por uma Serina no aminoácido 370 (L370S). Essa aminoácido está presente em uma região (aminoácidos 362 – 518) de *MSH6* que se liga intimamente e especificamente ao DNA, principalmente nas regiões não pareadas, para que o complexo MutS $\alpha$  (formado pelo heterodímero MSH2-MSH6) possa reconhecer o erro e atuar no reparo de danos por MMR<sup>83, 173</sup>. Portanto, a presença de variantes nesses aminoácidos pode alterar a forma com que a proteína resultante se relaciona com seus ligantes e, até mesmo com o DNA em que ela estará em contato. Variantes missense, em geral, representam um grande desafio na avaliação funcional. É importante ressaltar que, a avaliação desse tipo de variante em vias de reparo, como a MMR, pode trazer desafios ainda maiores. A escolha da linhagem celular, o tipo de transfecção utilizada e os ensaios a serem realizados são passos importantes para o sucesso das análises, no entanto trazem diversas dificuldades técnicas e metodológicas<sup>174</sup>. Há um crescente

surgimento de ensaios de larga escala para avaliação da patogenicidade de variantes visando, principalmente, diminuir o número de variantes classificadas como VUS. No entanto, vale lembrar que, apesar desses ensaios fornecerem dados importantes sobre mecanismos, ele também possuem diversos desafios e oferecem uma menor precisão, quando comparados a avaliações individuais<sup>175</sup>. Neste trabalho, buscamos realizar ensaios que pudessem avaliar a ligação de MSH6 com seu principal parceiro, MSH2, bem como funções celulares básicas, nas quais a proteína poderia influenciar (clonogenicidade e ciclo celular)<sup>174, 176</sup>.

Os resultados do ensaio clonogênico sugerem que a presença da variante R482\* afeta os processos celulares, no entanto, doses maiores de cisplatina podem causar um extenso dano nas células que, até mesmo na condição WT, as proteínas resultantes não são capazes de exercer o reparo e não sobrevivem. Na linhagem KTMBE, observamos que as variantes L370S e R482\* possuem um impacto na capacidade clonogênica em condições normais, no entanto, ao induzirmos o dano com cisplatina, as variantes possuem comportamento semelhante à condição WT. Esse fator, pode nos indicar que o tratamento com cisplatina afeta até mesmo a condição WT, visto que nas maiores doses de tratamento observamos poucas ou ausência de colônias.

Para a avaliação da formação do heterodímero MSH2-MSH6 realizamos o ensaio de imunoprecipitação. No entanto, apesar de observarmos pequenas variações nas taxas de MSH2 em relação à MSH6, essas diferenças não foram significativas, visto que foram realizados apenas dois experimentos (em detrimento do tempo para experimentação e reagentes) e o desvio padrão (SD) em algumas condições foi alto. Esses resultados podem nos dar um indício de que, principalmente a presença da variante R482\*, poderia impactar na formação do heterodímero MSH2-MSH6 para que o reparo ao DNA seja realizado mediante a indução de dano (tratamento com cisplatina). No entanto, serão necessárias outras replicatas biológicas para que essa afirmação seja confirmada. Diante disso, buscamos avaliar a co-localização das duas proteínas para observar se há presença das duas em concomitância. É importante frisar que esse ensaio não confirma se a capacidade de ligação entre MSH2 e MSH6 é afetada na presença das variantes, mas nos dá indícios de que ela pode ser dificultada, caso não estejam colocalizadas. Dessa forma, pudemos observar que, apesar de ainda haver a co-localização de MSH2-MSH6, a presença da variante R482\* em *MSH6* faz com que essa co-localização seja impactada, quando comparada com *MSH6* WT.

Nossas análises demonstram que a presença da variante L370S em *MSH6* não impacta nas funções da proteína resultante, uma vez que a avaliação de suas principais funções demonstrou resultados semelhante à condição WT. A discussão em torno dessa variante pode apresentar um

desafio ainda maior, já que ela está presente em um gene que predispõe a uma SH bem conhecida, a Síndrome de Lynch, que engloba diversos tipos tumorais, mas não há um consenso sobre a presença do CM em seu espectro<sup>177</sup>. Além disso, sua classificação em banco de dados doença-específicos é baseada em parâmetros atribuídos à variante diante de estudos realizados com portadores da SL, não levando em conta outros tipos tumorais. Considerando esse parâmetro, a perda capacidade de MSH6 se ligar à MSH2, resultando na formação do complexo MutS $\alpha$ , para que a via MMR seja eficiente, é um dos indícios de patogenicidade de variantes encontradas nos genes *MSH6*. Somado a isso, a perda ou diminuição da expressão das duas proteínas supracitadas no tumor representa um indício de deficiência na via MMR. No entanto, em um estudo que avaliou variantes missense, consideradas patogênicas, foi observado um padrão de expressão diferente do esperado pelos autores. Dois participantes com SL, portadores da mesma variante identificada em nosso estudo (c.1109T>C), apresentaram a expressão intacta de MSH2, sendo que um deles também apresentou a expressão de MSH6 intacta e o outro uma expressão de MSH6 parcial (coloração de 30%)<sup>178</sup>. Esse pode ser um indício de que a presença dessa variante pode não impactar na funcionalidade da proteína da forma esperada, ou, ainda, de que ela se utiliza de outros mecanismos para conferir patogenicidade, como a facilitação do acúmulo de variantes somáticas, não só em *MSH6*, mas em seus parceiros na via MMR, que possam implicar no desenvolvimento tumoral.

De acordo com nossos resultados, o parâmetro BP6 deveria ser atribuído para essa variante, segundo as recomendações da ACMG<sup>25</sup>. Considerando os outros parâmetros já atribuídos, sua classificação não mudaria, continuando como LP. No entanto, um ponto já abordado nessa tese é de que, embora essa variante não tenha demonstrado perda/diminuição de função e, possivelmente, não está ligada à causalidade da doença (CM), o participante do estudo, bem como seus familiares que possam ser portadores dessa variante, possuem um risco aumentado para o desenvolvimento de outros tipos tumorais. Portanto, é importante, do ponto vista clínico, que esse participante e seus familiares sigam em acompanhamento para que recebam o manejo adequado para o risco aumentado para outros tipos de câncer.

Com relação às variantes presentes em *FAN1*, classificadas como VUS, também foram avaliadas proteínas envolvidas no reparo de danos por RH (BRCA1 e RAD51) e de permanência de danos (p-H2A.X) nas condições com ou sem indução de dano (irradiação), nas linhagens OVCAR-3 e T-47D, para as construções de *FAN1*. Não observamos diferenças estatísticas quando comparamos as construções com a presença de variantes com a proteína WT na linhagem OVCAR-3. De maneira geral, todas as condições transfectadas apresentaram atividade de p-H2A.X (com variações), mesmo

quando não houve indução de dano, nos indicando que a transfecção de um DNA exógeno altera o funcionamento celular. Como já discutido neste trabalho para outras proteínas, esse fato nos indica que a transfecção de um DNA exógeno promove um estresse celular, provavelmente por causa do agente de transfecção utilizado, sinalizando o dano ao DNA.

Para a expressão de FAN1, observamos uma diminuição estatística significativa da condição *FAN1* KD em relação à *FAN1* WT, quando não há indução de dano, nas duas linhagens avaliadas, OVCAR-3 e T-47D. Quando as células são irradiadas, não encontramos diferença significativa entre essas condições na linhagem OVCAR-3. Para T-47D, FAN1 tem sua atividade reduzida em *FAN1* shSCRAMBLE, *FAN1* KD e *FAN1* R591Q. A diminuição da atividade de FAN1, principalmente quando comparamos as condições transfectadas com as condição *shSCRAMBLE* e *FAN1* KD, é um fenômeno esperado, uma vez que, assim como para as outras proteínas avaliadas neste estudo, as construções contendo com as sequências de *FAN1* foram transfectadas utilizando vetores com promotores de expressão CMV (presentes em pcDNA™5/FRT/TO)<sup>179</sup>. Esse promotor faz com que a expressão proteica seja aumentada em relação aos níveis de expressão da proteína endógena, quando consideramos a condição *shSCRAMBLE*<sup>159, 179</sup>.

Para as proteínas envolvidas na via de reparo ao DNA por RH, para a linhagem OVCAR-3, os resultados obtidos nos indicam que a presença das variantes S27F e R591Q impactam na atividade de RAD51, indicando uma possível falha no reparo de danos ao DNA por RH. Não observamos uma diferença estatística na atividade p-H2A.X dessas condições em relação à WT. Já foi descrito que o complexo FANCI-FANCD2 (ID2) se liga à RAD51, estabilizando o filamento RAD51-DNA e protegendo a extremidade do DNA na forquilha de replicação da degradação por FAN1, que está associada a ID2<sup>180</sup>. Adicionalmente, foi demonstrado que FAN1 é recrutada por FANCD2 ubiquitinada (Ub-FANCD2) para as forquilhas de replicação paralisadas, permitindo o processamento dessas estruturas e prevenindo anormalidades cromossômicas<sup>92</sup>. No mesmo trabalho, Lauchaud e colaboradores ainda observaram que uma variante presente em FAN1, que confere alto risco para câncer de pâncreas, aboliu o recrutamento da proteína por Ub-FANCD2, causando instabilidade genética, sem interferir no reparo de ICLs<sup>92</sup>. Diante disso, o impacto na atividade de RAD51, observado na linhagem OVCAR-3, pode significar uma maior atividade de degradação do DNA na presença das variantes em *FAN1* e, conseqüentemente, instabilidade genômica. Dessa forma, as células em divisão seriam enviadas para morte, o que explicaria a diminuição de p-H2A.X nessas condições, ainda que o dano não fosse resolvido.

Para a linhagem T-47D, apesar de observarmos diferenças nos níveis de expressão de FAN1, não observamos essas diferenças na atividade das proteínas envolvidas na via de reparo por RH avaliadas. O que nos leva a acreditar que, embora a presença dessas variantes impacte na expressão de FAN1, elas não interferem no recrutamento das proteínas na via de reparo por RH. Vale ressaltar que essa atividade diminuída pode impactar em funções que não foram avaliadas neste estudo. Ainda cabe destacar que a presença da variante R591Q, demonstra uma atividade proteica reduzida de p-H2A.X, o que nos indicaria uma resolução de danos na avaliação das células irradiadas. No entanto, é possível que, assim como observado para OVCAR-3, a proliferação celular na presença dessa variante seja aumentada na linhagem T-47D, fazendo com que sua divisão seja mais rápida do que as demais condições e, conseqüentemente, aquelas que não conseguiram resolver o dano, foram enviadas para a morte.

Essas observações ainda podem nos indicar que a presença das variantes afeta a funcionalidade de FAN1 de maneira tumor-dependente, uma vez que os resultados obtidos para uma linhagem derivada de um tumor de ovário, foram diferentes dos que observamos em uma linhagem derivada de tumor mamário. A implicação desses resultados é de que, provavelmente, a presença dessas variantes pode conferir um risco maior para o desenvolvimento de alguns tipos tumorais em detrimento de outros. Esse fato pode estar relacionado com a expressão basal de FAN1 em cada contexto genético, já que a diferença da atividade da proteína entre os modelos é expressiva. Nessa perspectiva, já foi observado que, uma variante missense que afeta o funcionamento da proteína FANCI, uma das principais parceiras de FAN1<sup>85</sup>, fez com que o gene fosse considerado como de predisposição ao câncer de ovário em famílias franco-canadenses (OR = 5,8; IC 95% = 1,7 – 19)<sup>181</sup>.

A partir dos resultados obtidos para a avaliação das variantes encontradas em *FAN1*, concluímos que as variantes S27F e R591Q demonstram um comportamento patogênico, porém, esse comportamento é tecido-dependente, uma vez que, para o modelo mamário, essas variantes se assemelham à condição WT. Diante disso, são necessários outros tipos de estudos, que avaliem melhor a funcionalidade da proteína em outros contextos, como na ligação com seus principais parceiros e na via de reparo de danos ICLs. Assim, seria possível uma melhor caracterização do impacto dessas variantes e aplicação de parâmetros que auxiliem na sua classificação quanto à patogenicidade.

As principais limitações encontradas na Etapa II, referente aos estudos funcionais foram o estabelecimento de modelos *knockout* para os genes selecionados e a interferência do método de

transfecção utilizado<sup>174</sup>. No entanto, acreditamos que fomos capazes de contornar alguns desses problemas, utilizando ensaios robustos e complementares que pudessem auxiliar na avaliação de alguns parâmetros de funcionalidade das proteínas selecionadas. Outra limitação é a falta de ensaios bem estabelecidos que possam auxiliar na caracterização funcional de proteínas envolvidas em algumas vias específicas. Seria interessante que houvesse o estabelecimento e padronização de ensaios que pudessem avaliar de forma eficiente o impacto de variantes na proteína resultante, principalmente para variantes missense. Os ensaios funcionais compõem um parâmetro importante, com alto nível de evidência, no processo de classificação de variantes<sup>25</sup>. A partir dele podemos fornecer mais dados que possam auxiliar nessa classificação e, posteriormente, no manejo dos pacientes/famílias portadores dessas variantes.

## 7. Conclusões

Em conclusão, este é o primeiro estudo com homens brasileiros diagnosticados com câncer de mama, utilizando uma abordagem genômica para avaliar potenciais variantes de predisposição para este tipo tumoral. Através das nossas análises, conseguimos estabelecer relações entre variantes genéticas, sejam elas germinativas ou somáticas, e o desenvolvimento da doença, para 7 (23,33%) participantes do estudo. Diante disso, o estudo contribui para o conhecimento atual sobre a genética do CMM e ressalta a importância de uma abordagem genômica para uma melhor compreensão das causalidades genéticas da doença.

Foi possível caracterizar nossa amostra de estudo quando aos aspectos clínico-patológicos e de história pessoal e familiar. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 55 anos, a maioria dos homens foi diagnosticada nos estágios iniciais da doença e não observamos tumores triplo-negativos. A maioria dos homens relatou história familiar de câncer (87%), sendo que 43,3% dos participantes reportaram outro caso de câncer de mama na família.

Utilizando o sequenciamento de exoma, identificamos variantes P/PP em 30% dos participantes, representando 4,8% de todas as variantes identificadas. No geral, 19,5% das variantes identificadas estavam presentes em genes das vias de reparo de danos ao DNA. Entre as variantes P/PP, 44,4% estavam em genes de predisposição ao câncer e 44,4% em genes de reparo ao DNA. Essas variantes foram classificadas quanto à sua patogenicidade seguindo os critérios estabelecidos pela ACMG. Ainda foi possível identificar variantes somáticas que desempenham um papel importante no desenvolvimento do câncer de mama em tumores de três pacientes, sendo que dois deles não possuíam variantes germinativas consideradas P/PP.

Com relação às variantes selecionadas para os estudos funcionais, classificadas como patogênicas, a variante identificada em *MRE11* demonstra um comportamento semelhante ao de uma variante patogênica, visto que sua presença impacta na deficiência das linhagens celulares no reparo de danos ao DNA e ineficácia na resolução do dano ao longo do tempo. Já as variantes identificadas em *BRIP1* e *MSH6*, demonstram um comportamento semelhante à condição WT, sem impactar na funcionalidade da proteína resultante. As variantes presentes em *FAN1*, classificadas como VUS, apresentaram resultados tumor-dependentes, demonstrando comportamento patogênico na linhagem celular de câncer de ovário.

Embora outras abordagens sejam necessárias para a classificação das variantes analisadas, os resultados obtidos neste estudo representam uma importante contribuição no fornecimento de dados que possam auxiliar na classificação definitiva quanto à sua patogenicidade.

## REFERÊNCIAS

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. *Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ2022.* 160 p.
3. Howlader N NA, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2018, National Cancer Institute2021.* Available from: [https://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2018/](https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/).
4. 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.
5. 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.
6. Kopanos C, Tsiolkas V, Kouris A, Chapple CE, Albarca Aguilera M, Meyer R, et al. *VarSome: the human genomic variant search engine. Bioinformatics.* 2019;35(11):1978-80.
7. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Wenger AM, Zehir A, Mesirov JP. *Variant Review with the Integrative Genomics Viewer. Cancer Res.* 2017;77(21):e31-e4.
8. Wang F, Shu X, Meszoely I, Pal T, Mayer IA, Yu Z, et al. *Overall Mortality After Diagnosis of Breast Cancer in Men vs Women. JAMA Oncol.* 2019;5(11):1589-96.
9. Scomersi S, Giudici F, Cacciatore G, Losurdo P, Fracon S, Cortinovis S, et al. *Comparison between male and female breast cancer survival using propensity score matching analysis. Sci Rep.* 2021;11(1):11639.
10. Fostira F, Saloustros E, Apostolou P, Vagena A, Kalfakakou D, Mauri D, et al. *Germline deleterious mutations in genes other than BRCA2 are infrequent in male breast cancer. Breast Cancer Res Treat.* 2018;169(1):105-13.
11. Tai YC, Domchek S, Parmigiani G, Chen S. *Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. J Natl Cancer Inst.* 2007;99(23):1811-4.
12. Li S, Silvestri V, Leslie G, Rebbeck TR, Neuhausen SL, Hopper JL, et al. *Cancer Risks Associated With BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants. J Clin Oncol.* 2022;40(14):1529-41.
13. Das R, Ghosh SK. *Genetic variants of the DNA repair genes from Exome Aggregation Consortium (EXAC) database: significance in cancer. DNA Repair (Amst).* 2017;52:92-102.

14. Petrucelli N DM, Pal T. *BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer*. **GeneReviews®: Seattle (WA): University of Washington, Seattle**; 1993-2024. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1247/>.
15. Pritzlaff M, Summerour P, McFarland R, Li S, Reineke P, Dolinsky JS, et al. *Male breast cancer in a multi-gene panel testing cohort: insights and unexpected results*. **Breast Cancer Res Treat**. 2017;161(3):575-86.
16. Giordano SH. *Breast Cancer in Men*. **N Engl J Med**. 2018;378(24):2311-20.
17. Bucalo A, Conti G, Valentini V, Capalbo C, Bruselles A, Tartaglia M, et al. *Male breast cancer risk associated with pathogenic variants in genes other than BRCA1/2: an Italian case-control study*. **Eur J Cancer**. 2023;188:183-91.
18. Rolfes M, Borde J, Mollenhoff K, Kayali M, Ernst C, Gehrig A, et al. *Prevalence of Cancer Predisposition Germline Variants in Male Breast Cancer Patients: Results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer*. **Cancers (Basel)**. 2022;14(13).
19. Tedaldi G, Tebaldi M, Zampiga V, Cangini I, Pirini F, Ferracci E, et al. *Male Breast Cancer: Results of the Application of Multigene Panel Testing to an Italian Cohort of Patients*. **Diagnostics (Basel)**. 2020;10(5).
20. Doddato G, Valentino F, Giliberti A, Papa FT, Tita R, Bruno LP, et al. *Exome sequencing in BRCA1-2 candidate families: the contribution of other cancer susceptibility genes*. **Front Oncol**. 2021;11:649435.
21. Felicio PS, Grasel RS, Campacci N, de Paula AE, Galvao HCR, Torrezan GT, et al. *Whole-exome sequencing of non-BRCA1/BRCA2 mutation carrier cases at high-risk for hereditary breast/ovarian cancer*. **Hum Mutat**. 2021;42(3):290-9.
22. Hao S, Huang M, Tian W, Chen Y, Zhao J, Luo D. *Whole Exome Sequencing in the Male Breast Cancer with Prolactinoma: A Case Report and Literature Review*. **J Breast Cancer**. 2020;23(6):656-64.
23. Silvestri V, Zelli V, Valentini V, Rizzolo P, Navazio AS, Coppa A, et al. *Whole-exome sequencing and targeted gene sequencing provide insights into the role of PALB2 as a male breast cancer susceptibility gene*. **Cancer**. 2017;123(2):210-8.
24. Petersen BS, Fredrich B, Hoepfner MP, Ellinghaus D, Franke A. *Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing*. **BMC Genet**. 2017;18(1):14.
25. 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.

26. Plon SE, Eccles DM, Easton D, Foulkes WD, Genuardi M, Greenblatt MS, et al. *Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. Hum Mutat.* 2008;29(11):1282-91.

27. Medline. Bhat V, Adzhubei IA, Fife JD, Lebo M, Cassa CA. *Informing variant assessment using structured evidence from prior classifications (PS1, PM5, and PVS1 sequence variant interpretation criteria). Genet Med.* 2023;25(1):16-26.

28. Medline. Preston CG, Wright MW, Madhavrao R, Harrison SM, Goldstein JL, Luo X, et al. *ClinGen Variant Curation Interface: a variant classification platform for the application of evidence criteria from ACMG/AMP guidelines. Genome Med.* 2022;14(1):6.

29. Medline. Tavgigian SV, Harrison SM, Boucher KM, Biesecker LG. *Fitting a naturally scaled point system to the ACMG/AMP variant classification guidelines. Hum Mutat.* 2020;41(10):1734-7.

30. Medline. Thomassen M, Mesman RLS, Hansen TVO, Menendez M, Rossing M, Esteban-Sanchez A, et al. *Clinical, splicing, and functional analysis to classify BRCA2 exon 3 variants: Application of a points-based ACMG/AMP approach. Hum Mutat.* 2022;43(12):1921-44.

31. Medline. Fortuno C, Lee K, Olivier M, Pesaran T, Mai PL, de Andrade KC, et al. *Specifications of the ACMG/AMP variant interpretation guidelines for germline TP53 variants. Hum Mutat.* 2021;42(3):223-36.

32. Medline. Lee K, Krempely K, Roberts ME, Anderson MJ, Carneiro F, Chao E, et al. *Specifications of the ACMG/AMP variant curation guidelines for the analysis of germline CDH1 sequence variants. Hum Mutat.* 2018;39(11):1553-68.

33. Medline. Vargas-Parra G, Del Valle J, Rofes P, Gausachs M, Stradella A, Moreno-Cabrera JM, et al. *Comprehensive analysis and ACMG-based classification of CHEK2 variants in hereditary cancer patients. Hum Mutat.* 2020;41(12):2128-42.

34. Guidugli L, Shimelis H, Masica DL, Pankratz VS, Lipton GB, Singh N, et al. *Assessment of the Clinical Relevance of BRCA2 Missense Variants by Functional and Computational Approaches. Am J Hum Genet.* 2018;102(2):233-48.

35. Scarpitta R, Zanna I, Aretini P, Gambino G, Scatena C, Mei B, et al. *Germline investigation in male breast cancer of DNA repair genes by next-generation sequencing. Breast Cancer Res Treat.* 2019;178(3):557-64.

36. Andre S, S PN, Silva F, Henrique R, Felix A, Jeronimo C. *Analysis of Epigenetic Alterations in Homologous Recombination DNA Repair Genes in Male Breast Cancer*. **Int J Mol Sci**. 2020;21(8).
37. Rizzolo P, Silvestri V, Valentini V, Zelli V, Zanna I, Masala G, et al. *Gene-specific methylation profiles in BRCA-mutation positive and BRCA-mutation negative male breast cancers*. **Oncotarget**. 2018;9(28):19783-92.
38. Nguyen L, J WMM, Van Hoeck A, Cuppen E. *Pan-cancer landscape of homologous recombination deficiency*. **Nat Commun**. 2020;11(1):5584.
39. Riaz N, Blecua P, Lim RS, Shen R, Higginson DS, Weinhold N, et al. *Pan-cancer analysis of bi-allelic alterations in homologous recombination DNA repair genes*. **Nat Commun**. 2017;8(1):857.
40. Westphalen CB, Fine AD, Andre F, Ganesan S, Heinemann V, Rouleau E, et al. *Pan-cancer Analysis of Homologous Recombination Repair-associated Gene Alterations and Genome-wide Loss-of-Heterozygosity Score*. **Clin Cancer Res**. 2022;28(7):1412-21.
41. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, et al. *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy*. **Nature**. 2005;434(7035):917-21.
42. *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION - ZEJULA (Niraparib)*. In: Administration USFD, editor.
43. *HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION - LYNPARZA® (Olaparib)*. In: Administration USFD, editor.
44. Bhardwaj PV, Gupta S, Elyash A, Teplinsky E. *Male Breast Cancer: a Review on Diagnosis, Treatment, and Survivorship*. **Curr Oncol Rep**. 2024;26(1):34-45.
45. Corti C, Crimini E, Criscitiello C, Trapani D, Curigliano G. *Adjuvant treatment of early male breast cancer*. **Curr Opin Oncol**. 2020;32(6):594-602.
46. Hassett MJ, Somerfield MR, Baker ER, Cardoso F, Kansal KJ, Kwait DC, et al. *Management of Male Breast Cancer: ASCO Guideline*. **J Clin Oncol**. 2020;38(16):1849-63.
47. Venigalla S, Carmona R, Guttman DM, Jain V, Freedman GM, Clark AS, et al. *Use and Effectiveness of Adjuvant Endocrine Therapy for Hormone Receptor-Positive Breast Cancer in Men*. **JAMA Oncol**. 2018;4(10):e181114.
48. Ledermann J, Harter P, Gourley C, Friedlander M, Vergote I, Rustin G, et al. *Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer*. **N Engl J Med**. 2012;366(15):1382-92.
49. Poveda A, Floquet A, Ledermann JA, Asher R, Penson RT, Oza AM, et al. *Olaparib tablets as maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed ovarian cancer and a BRCA1/2*

- mutation (SOLO2/ENGOT-Ov21): a final analysis of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. Lancet Oncol.* 2021;22(5):620-31.
50. Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. *Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. N Engl J Med.* 2017;377(6):523-33.
51. Golan T, Hammel P, Reni M, Van Cutsem E, Macarulla T, Hall MJ, et al. *Maintenance Olaparib for Germline BRCA-Mutated Metastatic Pancreatic Cancer. N Engl J Med.* 2019;381(4):317-27.
52. Kaelin WG, Jr. *The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy. Nat Rev Cancer.* 2005;5(9):689-98.
53. Mendes-Pereira AM, Martin SA, Brough R, McCarthy A, Taylor JR, Kim JS, et al. *Synthetic lethal targeting of PTEN mutant cells with PARP inhibitors. EMBO Mol Med.* 2009;1(6-7):315-22.
54. McCabe N, Turner NC, Lord CJ, Kluzek K, Bialkowska A, Swift S, et al. *Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. Cancer Res.* 2006;66(16):8109-15.
55. Buisson R, Dion-Cote AM, Coulombe Y, Launay H, Cai H, Stasiak AZ, et al. *Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. Nat Struct Mol Biol.* 2010;17(10):1247-54.
56. Ghosh S, Sur S, Yerram SR, Rago C, Bhunia AK, Hossain MZ, et al. *Hypersensitivities for acetaldehyde and other agents among cancer cells null for clinically relevant Fanconi anemia genes. Am J Pathol.* 2014;184(1):260-70.
57. Daly MB, Pal T, Maxwell KN, Churpek J, Kohlmann W, AlHilli Z, et al. *NCCN Guidelines(R) Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic, Version 2.2024. J Natl Compr Canc Netw.* 2023;21(10):1000-10.
58. Harris PA, Taylor R, Thielke R, Payne J, Gonzalez N, Conde JG. *Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. J Biomed Inform.* 2009;42(2):377-81.
59. Tate JG, Bamford S, Jubb HC, Sondka Z, Beare DM, Bindal N, et al. *COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D941-D7.
60. UniProt C. *UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. Nucleic Acids Res.* 2019;47(D1):D506-D15.
61. Pletscher-Frankild S, Palleja A, Tsafou K, Binder JX, Jensen LJ. *DISEASES: text mining and data integration of disease-gene associations. Methods.* 2015;74:83-9.

62. Wang K, Li M, Hakonarson H. *ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data*. **Nucleic Acids Res.** 2010;38(16):e164.
63. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown G, Chao C, Chitipiralla S, et al. *ClinVar: public archive of interpretations of clinically relevant variants*. **Nucleic Acids Res.** 2016;44(D1):D862-8.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, et al. *Integrative genomics viewer*. **Nat Biotechnol.** 2011;29(1):24-6.
71. Morales J, Pujar S, Loveland JE, Astashyn A, Bennett R, Berry A, et al. *A joint NCBI and EMBL-EBI transcript set for clinical genomics and research*. **Nature.** 2022;604(7905):310-5.
72. Neuber AC, Tostes CH, Ribeiro AG, Marczyński GT, Komoto TT, Rogeri CD, et al. *The biobank of barretos cancer hospital: 14 years of experience in cancer research*. **Cell Tissue Bank.** 2022;23(2):271-84.
73. Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, Del Angel G, Levy-Moonshine A, et al. *From FastQ data to high confidence variant calls: the Genome Analysis Toolkit best practices pipeline*. **Curr Protoc Bioinformatics.** 2013;43:11 0 1- 0 33.
74. Tamborero D, Rubio-Perez C, Deu-Pons J, Schroeder MP, Vivancos A, Rovira A, et al. *Cancer Genome Interpreter annotates the biological and clinical relevance of tumor alterations*. **Genome Med.** 2018;10(1):25.

75. Castera L, Harter V, Muller E, Krieger S, Goardon N, Ricou A, et al. *Landscape of pathogenic variations in a panel of 34 genes and cancer risk estimation from 5131 HBOC families*. **Genet Med**. 2018;20(12):1677-86.
76. Domchek SM, Robson ME. *Update on Genetic Testing in Gynecologic Cancer*. **J Clin Oncol**. 2019;37(27):2501-9.
77. Ofverholm A, Torngren T, Rosen A, Arver B, Einbeigi Z, Haraldsson K, et al. *Extended genetic analysis and tumor characteristics in over 4600 women with suspected hereditary breast and ovarian cancer*. **BMC Cancer**. 2023;23(1):738.
78. Suszynska M, Ratajska M, Kozlowski P. *BRIP1, RAD51C, and RAD51D mutations are associated with high susceptibility to ovarian cancer: mutation prevalence and precise risk estimates based on a pooled analysis of ~30,000 cases*. **J Ovarian Res**. 2020;13(1):50.
79. Hanson H, Kulkarni A, Loong L, Kavanaugh G, Torr B, Allen S, et al. *UK consensus recommendations for clinical management of cancer risk for women with germline pathogenic variants in cancer predisposition genes: RAD51C, RAD51D, BRIP1 and PALB2*. **J Med Genet**. 2023;60(5):417-29.
80. Yamamoto H, Hirasawa A. *Homologous Recombination Deficiencies and Hereditary Tumors*. **Int J Mol Sci**. 2021;23(1).
81. Stewart GS, Maser RS, Stankovic T, Bressan DA, Kaplan MI, Jaspers NG, et al. *The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder*. **Cell**. 1999;99(6):577-87.
82. Matsumoto Y, Miyamoto T, Sakamoto H, Izumi H, Nakazawa Y, Ogi T, et al. *Two unrelated patients with MRE11A mutations and Nijmegen breakage syndrome-like severe microcephaly*. **DNA Repair (Amst)**. 2011;10(3):314-21.
83. Edelbrock MA, Kaliyaperumal S, Williams KJ. *Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities*. **Mutat Res**. 2013;743-744:53-66.
84. Shereda RD, Machida Y, Machida YJ. *Human KIAA1018/FAN1 localizes to stalled replication forks via its ubiquitin-binding domain*. **Cell Cycle**. 2010;9(19):3977-83.
85. MacKay C, Declais AC, Lundin C, Agostinho A, Deans AJ, MacArtney TJ, et al. *Identification of KIAA1018/FAN1, a DNA repair nuclease recruited to DNA damage by monoubiquitinated FANCD2*. **Cell**. 2010;142(1):65-76.

86. Smogorzewska A, Desetty R, Saito TT, Schlabach M, Lach FP, Sowa ME, et al. *A genetic screen identifies FAN1, a Fanconi anemia-associated nuclease necessary for DNA interstrand crosslink repair.* **Mol Cell.** 2010;39(1):36-47.
87. Huang M, D'Andrea AD. *A new nuclease member of the FAN club.* **Nat Struct Mol Biol.** 2010;17(8):926-8.
88. Nepal M, Che R, Ma C, Zhang J, Fei P. *FANCD2 and DNA Damage.* **Int J Mol Sci.** 2017;18(8).
89. Porro A, Berti M, Pizzolato J, Bologna S, Kaden S, Saxer A, et al. *FAN1 interaction with ubiquitylated PCNA alleviates replication stress and preserves genomic integrity independently of BRCA2.* **Nat Commun.** 2017;8(1):1073.
90. Belhadj S, Terradas M, Munoz-Torres PM, Aiza G, Navarro M, Capella G, et al. *Candidate genes for hereditary colorectal cancer: Mutational screening and systematic review.* **Hum Mutat.** 2020;41(9):1563-76.
91. Garcia FAO, de Andrade ES, de Campos Reis Galvao H, da Silva Sabato C, Campacci N, de Paula AE, et al. *New insights on familial colorectal cancer type X syndrome.* **Sci Rep.** 2022;12(1):2846.
92. Lachaud C, Moreno A, Marchesi F, Toth R, Blow JJ, Rouse J. *Ubiquitinated Fancd2 recruits Fan1 to stalled replication forks to prevent genome instability.* **Science.** 2016;351(6275):846-9.
93. Basolo F, Elliott J, Tait L, Chen XQ, Maloney T, Russo IH, et al. *Transformation of human breast epithelial cells by c-Ha-ras oncogene.* **Mol Carcinog.** 1991;4(1):25-35.
94. Vriend LE, Jasin M, Krawczyk PM. *Assaying break and nick-induced homologous recombination in mammalian cells using the DR-GFP reporter and Cas9 nucleases.* **Methods Enzymol.** 2014;546:175-91.
95. Dirks WG, Faehnrich S, Estella IA, Drexler HG. *Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines.* **ALTEX.** 2005;22(2):103-9.
96. Holliday DL, Speirs V. *Choosing the right cell line for breast cancer research.* **Breast Cancer Res.** 2011;13(4):215.
97. Khan NJ. *Cell Lines: An Invitro Model To Study Breast Cancer.* **International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology.** 2013;2(12):7214-9.
98. Cantor S, Drapkin R, Zhang F, Lin Y, Han J, Pamidi S, et al. *The BRCA1-associated protein BACH1 is a DNA helicase targeted by clinically relevant inactivating mutations.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2004;101(8):2357-62.
99. Geissmann Q. *OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects.* **PLoS One.** 2013;8(2):e54072.

100. Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* **Anal Biochem.** 1976;72:248-54.
101. Gunn A, Stark JM. *I-SceI-based assays to examine distinct repair outcomes of mammalian chromosomal double strand breaks.* **Methods Mol Biol.** 2012;920:379-91.
102. Seluanov A, Mao Z, Gorbunova V. *Analysis of DNA double-strand break (DSB) repair in mammalian cells.* **J Vis Exp.** 2010(43).
103. Bolte S, Cordelieres FP. *A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy.* **J Microsc.** 2006;224(Pt 3):213-32.
104. Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, Nastou K, Mehryary F, Hachilif R, et al. *The STRING database in 2023: protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest.* **Nucleic Acids Res.** 2023;51(D1):D638-D46.
105. Lee EG, Jung SY, Lim MC, Lim J, Kang HS, Lee S, et al. *Comparing the Characteristics and Outcomes of Male and Female Breast Cancer Patients in Korea: Korea Central Cancer Registry.* **Cancer Res Treat.** 2020;52(3):739-46.
106. Fang W, Huang Y, Han X, Peng J, Zheng M. *Characteristics of metastasis and survival between male and female breast cancer with different molecular subtypes: A population-based observational study.* **Cancer Med.** 2022;11(3):764-77.
107. Yao N, Shi W, Liu T, Siyin ST, Wang W, Duan N, et al. *Clinicopathologic characteristics and prognosis for male breast cancer compared to female breast cancer.* **Sci Rep.** 2022;12(1):220.
108. Rizzolo P, Zelli V, Silvestri V, Valentini V, Zanna I, Bianchi S, et al. *Insight into genetic susceptibility to male breast cancer by multigene panel testing: Results from a multicenter study in Italy.* **Int J Cancer.** 2019;145(2):390-400.
109. Wang X, Liu S, Xue Y. *Clinicopathological features and prognosis of male breast cancer.* **J Int Med Res.** 2021;49(10):3000605211049977.
110. Leone J, Freedman RA, Lin NU, Tolaney SM, Vallejo CT, Leone BA, et al. *Tumor subtypes and survival in male breast cancer.* **Breast Cancer Res Treat.** 2021;188(3):695-702.
111. Co M, Lee A, Kwong A. *Delayed presentation, diagnosis, and psychosocial aspects of male breast cancer.* **Cancer Med.** 2020;9(10):3305-9.
112. Accomasso F, Actis S, Minella C, Rosso R, Granaglia C, Ponzzone R, et al. *Clinical, Pathological, and Prognostic Features of Male Breast Cancer: A Multicenter Study.* **Curr Oncol.** 2023;30(11):9860-71.

113. Al Saati A, Vande Perre P, Plenecassagnes J, Gilhodes J, Monselet N, Cabarrou B, et al. *Multigene Panel Sequencing Identifies a Novel Germline Mutation Profile in Male Breast Cancer Patients*. **Int J Mol Sci**. 2023;24(18).
114. Zhou FF, Xia LP, Wang X, Guo GF, Rong YM, Qiu HJ, et al. *Analysis of prognostic factors in male breast cancer: a report of 72 cases from a single institution*. **Chin J Cancer**. 2010;29(2):184-8.
115. Frebourg T, Bajalica Lagercrantz S, Oliveira C, Magenheimer R, Evans DG, European Reference Network G. *Guidelines for the Li-Fraumeni and heritable TP53-related cancer syndromes*. **Eur J Hum Genet**. 2020;28(10):1379-86.
116. Mangone L, Ferrari F, Mancuso P, Carrozzi G, Michiara M, Falcini F, et al. *Epidemiology and biological characteristics of male breast cancer in Italy*. **Breast Cancer**. 2020;27(4):724-31.
117. Cardoso F, Bartlett JMS, Slaets L, van Deurzen CHM, van Leeuwen-Stok E, Porter P, et al. *Characterization of male breast cancer: results of the EORTC 10085/TBCRC/BIG/NABCG International Male Breast Cancer Program*. **Ann Oncol**. 2018;29(2):405-17.
118. Ghani S, Sochat M, Luo J, Tao Y, Ademuyiwa F. *Characteristics of male triple negative breast cancer: A population-based study*. **Breast J**. 2020;26(9):1748-55.
119. Calip GS, Kidd J, Bernhisel R, Cox HC, Saam J, Rauscher GH, et al. *Family history of breast cancer in men with non-BRCA male breast cancer: implications for cancer risk counseling*. **Breast Cancer Res Treat**. 2021;185(1):195-204.
120. Zheng G, Yu H, Hemminki A, Forsti A, Sundquist K, Hemminki K. *Familial associations of male breast cancer with other cancers*. **Breast Cancer Res Treat**. 2017;166(3):897-902.
121. Guindalini RSC, Viana DV, Kitajima J, Rocha VM, Lopez RVM, Zheng Y, et al. *Detection of germline variants in Brazilian breast cancer patients using multigene panel testing*. **Sci Rep**. 2022;12(1):4190.
122. Boonen R, Rodrigue A, Stoepker C, Wiegant WW, Vroling B, Sharma M, et al. *Functional analysis of genetic variants in the high-risk breast cancer susceptibility gene PALB2*. **Nat Commun**. 2019;10(1):5296.
123. Calvo JA, Fritchman B, Hernandez D, Persky NS, Johannessen CM, Piccioni F, et al. *Comprehensive Mutational Analysis of the BRCA1-Associated DNA Helicase and Tumor-Suppressor FANCI/BACH1/BRIP1*. **Mol Cancer Res**. 2021;19(6):1015-25.
124. Bharti SK, Sommers JA, Awate S, Bellani MA, Khan I, Bradley L, et al. *A minimal threshold of FANCI helicase activity is required for its response to replication stress or double-strand break repair*. **Nucleic Acids Res**. 2018;46(12):6238-56.

125. Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, Zhao W, Yilmaz A, Miller K, et al. *Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer*. **JAMA Oncol**. 2017;3(4):464-71.
126. Batte BA, Bruegl AS, Daniels MS, Ring KL, Dempsey KM, Djordjevic B, et al. *Consequences of universal MSI/IHC in screening ENDOMETRIAL cancer patients for Lynch syndrome*. **Gynecol Oncol**. 2014;134(2):319-25.
127. Egoavil C, Alenda C, Castillejo A, Paya A, Peiro G, Sanchez-Heras AB, et al. *Prevalence of Lynch syndrome among patients with newly diagnosed endometrial cancers*. **PLoS One**. 2013;8(11):e79737.
128. Lu HM, Li S, Black MH, Lee S, Hoiness R, Wu S, et al. *Association of Breast and Ovarian Cancers With Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing*. **JAMA Oncol**. 2019;5(1):51-7.
129. Dai M, Yan G, Wang N, Daliah G, Edick AM, Poulet S, et al. *In vivo genome-wide CRISPR screen reveals breast cancer vulnerabilities and synergistic mTOR/Hippo targeted combination therapy*. **Nat Commun**. 2021;12(1):3055.
130. Rizzolo P, Silvestri V, Bucalo A, Zelli V, Valentini V, Catucci I, et al. *Contribution of MUTYH Variants to Male Breast Cancer Risk: Results From a Multicenter Study in Italy*. **Front Oncol**. 2018;8:583.
131. 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.
132. Thompson AB, Sutcliffe EG, Arvai K, Roberts ME, Susswein LR, Marshall ML, et al. *Monoallelic MUTYH pathogenic variants ascertained via multi-gene hereditary cancer panels are not associated with colorectal, endometrial, or breast cancer*. **Fam Cancer**. 2022;21(4):415-22.
133. Keske A, Weisman P, Ospina-Romero M, Raut P, Smith-Simmer K, Zakas AL, et al. *Breast cancers in monoallelic MUTYH germline mutation carriers have clinicopathological features overlapping with those in BRCA1 germline mutation carriers*. **Breast Cancer Res Treat**. 2024;204(1):151-8.
134. Win AK, Reece JC, Dowty JG, Buchanan DD, Clendenning M, Rosty C, et al. *Risk of extracolonic cancers for people with biallelic and monoallelic mutations in MUTYH*. **Int J Cancer**. 2016;139(7):1557-63.
135. Ditonno I, Novielli D, Celiberto F, Rizzi S, Rendina M, Ierardi E, et al. *Molecular Pathways of Carcinogenesis in Familial Adenomatous Polyposis*. **Int J Mol Sci**. 2023;24(6).

136. Asano Y, Takeuchi T, Okubo H, Saigo C, Kito Y, Iwata Y, et al. *Nuclear localization of LDL receptor-related protein 1B in mammary gland carcinogenesis*. **J Mol Med (Berl)**. 2019;97(2):257-68.
137. Barazas M, Annunziato S, Pettitt SJ, de Krijger I, Ghezraoui H, Roobol SJ, et al. *The CST Complex Mediates End Protection at Double-Strand Breaks and Promotes PARP Inhibitor Sensitivity in BRCA1-Deficient Cells*. **Cell Rep**. 2018;23(7):2107-18.
138. Cui Q, Kong D, Li Z, Ahiable P, Wang K, Wu K, et al. *Dachshund 1 is Differentially Expressed Between Male and Female Breast Cancer: A Matched Case-Control Study of Clinical Characteristics and Prognosis*. **Clin Breast Cancer**. 2018;18(5):e875-e82.
139. Jastaniah W, Aljefri A, Ayas M, Alharbi M, Alkhayat N, Al-Anzi F, et al. *Prevalence of hereditary cancer susceptibility syndromes in children with cancer in a highly consanguineous population*. **Cancer Epidemiol**. 2018;55:88-95.
140. Wild JB, Hwang MJ, Jones G. *A meta-analysis of consanguinity and breast cancer*. **Ir J Med Sci**. 2018;187(4):895-9.
141. Moelans CB, de Ligt J, van der Groep P, Prins P, Besselink NJM, Hoogstraat M, et al. *The molecular genetic make-up of male breast cancer*. **Endocr Relat Cancer**. 2019;26(10):779-94.
142. Chen JW, Murugesan K, Newberg JY, Sokol ES, Savage HM, Stout TJ, et al. *Comparison of PIK3CA Mutation Prevalence in Breast Cancer Across Predicted Ancestry Populations*. **JCO Precis Oncol**. 2022;6:e2200341.
143. Martinez-Saez O, Chic N, Pascual T, Adamo B, Vidal M, Gonzalez-Farre B, et al. *Frequency and spectrum of PIK3CA somatic mutations in breast cancer*. **Breast Cancer Res**. 2020;22(1):45.
144. Bando H, Ohtsu A, Yoshino T. *Therapeutic landscape and future direction of metastatic colorectal cancer*. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. 2023;20(5):306-22.
145. Morris VK, Kennedy EB, Baxter NN, Benson AB, 3rd, Cercek A, Cho M, et al. *Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: ASCO Guideline*. **J Clin Oncol**. 2023;41(3):678-700.
146. Li C, Zhang G, Wang Y, Chen B, Li K, Cao L, et al. *Spectrum of MAP3K1 mutations in breast cancer is luminal subtype-predominant and related to prognosis*. **Oncol Lett**. 2022;23(2):68.
147. Kuo SH, Wei MF, Lee YH, Lin JC, Yang WC, Yang SY, et al. *MAP3K1 expression is associated with progression and poor prognosis of hormone receptor-positive, HER2-negative early-stage breast cancer*. **Cell Oncol (Dordr)**. 2023;46(5):1213-34.
148. Kwong A, Cheuk IW, Shin VY, Ho CY, Au CH, Ho DN, et al. *Somatic mutation profiling in BRCA-negative breast and ovarian cancer patients by multigene panel sequencing*. **Am J Cancer Res**. 2020;10(9):2919-32.

149. Mehta PA, Ebens C. *Fanconi Anemia*. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LH, et al., editors. *GeneReviews*((R)). **Seattle (WA)**1993.
150. Cerretelli G, Ager A, Arends MJ, Frayling IM. *Molecular pathology of Lynch syndrome*. **J Pathol**. 2020;250(5):518-31.
151. Idos G, Valle L. *Lynch Syndrome*. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LH, et al., editors. *GeneReviews*((R)). **Seattle (WA)**1993.
152. Maratt JK, Stoffel E. *Identification of Lynch Syndrome*. **Gastrointest Endosc Clin N Am**. 2022;32(1):45-58.
153. Tamura K, Kaneda M, Futagawa M, Takeshita M, Kim S, Nakama M, et al. *Genetic and genomic basis of the mismatch repair system involved in Lynch syndrome*. **Int J Clin Oncol**. 2019;24(9):999-1011.
154. Xiao Y, Weaver DT. *Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells*. **Nucleic Acids Res**. 1997;25(15):2985-91.
155. Kim JH, Penson AV, Taylor BS, Petrini JHJ. *Nbn-Mre11 interaction is required for tumor suppression and genomic integrity*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2019;116(30):15178-83.
156. Young LC, Keuling AM, Lai R, Nation PN, Tron VA, Andrew SE. *The associated contributions of p53 and the DNA mismatch repair protein Msh6 to spontaneous tumorigenesis*. **Carcinogenesis**. 2007;28(10):2131-8.
157. Hegan DC, Narayanan L, Jirik FR, Edelmann W, Liskay RM, Glazer PM. *Differing patterns of genetic instability in mice deficient in the mismatch repair genes Pms2, Mlh1, Msh2, Msh3 and Msh6*. **Carcinogenesis**. 2006;27(12):2402-8.
158. *pcDNA™3.1(+), pcDNA™3.1(-) - User manual*. [Internet] Invitrogen page: Invitrogen; 2010 [cited April, 30]; Available from: [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fpcdna3\\_1\\_man.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2Fpcdna3_1_man.pdf).
159. Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W. *A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus*. **Cell**. 1985;41(2):521-30.
160. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. *ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks*. **J Biol Chem**. 2001;276(45):42462-7.

161. Orhan E, Velazquez C, Tabet I, Sardet C, Theillet C. *Regulation of RAD51 at the Transcriptional and Functional Levels: What Prospects for Cancer Therapy?* **Cancers (Basel)**. 2021;13(12).
162. Ward IM, Chen J. *Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress.* **J Biol Chem**. 2001;276(51):47759-62.
163. Liu Y, Wu X, Feng Y, Jiang Q, Zhang S, Wang Q, et al. *Insights into the Oncogenic, Prognostic, and Immunological Role of BRIP1 in Pan-Cancer: A Comprehensive Data-Mining-Based Study.* **J Oncol**. 2023;2023:4104639.
164. Khan U, Khan MS. *Prognostic Value Estimation of BRIP1 in Breast Cancer by Exploiting Transcriptomics Data Through Bioinformatics Approaches.* **Bioinform Biol Insights**. 2021;15:11779322211055892.
165. Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, Gautier EL, Frankenberger M, Hoffmann R, et al. *Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets.* **Blood**. 2010;115(3):e10-9.
166. Pembroke WG, Hartl CL, Geschwind DH. *Evolutionary conservation and divergence of the human brain transcriptome.* **Genome Biol**. 2021;22(1):52.
167. Warnefors M, Kaessmann H. *Evolution of the correlation between expression divergence and protein divergence in mammals.* **Genome Biol Evol**. 2013;5(7):1324-35.
168. Reginato G, Cejka P. *The MRE11 complex: A versatile toolkit for the repair of broken DNA.* **DNA Repair (Amst)**. 2020;91-92:102869.
169. Cannavo E, Reginato G, Cejka P. *Stepwise 5' DNA end-specific resection of DNA breaks by the Mre11-Rad50-Xrs2 and Sae2 nuclease ensemble.* **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2019;116(12):5505-13.
170. Amunugama R, Fishel R. *Homologous recombination in eukaryotes.* **Prog Mol Biol Transl Sci**. 2012;110:155-206.
171. Motonari T, Yoshino Y, Haruta M, Endo S, Sasaki S, Miyashita M, et al. *Evaluating homologous recombination activity in tissues to predict the risk of hereditary breast and ovarian cancer and olaparib sensitivity.* **Sci Rep**. 2024;14(1):7519.
172. Wang M, Ran X, Leung W, Kawale A, Saxena S, Ouyang J, et al. *ATR inhibition induces synthetic lethality in mismatch repair-deficient cells and augments immunotherapy.* **Genes Dev**. 2023;37(19-20):929-43.
173. Warren JJ, Pohlhaus TJ, Changela A, Iyer RR, Modrich PL, Beese LS. *Structure of the human MutS $\alpha$  DNA lesion recognition complex.* **Mol Cell**. 2007;26(4):579-92.

174. Heinen CD, Juel Rasmussen L. *Determining the functional significance of mismatch repair gene missense variants using biochemical and cellular assays.* **Hered Cancer Clin Pract.** 2012;10(1):9.
175. Abildgaard AB, Nielsen SV, Bernstein I, Stein A, Lindorff-Larsen K, Hartmann-Petersen R. *Lynch syndrome, molecular mechanisms and variant classification.* **Br J Cancer.** 2023;128(5):726-34.
176. Mastrocola AS, Heinen CD. *Nuclear reorganization of DNA mismatch repair proteins in response to DNA damage.* **DNA Repair (Amst).** 2010;9(2):120-33.
177. Kohlmann W. *Lynch Syndrome and Breast Cancer Risk: Weighing the Data.* **JCO Precis Oncol.** 2020;4.
178. Chen W, Hampel H, Pearlman R, Jones D, Zhao W, Alsomali M, et al. *Unexpected expression of mismatch repair protein is more commonly seen with pathogenic missense than with other mutations in Lynch syndrome.* **Hum Pathol.** 2020;103:34-41.
179. *pcDNA™5/FRT/TO - Inducible expression vector designed for use with the Flp-In™ T-REx™ System.* [Internet] Invitrogen page: Invitrogen; 2010 [cited May 13]; Available from: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pcdna5ftrto\\_man.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pcdna5ftrto_man.pdf).
180. Sato K, Shimomuki M, Katsuki Y, Takahashi D, Kobayashi W, Ishiai M, et al. *FANCI-FANCD2 stabilizes the RAD51-DNA complex by binding RAD51 and protects the 5'-DNA end.* **Nucleic Acids Res.** 2016;44(22):10758-71.
181. Fierheller CT, Guitton-Sert L, Alenezi WM, Revil T, Oros KK, Gao Y, et al. *A functionally impaired missense variant identified in French Canadian families implicates FANCI as a candidate ovarian cancer-predisposing gene.* **Genome Med.** 2021;13(1):186.

**Anexo 1 – Painel de genes analisados nas análises de bioinformática – genes relacionados à carcinogênese, a síndromes hereditárias e reparo de danos ao DNA.**

<b>Genes associados ao câncer</b>									
<i>1433S</i>	<i>CADM3</i>	<i>CYP2C8</i>	<i>FANCL</i>	<i>IGH</i>	<i>MDC1</i>	<i>P53</i>	<i>RAD17</i>	<i>SH3R2</i>	<i>TNFAIP3</i>
<i>2AAB</i>	<i>CADM4</i>	<i>CYR61</i>	<i>FANCM</i>	<i>IGK</i>	<i>MDGA1</i>	<i>P73</i>	<i>RAD18</i>	<i>SHB</i>	<i>TNFRSF10B</i>
<i>A1BG</i>	<i>CAH9</i>	<i>CYSLTR2</i>	<i>FAZ</i>	<i>IGL</i>	<i>MDH2</i>	<i>P85A</i>	<i>RAD21</i>	<i>SHC1</i>	<i>TNFRSF14</i>
<i>A1CF</i>	<i>CALCA</i>	<i>CYTSB</i>	<i>FASLG</i>	<i>IKBB</i>	<i>MDM2</i>	<i>P85B</i>	<i>RAD23A</i>	<i>SHC2</i>	<i>TNFRSF17</i>
<i>AAPK1</i>	<i>CALR</i>	<i>DAB2</i>	<i>FAT1</i>	<i>IKBKB</i>	<i>MDM4</i>	<i>PA216</i>	<i>RAD23B</i>	<i>SHC3</i>	<i>TNFRSF8</i>
<i>ABCB1</i>	<i>CAMTA1</i>	<i>DAB2P</i>	<i>FAT3</i>	<i>IKZF1</i>	<i>MDS2</i>	<i>PA2G4</i>	<i>RAD50</i>	<i>SHCAF</i>	<i>TNIP2</i>
<i>ABCG2</i>	<i>CANT1</i>	<i>DACH1</i>	<i>FAT4</i>	<i>IL10</i>	<i>MECOM</i>	<i>PABPC1</i>	<i>RAD51</i>	<i>SHFM1</i>	<i>TNIP3</i>
<i>ABI1</i>	<i>CARD11</i>	<i>DACT1</i>	<i>FBLN1</i>	<i>IL15</i>	<i>MED1</i>	<i>PAF1</i>	<i>RAD51B</i>	<i>SHIP2</i>	<i>TNK1</i>
<i>ABI2</i>	<i>CARL3</i>	<i>DAPK2</i>	<i>FBLN2</i>	<i>IL18</i>	<i>MED10</i>	<i>PAF15</i>	<i>RAD51C</i>	<i>SHOC2</i>	<i>TNR17</i>
<i>ABL1</i>	<i>CARS</i>	<i>DAPK3</i>	<i>FBSP1</i>	<i>IL1B</i>	<i>MED12</i>	<i>PAFAH1B2</i>	<i>RAD51D</i>	<i>SHPRH</i>	<i>TNR1A</i>
<i>ABL2</i>	<i>CASC3</i>	<i>DAXX</i>	<i>FBW1A</i>	<i>IL2</i>	<i>MED28</i>	<i>PAK1</i>	<i>RAD52</i>	<i>SHSA5</i>	<i>TNR6A</i>
<i>ABLM3</i>	<i>CASC5</i>	<i>DCAF1</i>	<i>FBW1B</i>	<i>IL21R</i>	<i>MELK</i>	<i>PAK4</i>	<i>RAD54</i>	<i>SIAH1</i>	<i>TNR6B</i>
<i>ABRX1</i>	<i>CASL</i>	<i>DCAF12L2</i>	<i>FBX5</i>	<i>IL24</i>	<i>MEN1</i>	<i>PAK5</i>	<i>RAD54B</i>	<i>SIK1</i>	<i>TNR6C</i>
<i>ABTB1</i>	<i>CASP2</i>	<i>DCBD2</i>	<i>FBX7</i>	<i>IL3RB</i>	<i>MEP50</i>	<i>PAL4A</i>	<i>RAD54L</i>	<i>SIK3</i>	<i>TOB1</i>
<i>ACACA</i>	<i>CASP3</i>	<i>DCC</i>	<i>FBXL2</i>	<i>IL4RA</i>	<i>MERL</i>	<i>PALB2</i>	<i>RAD9A</i>	<i>SIR1</i>	<i>TOB2</i>
<i>ACBD4</i>	<i>CASP6</i>	<i>DCLRE1A</i>	<i>FBXO11</i>	<i>IL6</i>	<i>MERTK</i>	<i>PALLD</i>	<i>RAF1</i>	<i>SIR2</i>	<i>TOP1</i>
<i>ACD</i>	<i>CASP8</i>	<i>DCLRE1B</i>	<i>FBXW7</i>	<i>IL6ST</i>	<i>MET</i>	<i>PANO1</i>	<i>RAI3</i>	<i>SIR4</i>	<i>TOP3A</i>
<i>ACK1</i>	<i>CASP9</i>	<i>DCLRE1C</i>	<i>FCG2B</i>	<i>IL7R</i>	<i>MFHA1</i>	<i>PAR10</i>	<i>RALGDS</i>	<i>SIRPA</i>	<i>TOPB1</i>
<i>ACKR3</i>	<i>CASP10</i>	<i>DCNL1</i>	<i>FCGR2B</i>	<i>IL8</i>	<i>MFR1L</i>	<i>PAR6A</i>	<i>RANB9</i>	<i>SIVA</i>	<i>TOPBP1</i>
<i>ACL6A</i>	<i>CASPA</i>	<i>DCNL3</i>	<i>FCRL4</i>	<i>ILK</i>	<i>MGMT</i>	<i>PARK7</i>	<i>RANBP2</i>	<i>SIX1</i>	<i>TOPRS</i>
<i>ACPH</i>	<i>CASR</i>	<i>DCR1B</i>	<i>FCSD2</i>	<i>ILKAP</i>	<i>MGP</i>	<i>PARN</i>	<i>RAP1A</i>	<i>SIX2</i>	<i>TP4A2</i>
<i>ACS2B</i>	<i>CAV1</i>	<i>DCTN1</i>	<i>FEM1B</i>	<i>ING1</i>	<i>MIB2</i>	<i>PARP1</i>	<i>RAP1GDS1</i>	<i>SKI</i>	<i>TP53</i>
<i>ACSL3</i>	<i>CAVN3</i>	<i>DDB1</i>	<i>FEN1</i>	<i>ING2</i>	<i>MIEN1</i>	<i>PARP2</i>	<i>RAP2A</i>	<i>SKIL</i>	<i>TP53BP1</i>
<i>ACSL5</i>	<i>CBFA2T3</i>	<i>DDB2</i>	<i>FER</i>	<i>ING3</i>	<i>MINK1</i>	<i>PARP3</i>	<i>RAP2B</i>	<i>SLAP2</i>	<i>TP63</i>

<i>ACSL6</i>	<i>CBFB</i>	<i>DDIT3</i>	<i>FES</i>	<i>ING4</i>	<i>MINP1</i>	<i>PARP4</i>	<i>RARA</i>	<i>SLC25A11</i>	<i>TPCN2</i>
<i>ACTB</i>	<i>CBL</i>	<i>DDIT4</i>	<i>FEV</i>	<i>INSL3</i>	<i>MINY3</i>	<i>PATZ1</i>	<i>RARB</i>	<i>SLC34A2</i>	<i>TPD52</i>
<i>ACTN4</i>	<i>CBLB</i>	<i>DDR1</i>	<i>FGF1</i>	<i>INSM1</i>	<i>MITF</i>	<i>PAWR</i>	<i>RASA1</i>	<i>SLC45A3</i>	<i>TPD53</i>
<i>ACTZ</i>	<i>CBLC</i>	<i>DDR2</i>	<i>FGF10</i>	<i>INSR</i>	<i>MK01</i>	<i>PAX3</i>	<i>RASA2</i>	<i>SLIP</i>	<i>TPGS2</i>
<i>ACV1B</i>	<i>CBLL2</i>	<i>DDX10</i>	<i>FGF2</i>	<i>INT6</i>	<i>MK03</i>	<i>PAX5</i>	<i>RASAL1</i>	<i>SLX1A</i>	<i>TPM3</i>
<i>ACVL1</i>	<i>CBP</i>	<i>DDX17</i>	<i>FGF22</i>	<i>IPMK</i>	<i>MK06</i>	<i>PAX7</i>	<i>RASF1</i>	<i>SLX1B</i>	<i>TPM4</i>
<i>ACVR1</i>	<i>CBX8</i>	<i>DDX3X</i>	<i>FGF3</i>	<i>IRF1</i>	<i>MK07</i>	<i>PAX8</i>	<i>RASF2</i>	<i>SLX4</i>	<i>TPO</i>
<i>ACVR2A</i>	<i>CC85B</i>	<i>DDX41</i>	<i>FGF4</i>	<i>IRF3</i>	<i>MK09</i>	<i>PAXI</i>	<i>RASF3</i>	<i>SMAD2</i>	<i>TPOR</i>
<i>ADAM17</i>	<i>CCAR2</i>	<i>DDX42</i>	<i>FGF5</i>	<i>IRF4</i>	<i>MK15</i>	<i>PB1</i>	<i>RASF4</i>	<i>SMAD3</i>	<i>TPR</i>
<i>ADAP1</i>	<i>CCD26</i>	<i>DDX5</i>	<i>FGF6</i>	<i>IRF7</i>	<i>MKL1</i>	<i>PBIP1</i>	<i>RASF5</i>	<i>SMAD4</i>	<i>TR10B</i>
<i>AEN</i>	<i>CCD34</i>	<i>DDX6</i>	<i>FGF7</i>	<i>IRS1</i>	<i>MKL2</i>	<i>PBRM1</i>	<i>RASF6</i>	<i>SMAD5</i>	<i>TRA</i>
<i>AF10</i>	<i>CCDB1</i>	<i>DEC1</i>	<i>FGF8</i>	<i>IRS4</i>	<i>MKRN2</i>	<i>PBX1</i>	<i>RASFA</i>	<i>SMAD6</i>	<i>TRADD</i>
<i>AF17</i>	<i>CCDC6</i>	<i>DEDD</i>	<i>FGFP1</i>	<i>ISK1</i>	<i>MLF1</i>	<i>PBX2</i>	<i>RASH</i>	<i>SMAD7</i>	<i>TRAF1</i>
<i>AF1Q</i>	<i>CCL2</i>	<i>DEDD2</i>	<i>FGFR1</i>	<i>IST1</i>	<i>MLH1</i>	<i>PBX3</i>	<i>RASK</i>	<i>SMAGP</i>	<i>TRAF3</i>
<i>AF9</i>	<i>CCNB1</i>	<i>DEF1</i>	<i>FGFR1OP</i>	<i>ISX</i>	<i>MLH3</i>	<i>PC11Y</i>	<i>RASM</i>	<i>SMARCA4</i>	<i>TRAF5</i>
<i>AFAD</i>	<i>CCNB1IP1</i>	<i>DEK</i>	<i>FGFR2</i>	<i>ITA9</i>	<i>MLLT1</i>	<i>PCA3</i>	<i>RASN</i>	<i>SMARCAD1</i>	<i>TRAF6</i>
<i>AFF1</i>	<i>CCNC</i>	<i>DEMA</i>	<i>FGFR3</i>	<i>ITCH</i>	<i>MLLT10</i>	<i>PCBP1</i>	<i>RB</i>	<i>SMARCB1</i>	<i>TRAF7</i>
<i>AFF3</i>	<i>CCND1</i>	<i>DENR</i>	<i>FGFR4</i>	<i>ITGAV</i>	<i>MLLT11</i>	<i>PCD15</i>	<i>RB1</i>	<i>SMARCD1</i>	<i>TRB</i>
<i>AFF4</i>	<i>CCND2</i>	<i>DEP1A</i>	<i>FGOP2</i>	<i>ITK</i>	<i>MLLT3</i>	<i>PCLI1</i>	<i>RB11A</i>	<i>SMARCE1</i>	<i>TRD</i>
<i>AFP</i>	<i>CCND3</i>	<i>DFFB</i>	<i>FGR</i>	<i>ITPA</i>	<i>MLLT4</i>	<i>PCM1</i>	<i>RB6I2</i>	<i>SMC1A</i>	<i>TREX1</i>
<i>AGAP2</i>	<i>CCNE1</i>	<i>DGAT2</i>	<i>FH</i>	<i>IWS1</i>	<i>MLLT6</i>	<i>PCNA</i>	<i>RBBP6</i>	<i>SMC3</i>	<i>TREX2</i>
<i>AGR2</i>	<i>CCNE2</i>	<i>DGCR14</i>	<i>FHIT</i>	<i>JAG1</i>	<i>MLX</i>	<i>PCSK7</i>	<i>RBBP8</i>	<i>SMC5</i>	<i>TRG-GCC2</i>
<i>AGRA2</i>	<i>CCNG1</i>	<i>DGCR8</i>	<i>FHL2</i>	<i>JAK1</i>	<i>MME</i>	<i>PCX2</i>	<i>RBCC1</i>	<i>SMCA4</i>	<i>TRI13</i>
<i>AGRA3</i>	<i>CCNG2</i>	<i>DHB13</i>	<i>FIBP</i>	<i>JAK2</i>	<i>MMP1</i>	<i>PDCD1LG2</i>	<i>RBG1L</i>	<i>SMO</i>	<i>TRI22</i>
<i>AGRB1</i>	<i>CCNH</i>	<i>DHSD</i>	<i>FIP1L1</i>	<i>JAK3</i>	<i>MMP14</i>	<i>PDCD4</i>	<i>RBL1</i>	<i>SMUF2</i>	<i>TRI27</i>
<i>AGRF1</i>	<i>CCNL1</i>	<i>DI3L2</i>	<i>FKBP9</i>	<i>JAZF1</i>	<i>MMP2</i>	<i>PDE4DIP</i>	<i>RBL2</i>	<i>SMUG1</i>	<i>TRI33</i>
<i>AGRF2</i>	<i>CCNT2</i>	<i>DICER</i>	<i>FLCN</i>	<i>JIP4</i>	<i>MMP9</i>	<i>PDGFB</i>	<i>RBM10</i>	<i>SNAI1</i>	<i>TRI35</i>
<i>AGRL2</i>	<i>CCR4</i>	<i>DICER1</i>	<i>FLI1</i>	<i>JTB</i>	<i>MMRN2</i>	<i>PDGFC</i>	<i>RBM14</i>	<i>SNAI2</i>	<i>TRI36</i>

<i>AHRR</i>	<i>CCR7</i>	<i>DIRA3</i>	<i>FLNA</i>	<i>JUN</i>	<i>MMS19</i>	<i>PDGFD</i>	<i>RBM15</i>	<i>SND1</i>	<i>TRI37</i>
<i>AIFM2</i>	<i>CD19</i>	<i>DIS3L2</i>	<i>FLOT1</i>	<i>JUND</i>	<i>MN1</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>RBM5</i>	<i>SNF5</i>	<i>TRIB3</i>
<i>AIM2</i>	<i>CD70</i>	<i>DJC27</i>	<i>FLT1</i>	<i>JUPI2</i>	<i>MNAT1</i>	<i>PDGFRB</i>	<i>RBM6</i>	<i>SNIP1</i>	<i>TRIM24</i>
<i>AIP</i>	<i>CD209</i>	<i>DKC1</i>	<i>FLT3</i>	<i>KANK1</i>	<i>MNX1</i>	<i>PDLI5</i>	<i>RBMS1</i>	<i>SNTB1</i>	<i>TRIM27</i>
<i>AKAP9</i>	<i>CD274</i>	<i>DKK1</i>	<i>FLT3L</i>	<i>KAPO</i>	<i>MO4L1</i>	<i>PDPN</i>	<i>RBMX</i>	<i>SNW1</i>	<i>TRIM28</i>
<i>AKIP1</i>	<i>CD28</i>	<i>DKK2</i>	<i>FLT4</i>	<i>KAPCB</i>	<i>MO4L2</i>	<i>PDRG1</i>	<i>RBP56</i>	<i>SOCS1</i>	<i>TRIM33</i>
<i>AKP13</i>	<i>CD34</i>	<i>DKK3</i>	<i>FNBP1</i>	<i>KAT2A</i>	<i>MOB1A</i>	<i>PDZD4</i>	<i>RBTN1</i>	<i>SOS1</i>	<i>TRIM8</i>
<i>AKT1</i>	<i>CD38</i>	<i>DKK4</i>	<i>FNIP1</i>	<i>KAT2B</i>	<i>MOD5</i>	<i>PEA15</i>	<i>RBTN2</i>	<i>SOX2</i>	<i>TRIP11</i>
<i>AKT2</i>	<i>CD3Z</i>	<i>DLEC1</i>	<i>FNIP2</i>	<i>KAT5</i>	<i>MOS</i>	<i>PEBB</i>	<i>RBX1</i>	<i>SOX21</i>	<i>TRIP13</i>
<i>AKT3</i>	<i>CD40LG</i>	<i>DLG1</i>	<i>FOLH1</i>	<i>KAT6A</i>	<i>MOV10</i>	<i>PEG10</i>	<i>RBX2</i>	<i>SP1</i>	<i>TRRAP</i>
<i>ALB</i>	<i>CD44</i>	<i>DLG3</i>	<i>FOS</i>	<i>KAT6B</i>	<i>MP2K1</i>	<i>PER1</i>	<i>RDM1</i>	<i>SP100</i>	<i>TS101</i>
<i>ALDH2</i>	<i>CD5</i>	<i>DLGP5</i>	<i>FOSL1</i>	<i>KAT7</i>	<i>MP2K4</i>	<i>PERP</i>	<i>REC6</i>	<i>SPAG1</i>	<i>TSC1</i>
<i>ALEX</i>	<i>CD74</i>	<i>DLP1</i>	<i>FOSL2</i>	<i>KC1D</i>	<i>MP2K6</i>	<i>PFD3</i>	<i>RECK</i>	<i>SPECC1</i>	<i>TSC2</i>
<i>ALK</i>	<i>CD79A</i>	<i>DLST</i>	<i>FOXA1</i>	<i>KC1E</i>	<i>MP2K7</i>	<i>PGDH</i>	<i>RECQ4</i>	<i>SPEN</i>	<i>TSHR</i>
<i>ALKBH2</i>	<i>CD79B</i>	<i>DMAP1</i>	<i>FOXD1</i>	<i>KC1G2</i>	<i>MPG</i>	<i>PGFRA</i>	<i>RECQL</i>	<i>SPI1</i>	<i>TSN31</i>
<i>ALKBH3</i>	<i>CDC23</i>	<i>DMBT1</i>	<i>FOXO1</i>	<i>KCC4</i>	<i>MPIP2</i>	<i>PGFRB</i>	<i>RECQL4</i>	<i>SPN90</i>	<i>TSN6</i>
<i>ALPK1</i>	<i>CDC37</i>	<i>DMC1</i>	<i>FOXL2</i>	<i>KCD11</i>	<i>MPIP3</i>	<i>PGFRL</i>	<i>RECQL5</i>	<i>SPO11</i>	<i>TTC23</i>
<i>AMER1</i>	<i>CDC42</i>	<i>DMTF1</i>	<i>FOXO1</i>	<i>KCD21</i>	<i>MPL</i>	<i>PGM1</i>	<i>RED</i>	<i>SPOP</i>	<i>TTK</i>
<i>AMGO2</i>	<i>CDC73</i>	<i>DNAJB1</i>	<i>FOXO3</i>	<i>KCNA1</i>	<i>MPP3</i>	<i>PGR</i>	<i>REL</i>	<i>SPRTN</i>	<i>TTP</i>
<i>AN32A</i>	<i>CDCP1</i>	<i>DNAJC21</i>	<i>FOXO4</i>	<i>KCNJ5</i>	<i>MRE11</i>	<i>PGRP2</i>	<i>REPS2</i>	<i>SPT13</i>	<i>TUSC1</i>
<i>ANCHR</i>	<i>CDH1</i>	<i>DNM2</i>	<i>FOXP1</i>	<i>KCTD6</i>	<i>MRE11A</i>	<i>PHB</i>	<i>RET</i>	<i>SQSTM</i>	<i>TUSC2</i>
<i>ANDR</i>	<i>CDH10</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>FOXR1</i>	<i>KDM1A</i>	<i>MRGBP</i>	<i>PHF23</i>	<i>RETN</i>	<i>SRC</i>	<i>TX1B3</i>
<i>ANK1</i>	<i>CDH11</i>	<i>DNMT3B</i>	<i>FR1OP</i>	<i>KDM3B</i>	<i>MRVI1</i>	<i>PHF6</i>	<i>REV1L</i>	<i>SRC8</i>	<i>TXK</i>
<i>ANKRD26</i>	<i>CDH17</i>	<i>DNTT</i>	<i>FRAT1</i>	<i>KDM5A</i>	<i>MSD3</i>	<i>PHLA3</i>	<i>REV3L</i>	<i>SRGAP3</i>	<i>TXNIP</i>
<i>ANM3</i>	<i>CDH2</i>	<i>DOCK4</i>	<i>FRK</i>	<i>KDM5C</i>	<i>MSH2</i>	<i>PHLP1</i>	<i>RFC1</i>	<i>SRGP1</i>	<i>TYDP2</i>
<i>ANM6</i>	<i>CDH23</i>	<i>DOCK8</i>	<i>FRMD3</i>	<i>KDM6A</i>	<i>MSH3</i>	<i>PHLP2</i>	<i>RFC2</i>	<i>SRP54</i>	<i>TYK2</i>
<i>ANO1</i>	<i>CDK1</i>	<i>DP13A</i>	<i>FSCN1</i>	<i>KDR</i>	<i>MSH4</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>RFC3</i>	<i>SRP72</i>	<i>TYRO</i>
<i>ANS1A</i>	<i>CDK10</i>	<i>DPH1</i>	<i>FSTL3</i>	<i>KDSR</i>	<i>MSH5</i>	<i>PIAS1</i>	<i>RFC4</i>	<i>SRSF1</i>	<i>TYRO3</i>

<i>ANS1B</i>	<i>CDK12</i>	<i>DPM3</i>	<i>FUBP1</i>	<i>KEAP1</i>	<i>MSH6</i>	<i>PIAS2</i>	<i>RFC5</i>	<i>SRSF2</i>	<i>TYW4</i>
<i>ANXA5</i>	<i>CDK2</i>	<i>DPOD1</i>	<i>FUMH</i>	<i>KHDR1</i>	<i>MSI2</i>	<i>PIAS4</i>	<i>RFIP3</i>	<i>SRSF3</i>	<i>TTY1</i>
<i>APC</i>	<i>CDK20</i>	<i>DPOE1</i>	<i>FUND2</i>	<i>KI20B</i>	<i>MSMB</i>	<i>PICAL</i>	<i>RFWD3</i>	<i>SRY</i>	<i>TZAP</i>
<i>APC10</i>	<i>CDK4</i>	<i>DPOLQ</i>	<i>FURIN</i>	<i>KIAA1549</i>	<i>MSN</i>	<i>PICALM</i>	<i>RGCC</i>	<i>SS18</i>	<i>U2AF1</i>
<i>APCL</i>	<i>CDK6</i>	<i>DROSHA</i>	<i>FUS</i>	<i>KIAA1598</i>	<i>MSR1</i>	<i>PIDD1</i>	<i>RGDSR</i>	<i>SS18L1</i>	<i>U2QL1</i>
<i>APEX1</i>	<i>CDK7</i>	<i>DUS10</i>	<i>FYN</i>	<i>KIF1B</i>	<i>MSRE</i>	<i>PIGU</i>	<i>RGPD3</i>	<i>SSPN</i>	<i>UB2D2</i>
<i>APEX2</i>	<i>CDK9</i>	<i>DUS16</i>	<i>FZD1</i>	<i>KIF22</i>	<i>MTA1</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>RGRF1</i>	<i>SSX1</i>	<i>UB2R1</i>
<i>APITD1</i>	<i>CDKA1</i>	<i>DUS26</i>	<i>FZR1</i>	<i>KIF5B</i>	<i>MTA2</i>	<i>PIK3CB</i>	<i>RGS7</i>	<i>SSX2</i>	<i>UB2R2</i>
<i>APLF</i>	<i>CDKL1</i>	<i>DUS7</i>	<i>G3BP1</i>	<i>KILIN</i>	<i>MTA3</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>RHBDF2</i>	<i>SSX4</i>	<i>UB2V2</i>
<i>APOBEC3B</i>	<i>CDKL2</i>	<i>DUT</i>	<i>G6PC</i>	<i>KIME</i>	<i>MTAP</i>	<i>PIM1</i>	<i>RHDF2</i>	<i>SSXT</i>	<i>UBB</i>
<i>APTX</i>	<i>CDKN1A</i>	<i>DUX4L1</i>	<i>GA45G</i>	<i>KISS1</i>	<i>MTCP1</i>	<i>PIM2</i>	<i>RHG07</i>	<i>ST134</i>	<i>UBC</i>
<i>AR</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>E2F1</i>	<i>GADD45A</i>	<i>KIT</i>	<i>MTG16</i>	<i>PIM3</i>	<i>RHG20</i>	<i>ST14</i>	<i>UBC9</i>
<i>ARAF</i>	<i>CDKN1C</i>	<i>E2F2</i>	<i>GALNT12</i>	<i>KLF4</i>	<i>MTG8</i>	<i>PIMRE</i>	<i>RHG21</i>	<i>ST17A</i>	<i>UBD</i>
<i>ARF</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>E2F3</i>	<i>GAS7</i>	<i>KLF5</i>	<i>MTG8R</i>	<i>PIN1</i>	<i>RHG26</i>	<i>ST18</i>	<i>UBE2A</i>
<i>ARG39</i>	<i>CDKN2C</i>	<i>E2F6</i>	<i>GATA1</i>	<i>KLF6</i>	<i>MTND</i>	<i>PININ</i>	<i>RHG29</i>	<i>ST20</i>	<i>UBE2B</i>
<i>ARHG1</i>	<i>CDKN3</i>	<i>E2F7</i>	<i>GATA2</i>	<i>KLH20</i>	<i>MTOR</i>	<i>PINK1</i>	<i>RHG35</i>	<i>ST5</i>	<i>UBE2N</i>
<i>ARHG4</i>	<i>CDN1A</i>	<i>E2F8</i>	<i>GATA3</i>	<i>KLH22</i>	<i>MTSS1</i>	<i>PINX1</i>	<i>RHNO1</i>	<i>ST7</i>	<i>UBE2T</i>
<i>ARHG5</i>	<i>CDN1B</i>	<i>E41L3</i>	<i>GCNT3</i>	<i>KLH41</i>	<i>MTUS1</i>	<i>PIR</i>	<i>RHOA</i>	<i>ST7L</i>	<i>UBE2V1</i>
<i>ARHG8</i>	<i>CDN1C</i>	<i>E4F1</i>	<i>GCR</i>	<i>KLK10</i>	<i>MUC1</i>	<i>PIWL1</i>	<i>RHOB</i>	<i>STA13</i>	<i>UBE2V2</i>
<i>ARHGAP26</i>	<i>CDN2A</i>	<i>EBF1</i>	<i>GDNF</i>	<i>KLK2</i>	<i>MUC16</i>	<i>PIWL2</i>	<i>RHOG</i>	<i>STABP</i>	<i>UBE4B</i>
<i>ARHGAP5</i>	<i>CDN2B</i>	<i>ECT2</i>	<i>GDS1</i>	<i>KLK3</i>	<i>MUC4</i>	<i>PK3CA</i>	<i>RHOH</i>	<i>STAG1</i>	<i>UBIA1</i>
<i>ARHGC</i>	<i>CDN2C</i>	<i>ECT2L</i>	<i>GEN1</i>	<i>KLLN</i>	<i>MUL1</i>	<i>PK3CB</i>	<i>RHXF2</i>	<i>STAG2</i>	<i>UBIM</i>
<i>ARHGEF10</i>	<i>CDN2D</i>	<i>EDN3</i>	<i>GFI1</i>	<i>KMT2A</i>	<i>MUS81</i>	<i>PK3CD</i>	<i>RIF1</i>	<i>STAP2</i>	<i>UBP10</i>
<i>ARHGEF10L</i>	<i>CDON</i>	<i>EED</i>	<i>GFI1B</i>	<i>KMT2B</i>	<i>MUTYH</i>	<i>PKHG2</i>	<i>RIG</i>	<i>STAR8</i>	<i>UBP2</i>
<i>ARHGEF12</i>	<i>CDT1</i>	<i>EFL1</i>	<i>GGA1</i>	<i>KMT2C</i>	<i>MXI1</i>	<i>PKHG5</i>	<i>RINT1</i>	<i>STAT3</i>	<i>UBP28</i>
<i>ARHGI</i>	<i>CDX2</i>	<i>EFNA1</i>	<i>GIPC1</i>	<i>KMT2D</i>	<i>MXRA5</i>	<i>PKHO1</i>	<i>RIOX1</i>	<i>STAT5B</i>	<i>UBP32</i>
<i>ARHGQ</i>	<i>CE162</i>	<i>EFNA3</i>	<i>GIT1</i>	<i>KMT2E</i>	<i>MY18B</i>	<i>PLAG1</i>	<i>RIOX2</i>	<i>STAT6</i>	<i>UBP4</i>
<i>ARI3A</i>	<i>CEACAM5</i>	<i>EFNA4</i>	<i>GLI1</i>	<i>KMT5A</i>	<i>MYB</i>	<i>PLAK</i>	<i>RIPK1</i>	<i>STE3</i>	<i>UBP47</i>

<i>ARI3B</i>	<i>CEAM1</i>	<i>EFNB3</i>	<i>GLI2</i>	<i>KNL1</i>	<i>MYBA</i>	<i>PLAL1</i>	<i>RIT2</i>	<i>STEA4</i>	<i>UBP6</i>
<i>ARI4A</i>	<i>CEAM5</i>	<i>EFS</i>	<i>GLMN</i>	<i>KNSTRN</i>	<i>MYBB</i>	<i>PLCE1</i>	<i>RL10</i>	<i>STIL</i>	<i>UBR5</i>
<i>ARI5B</i>	<i>CEAM6</i>	<i>EGF</i>	<i>GLT12</i>	<i>KPCA</i>	<i>MYC</i>	<i>PLCG1</i>	<i>RL1D1</i>	<i>STK11</i>	<i>UBS3A</i>
<i>ARID1A</i>	<i>CEBPA</i>	<i>EGFR</i>	<i>GML</i>	<i>KPCD</i>	<i>MYCL</i>	<i>PLGF</i>	<i>RL40</i>	<i>STK25</i>	<i>UCHL1</i>
<i>ARID1B</i>	<i>CEBPG</i>	<i>EGLN1</i>	<i>GMPS</i>	<i>KPCD2</i>	<i>MYCN</i>	<i>PLK1</i>	<i>RL7A</i>	<i>STK26</i>	<i>UFL1</i>
<i>ARID2</i>	<i>CENPK</i>	<i>EGLN2</i>	<i>GNA11</i>	<i>KPCI</i>	<i>MYCP1</i>	<i>PLK2</i>	<i>RLF</i>	<i>STK3</i>	<i>UFO</i>
<i>ARK73</i>	<i>CENPU</i>	<i>EGR3</i>	<i>GNAQ</i>	<i>KPCL</i>	<i>MYD88</i>	<i>PLK3</i>	<i>RMI1</i>	<i>STK38</i>	<i>UHRF1</i>
<i>ARK74</i>	<i>CENPW</i>	<i>EHBP1</i>	<i>GNAS</i>	<i>KPYM</i>	<i>MYEOV</i>	<i>PLPL3</i>	<i>RMI2</i>	<i>STK39</i>	<i>UHRF2</i>
<i>ARMC5</i>	<i>CEP57</i>	<i>EHF</i>	<i>GNAS2</i>	<i>KRAS</i>	<i>MYH11</i>	<i>PLPP5</i>	<i>RMP</i>	<i>STK4</i>	<i>ULA1</i>
<i>ARNT</i>	<i>CEP89</i>	<i>EI24</i>	<i>GNL3L</i>	<i>KRIT1</i>	<i>MYH9</i>	<i>PLXB1</i>	<i>RN135</i>	<i>STRN</i>	<i>UNG</i>
<i>ASC</i>	<i>CETN2</i>	<i>EIF1AX</i>	<i>GO45</i>	<i>KRT19</i>	<i>MYO5A</i>	<i>PLXB2</i>	<i>RN139</i>	<i>STYK1</i>	<i>URFB1</i>
<i>ASCL1</i>	<i>CHAF1A</i>	<i>EIF3E</i>	<i>GOGA5</i>	<i>KRT7</i>	<i>MYOD1</i>	<i>PLXB3</i>	<i>RN149</i>	<i>SUFU</i>	<i>US6NL</i>
<i>ASF1A</i>	<i>CHAF1B</i>	<i>EIF4A2</i>	<i>GOLGA5</i>	<i>KS6A2</i>	<i>N4BP2</i>	<i>PML</i>	<i>RN167</i>	<i>SUMO1</i>	<i>USE1</i>
<i>ASPC1</i>	<i>CHCHD7</i>	<i>EKI2</i>	<i>GOPC</i>	<i>KS6A5</i>	<i>NAA15</i>	<i>PMS1</i>	<i>RN213</i>	<i>SUSD2</i>	<i>USP1</i>
<i>ASPP2</i>	<i>CHD1L</i>	<i>ELANE</i>	<i>GOT1B</i>	<i>KS6B1</i>	<i>NAB2</i>	<i>PMS2</i>	<i>RN5A</i>	<i>SUSD3</i>	<i>USP44</i>
<i>ASPSCR1</i>	<i>CHD2</i>	<i>ELF3</i>	<i>GP15L</i>	<i>KS6B2</i>	<i>NACA</i>	<i>PMS2L3</i>	<i>RNASEL</i>	<i>SUSD6</i>	<i>USP6</i>
<i>ASXL1</i>	<i>CHD4</i>	<i>ELF4</i>	<i>GP5</i>	<i>KSYK</i>	<i>NACC2</i>	<i>PNKP</i>	<i>RNF11</i>	<i>SUV91</i>	<i>USP8</i>
<i>ASXL2</i>	<i>CHD5</i>	<i>ELF5</i>	<i>GPAT3</i>	<i>KTN1</i>	<i>NADAP</i>	<i>PO3F2</i>	<i>RNF139</i>	<i>SUV92</i>	<i>UVSSA</i>
<i>ATAD2</i>	<i>CHDH</i>	<i>ELK1</i>	<i>GPC3</i>	<i>L2GL1</i>	<i>NANO1</i>	<i>PO4F1</i>	<i>RNF168</i>	<i>SUZ12</i>	<i>VATH</i>
<i>ATF1</i>	<i>CHEK1</i>	<i>ELK4</i>	<i>GPC5</i>	<i>LACTB</i>	<i>NANP8</i>	<i>PO4F2</i>	<i>RNF213</i>	<i>SYCC</i>	<i>VAV</i>
<i>ATF5</i>	<i>CHEK2</i>	<i>ELL</i>	<i>GPHN</i>	<i>LAP4B</i>	<i>NARR</i>	<i>POLA1</i>	<i>RNF34</i>	<i>SYCP3</i>	<i>VAV1</i>
<i>ATF7</i>	<i>CHFR</i>	<i>ELN</i>	<i>GPHRA</i>	<i>LAPTM5</i>	<i>NAT6</i>	<i>POLB</i>	<i>RNF4</i>	<i>SYK</i>	<i>VAV2</i>
<i>ATIC</i>	<i>CHGA</i>	<i>ELOC</i>	<i>GPKOW</i>	<i>LARP4B</i>	<i>NAV2</i>	<i>POLD1</i>	<i>RNF43</i>	<i>SYNP2</i>	<i>VAV3</i>
<i>ATM</i>	<i>CHIC2</i>	<i>EME1</i>	<i>GPS2</i>	<i>LASP1</i>	<i>NBAS</i>	<i>POLD2</i>	<i>RNF6</i>	<i>SYP</i>	<i>VEGFA</i>
<i>ATP1A1</i>	<i>CHK1</i>	<i>EME2</i>	<i>GRAP</i>	<i>LATS1</i>	<i>NBEA</i>	<i>POLD3</i>	<i>RNF8</i>	<i>SZRD1</i>	<i>VEGFC</i>
<i>ATP2B3</i>	<i>CHK2</i>	<i>EML4</i>	<i>GRB10</i>	<i>LATS2</i>	<i>NBL1</i>	<i>POLD4</i>	<i>RNT2</i>	<i>T184B</i>	<i>VGFR1</i>
<i>ATP4A</i>	<i>CHST11</i>	<i>EMP2</i>	<i>GRB2</i>	<i>LC7L3</i>	<i>NBN</i>	<i>POLE</i>	<i>RNZ2</i>	<i>T53I1</i>	<i>VGFR2</i>
<i>ATR</i>	<i>CHSTB</i>	<i>EN113</i>	<i>GRB7</i>	<i>LCK</i>	<i>NBPF3</i>	<i>POLE2</i>	<i>ROBO1</i>	<i>T53I2</i>	<i>VGFR3</i>

<i>ATRIP</i>	<i>CIB1</i>	<i>ENDOV</i>	<i>GREM1</i>	<i>LCP1</i>	<i>NBPFC</i>	<i>POLE3</i>	<i>ROBO2</i>	<i>TACC1</i>	<i>VHL</i>
<i>ATRX</i>	<i>CIC</i>	<i>ENG</i>	<i>GRHL2</i>	<i>LDAH</i>	<i>NCAM1</i>	<i>POLE4</i>	<i>RON</i>	<i>TACC2</i>	<i>VIME</i>
<i>ATXN3</i>	<i>CIITA</i>	<i>ENK18</i>	<i>GRIN2A</i>	<i>LDB1</i>	<i>NCKIPSD</i>	<i>POLG</i>	<i>ROR1</i>	<i>TACC3</i>	<i>VMA5A</i>
<i>AURKA</i>	<i>CIP1</i>	<i>ENK19</i>	<i>GRM3</i>	<i>LEF1</i>	<i>NCOA1</i>	<i>POLH</i>	<i>RORA</i>	<i>TAD2B</i>	<i>VMP1</i>
<i>AURKB</i>	<i>CIP2A</i>	<i>ENK21</i>	<i>GRP1</i>	<i>LEG1</i>	<i>NCOA2</i>	<i>POLI</i>	<i>ROS1</i>	<i>TAF12</i>	<i>VOPP1</i>
<i>AXIN1</i>	<i>CJ090</i>	<i>ENK24</i>	<i>GRWD1</i>	<i>LEG8</i>	<i>NCOA4</i>	<i>POLK</i>	<i>RPA1</i>	<i>TAF15</i>	<i>VRK1</i>
<i>AXIN2</i>	<i>CK095</i>	<i>ENK5</i>	<i>GSDMA</i>	<i>LEPROTL1</i>	<i>NCOR1</i>	<i>POLL</i>	<i>RPA2</i>	<i>TAF4</i>	<i>VTI1A</i>
<i>B2CL2</i>	<i>CKAP2</i>	<i>ENK6</i>	<i>GSDME</i>	<i>LEU1</i>	<i>NCOR2</i>	<i>POLM</i>	<i>RPA3</i>	<i>TAL1</i>	<i>VWA2</i>
<i>B2L10</i>	<i>CLD7</i>	<i>ENK7</i>	<i>GSTM1</i>	<i>LFG1</i>	<i>NDC80</i>	<i>POLN</i>	<i>RPA4</i>	<i>TAL2</i>	<i>WAS</i>
<i>B2LA1</i>	<i>CLIP1</i>	<i>ENK8</i>	<i>GSTP1</i>	<i>LGI1</i>	<i>NDE1</i>	<i>POLQ</i>	<i>RPB1</i>	<i>TAOK1</i>	<i>WBP1</i>
<i>B2M</i>	<i>CLK2</i>	<i>ENK9</i>	<i>GTF2H1</i>	<i>LGR6</i>	<i>NDEL1</i>	<i>POT1</i>	<i>RPL10</i>	<i>TAOK2</i>	<i>WDR11</i>
<i>BACH2</i>	<i>CLOCK</i>	<i>ENL</i>	<i>GTF2H2</i>	<i>LHFP</i>	<i>NDKA</i>	<i>POU2AF1</i>	<i>RPL22</i>	<i>TAOK3</i>	<i>WDR48</i>
<i>BAD</i>	<i>CLP1</i>	<i>ENO2</i>	<i>GTF2H3</i>	<i>LHX2</i>	<i>NDKB</i>	<i>POU5F1</i>	<i>RPL5</i>	<i>TARG1</i>	<i>WFDC2</i>
<i>BAG3</i>	<i>CLSPN</i>	<i>ENTP5</i>	<i>GTF2H4</i>	<i>LHX4</i>	<i>NDRG1</i>	<i>PP1A</i>	<i>RPN1</i>	<i>TAXB1</i>	<i>WHSC1</i>
<i>BAK</i>	<i>CLTC</i>	<i>EP300</i>	<i>GTF2H5</i>	<i>LIFR</i>	<i>NDRG2</i>	<i>PPARG</i>	<i>RRAS</i>	<i>TBC3A</i>	<i>WHSC1L1</i>
<i>BANP</i>	<i>CLTCL1</i>	<i>EPAS1</i>	<i>GUAA</i>	<i>LIG1</i>	<i>NDUAD</i>	<i>PPFIBP1</i>	<i>RRAS2</i>	<i>TBK1</i>	<i>WIF1</i>
<i>BAP1</i>	<i>CLUA1</i>	<i>EPC1</i>	<i>H2AFX</i>	<i>LIG3</i>	<i>NDUC2</i>	<i>PPIE</i>	<i>RRM2B</i>	<i>TBL1XR1</i>	<i>WIPF1</i>
<i>BARD1</i>	<i>CLUS</i>	<i>EPCAM</i>	<i>H3F3A</i>	<i>LIG4</i>	<i>NDUF4</i>	<i>PPM1D</i>	<i>RRP1B</i>	<i>TBP</i>	<i>WIPI1</i>
<i>BATF</i>	<i>CMC4</i>	<i>EPHA2</i>	<i>H3F3B</i>	<i>LIMA1</i>	<i>NEB2</i>	<i>PPP2R1A</i>	<i>RS27A</i>	<i>TBRG1</i>	<i>WIPI2</i>
<i>BATF2</i>	<i>CMTA1</i>	<i>EPHA3</i>	<i>HABP2</i>	<i>LIMD1</i>	<i>NEDD4</i>	<i>PPP2R3B</i>	<i>RS30</i>	<i>TBX3</i>	<i>WIPI3</i>
<i>BATF3</i>	<i>CNBD1</i>	<i>EPHA4</i>	<i>HASP</i>	<i>LIMK1</i>	<i>NEDD8</i>	<i>PPP6C</i>	<i>RSLAA</i>	<i>TCAL7</i>	<i>WIPI4</i>
<i>BAX</i>	<i>CNBP</i>	<i>EPHA5</i>	<i>HBA1</i>	<i>LIN7A</i>	<i>NEIL1</i>	<i>PPR18</i>	<i>RSPO1</i>	<i>TCAM1</i>	<i>WISP1</i>
<i>BAZ1A</i>	<i>CNOT3</i>	<i>EPHA7</i>	<i>HCK</i>	<i>LIN9</i>	<i>NEIL2</i>	<i>PRAF3</i>	<i>RSPO2</i>	<i>TCAM2</i>	<i>WN10B</i>
<i>BC11A</i>	<i>CNTNAP2</i>	<i>EPHA8</i>	<i>HCLS1</i>	<i>LITAF</i>	<i>NEIL3</i>	<i>PRAM</i>	<i>RSPO3</i>	<i>TCEA1</i>	<i>WNK1</i>
<i>BC11B</i>	<i>CNTRL</i>	<i>EPHB2</i>	<i>HDAC1</i>	<i>LMBL1</i>	<i>NEK2</i>	<i>PRC1</i>	<i>RSSA</i>	<i>TCF12</i>	<i>WNK2</i>
<i>BCAR1</i>	<i>COL1A1</i>	<i>EPHB3</i>	<i>HDAC2</i>	<i>LMF1</i>	<i>NEK3</i>	<i>PRCC</i>	<i>RT11</i>	<i>TCF3</i>	<i>WNK3</i>
<i>BCAS3</i>	<i>COL2A1</i>	<i>EPHB6</i>	<i>HDGR2</i>	<i>LMNA</i>	<i>NEK4</i>	<i>PRDM1</i>	<i>RTEL1</i>	<i>TCF7L2</i>	<i>WNK4</i>
<i>BCAS4</i>	<i>COL3A1</i>	<i>EPN1</i>	<i>HEAT6</i>	<i>LMO1</i>	<i>NEMF</i>	<i>PRDM16</i>	<i>RTKN</i>	<i>TCHP</i>	<i>WNT1</i>

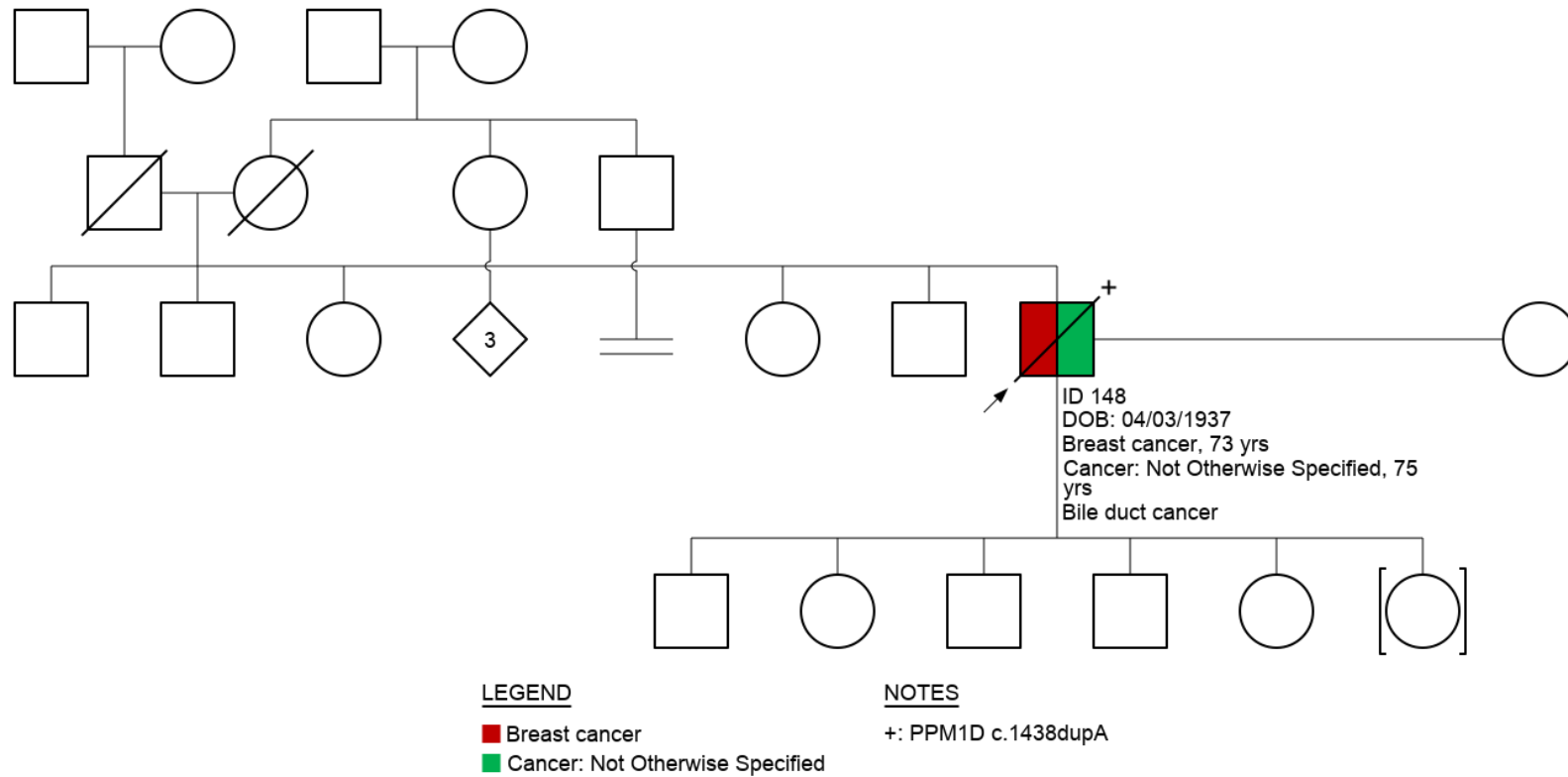
<i>BCCIP</i>	<i>COMD1</i>	<i>EPS15</i>	<i>HELQ</i>	<i>LMO2</i>	<i>NEMO</i>	<i>PRDM2</i>	<i>RTN4</i>	<i>TCL1A</i>	<i>WNT10A</i>
<i>BCL10</i>	<i>COP1</i>	<i>EPS8</i>	<i>HEMK1</i>	<i>LOX12</i>	<i>NENF</i>	<i>PRDM5</i>	<i>RUBCL</i>	<i>TCL1B</i>	<i>WNT2B</i>
<i>BCL11A</i>	<i>COX1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>HERC1</i>	<i>LPP</i>	<i>NEO1</i>	<i>PRDX6</i>	<i>RUFY3</i>	<i>TCP1L</i>	<i>WNT3</i>
<i>BCL11B</i>	<i>COX6C</i>	<i>ERBB3</i>	<i>HERPUD1</i>	<i>LRIG3</i>	<i>NEUL1</i>	<i>PREX2</i>	<i>RUNDC2A</i>	<i>TCTA</i>	<i>WNT4</i>
<i>BCL2</i>	<i>CPEB3</i>	<i>ERBB4</i>	<i>HEXB</i>	<i>LRP12</i>	<i>NF1</i>	<i>PRF1</i>	<i>RUNX1</i>	<i>TDG</i>	<i>WNT5A</i>
<i>BCL2L1</i>	<i>CPEB4</i>	<i>ERC1</i>	<i>HEXI1</i>	<i>LRP1B</i>	<i>NF2</i>	<i>PRKACA</i>	<i>RUNX1T1</i>	<i>TDP1</i>	<i>WNT6</i>
<i>BCL2L12</i>	<i>CPNE1</i>	<i>ERCC1</i>	<i>HEXI2</i>	<i>LRRN2</i>	<i>NFAT5</i>	<i>PRKAR1A</i>	<i>RUNX2</i>	<i>TDP2</i>	<i>WRAP53</i>
<i>BCL3</i>	<i>CPNE3</i>	<i>ERCC2</i>	<i>HEY1</i>	<i>LSM14A</i>	<i>NFATC2</i>	<i>PRKCB</i>	<i>RUNX3</i>	<i>TEC</i>	<i>WRN</i>
<i>BCL6</i>	<i>CQO80</i>	<i>ERCC3</i>	<i>HGF</i>	<i>LSM7</i>	<i>NFE2L2</i>	<i>PRKDC</i>	<i>RUVB1</i>	<i>TEF</i>	<i>WT1</i>
<i>BCL6B</i>	<i>CR032</i>	<i>ERCC4</i>	<i>HIC1</i>	<i>LTK</i>	<i>NFIB</i>	<i>PRKN</i>	<i>RUVB2</i>	<i>TEFF1</i>	<i>WVVOX</i>
<i>BCL7A</i>	<i>CR3L2</i>	<i>ERCC5</i>	<i>HIC2</i>	<i>LTMD1</i>	<i>NFIP1</i>	<i>PRKX</i>	<i>RUXG</i>	<i>TENS4</i>	<i>WWP1</i>
<i>BCL9</i>	<i>CR3L3</i>	<i>ERCC6</i>	<i>HIF1A</i>	<i>LUR1L</i>	<i>NFIP2</i>	<i>PROM1</i>	<i>RXFP2</i>	<i>TERC</i>	<i>WWTR1</i>
<i>BCL9L</i>	<i>CRADD</i>	<i>ERCC6L</i>	<i>HIF3A</i>	<i>LUZP4</i>	<i>NFKB1</i>	<i>PRPF19</i>	<i>RYK</i>	<i>TERF2IP</i>	<i>XAB2</i>
<i>BCLAF1</i>	<i>CRBL2</i>	<i>ERCC6L2</i>	<i>HIP1</i>	<i>LYL1</i>	<i>NFKB2</i>	<i>PRPF40B</i>	<i>S100A7</i>	<i>TERT</i>	<i>XAF1</i>
<i>BCOR</i>	<i>CRCM</i>	<i>ERCC8</i>	<i>HIPK2</i>	<i>LYN</i>	<i>NFKBIE</i>	<i>PRR14</i>	<i>S10A2</i>	<i>TES</i>	<i>XBP1</i>
<i>BCORL1</i>	<i>CREB1</i>	<i>ERD21</i>	<i>HIST1H3B</i>	<i>LYOX</i>	<i>NGAL</i>	<i>PRR5</i>	<i>S22AA</i>	<i>TET1</i>	<i>XIAP</i>
<i>BCR</i>	<i>CREB3L1</i>	<i>EREG</i>	<i>HIST1H4I</i>	<i>LZTR1</i>	<i>NGF</i>	<i>PRRX1</i>	<i>S22AI</i>	<i>TET2</i>	<i>XPA</i>
<i>BDNF</i>	<i>CREB3L2</i>	<i>ERF</i>	<i>HLA-A</i>	<i>LZTS1</i>	<i>NHEJ1</i>	<i>PRUN1</i>	<i>S2533</i>	<i>TEX10</i>	<i>XPC</i>
<i>BECN1</i>	<i>CREB5</i>	<i>ERG</i>	<i>HLF</i>	<i>LZTS2</i>	<i>NHP2</i>	<i>PRUN2</i>	<i>S2547</i>	<i>TEX15</i>	<i>XPF</i>
<i>BIK</i>	<i>CREBBP</i>	<i>ERRFI</i>	<i>HLTF</i>	<i>M3K1</i>	<i>NIN</i>	<i>PSA5</i>	<i>S35B2</i>	<i>TF2H1</i>	<i>XPO1</i>
<i>BIN1</i>	<i>CREG1</i>	<i>ESCO2</i>	<i>HMGA1</i>	<i>M3K10</i>	<i>NINL</i>	<i>PSCA</i>	<i>S38A3</i>	<i>TF65</i>	<i>XRCC1</i>
<i>BIRC3</i>	<i>CRK</i>	<i>ESR1</i>	<i>HMGA2</i>	<i>M3K11</i>	<i>NKX21</i>	<i>PSD10</i>	<i>SALL4</i>	<i>TF7L2</i>	<i>XRCC2</i>
<i>BIRC6</i>	<i>CRKL</i>	<i>ESR2</i>	<i>HMGB1</i>	<i>M3K14</i>	<i>NKX2-1</i>	<i>PSIP1</i>	<i>SAMD9</i>	<i>TFDP1</i>	<i>XRCC3</i>
<i>BLCAP</i>	<i>CRLF2</i>	<i>ESX1</i>	<i>HMGB2</i>	<i>M3K2</i>	<i>NKX31</i>	<i>PSMC3IP</i>	<i>SAMD9L</i>	<i>TFDP2</i>	<i>XRCC4</i>
<i>BLK</i>	<i>CRNKL1</i>	<i>ETNK1</i>	<i>HMG2P46</i>	<i>M3K5</i>	<i>NKX3-1</i>	<i>PSMD6</i>	<i>SAMN1</i>	<i>TFDP3</i>	<i>XRCC5</i>
<i>BLM</i>	<i>CRPAK</i>	<i>ETS1</i>	<i>HNF1A</i>	<i>M3K7</i>	<i>NLS1</i>	<i>PTC1</i>	<i>SAPC2</i>	<i>TFE2</i>	<i>XRCC6</i>
<i>BLNK</i>	<i>CRTC1</i>	<i>ETS2</i>	<i>HNF1B</i>	<i>M3K8</i>	<i>NME1</i>	<i>PTC2</i>	<i>SASH1</i>	<i>TFE3</i>	<i>XRN1</i>
<i>BMI1</i>	<i>CRTC3</i>	<i>ETV1</i>	<i>HNRNPA2B1</i>	<i>M4K5</i>	<i>NMI</i>	<i>PTCH1</i>	<i>SAV1</i>	<i>TFEB</i>	<i>YAF2</i>

<i>BMP5</i>	<i>CRY1</i>	<i>ETV3</i>	<i>HOOK3</i>	<i>MAD2L2</i>	<i>NOL11</i>	<i>PTCH2</i>	<i>SBDS</i>	<i>TFG</i>	<i>YAP1</i>
<i>BMPR1A</i>	<i>CSDE1</i>	<i>ETV4</i>	<i>HOP</i>	<i>MADD</i>	<i>NOL7</i>	<i>PTEN</i>	<i>SC23B</i>	<i>TFIP8</i>	<i>YBOX1</i>
<i>BMR1A</i>	<i>CSF1R</i>	<i>ETV5</i>	<i>HOT</i>	<i>MAEA</i>	<i>NONO</i>	<i>PTGS2</i>	<i>SC31A</i>	<i>TFPT</i>	<i>YES</i>
<i>BMR1B</i>	<i>CSF2</i>	<i>ETV6</i>	<i>HOXA11</i>	<i>MAF</i>	<i>NOP10</i>	<i>PTHB1</i>	<i>SC5A8</i>	<i>TFRC</i>	<i>YETS4</i>
<i>BMX</i>	<i>CSF3</i>	<i>ETV7</i>	<i>HOXA13</i>	<i>MAFA</i>	<i>NOP53</i>	<i>PTK6</i>	<i>SCRIB</i>	<i>TG</i>	<i>YWHAE</i>
<i>BOREA</i>	<i>CSF3R</i>	<i>EVI2A</i>	<i>HOXA9</i>	<i>MAFB</i>	<i>NOTC4</i>	<i>PTK7</i>	<i>SCUB3</i>	<i>TGFA</i>	<i>YYAP1</i>
<i>BPGM</i>	<i>CSK</i>	<i>EVI2B</i>	<i>HOXB13</i>	<i>MAFF</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>PTN13</i>	<i>SDC1</i>	<i>TGFB1</i>	<i>ZBT16</i>
<i>BRAF</i>	<i>CSK21</i>	<i>EVI5</i>	<i>HOXC11</i>	<i>MAFG</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>PTN14</i>	<i>SDC4</i>	<i>TGFR2</i>	<i>ZBT17</i>
<i>BRCA1</i>	<i>CSK22</i>	<i>EWS</i>	<i>HOXC13</i>	<i>MAFK</i>	<i>NOV</i>	<i>PTN18</i>	<i>SDCB1</i>	<i>TGFR1</i>	<i>ZBT7A</i>
<i>BRCA2</i>	<i>CSK23</i>	<i>EWSR1</i>	<i>HOXD11</i>	<i>MAGI1</i>	<i>NPAT</i>	<i>PTN7</i>	<i>SDCG3</i>	<i>TGFR2</i>	<i>ZBT7C</i>
<i>BRCC3</i>	<i>CSMD3</i>	<i>EXO1</i>	<i>HOXD13</i>	<i>MAGI3</i>	<i>NPM</i>	<i>PTOV1</i>	<i>SDHA</i>	<i>THA</i>	<i>ZBTB16</i>
<i>BRD1</i>	<i>CSN3</i>	<i>EXT1</i>	<i>HPGDS</i>	<i>MAGT1</i>	<i>NPM1</i>	<i>PTPN11</i>	<i>SDHAF2</i>	<i>THADA</i>	<i>ZBTB4</i>
<i>BRD3</i>	<i>CSN5</i>	<i>EXT2</i>	<i>HRAS</i>	<i>MAK</i>	<i>NPRL2</i>	<i>PTPN12</i>	<i>SDHB</i>	<i>THAP1</i>	<i>ZC12D</i>
<i>BRD4</i>	<i>CSN6</i>	<i>EYA2</i>	<i>HS90B</i>	<i>MALAT1</i>	<i>NR4A3</i>	<i>PTPN13</i>	<i>SDHC</i>	<i>THB</i>	<i>ZCCHC8</i>
<i>BRD7</i>	<i>CSPP1</i>	<i>EZH2</i>	<i>HSP90AA1</i>	<i>MALT1</i>	<i>NRAS</i>	<i>PTPN6</i>	<i>SDHD</i>	<i>THEM4</i>	<i>ZDH13</i>
<i>BRD8</i>	<i>CSRN1</i>	<i>EZR</i>	<i>HSP90AB1</i>	<i>MAML2</i>	<i>NRG1</i>	<i>PTPRB</i>	<i>SE6L1</i>	<i>THOC1</i>	<i>ZDH17</i>
<i>BRI3B</i>	<i>CTBP1</i>	<i>F107A</i>	<i>HTAI2</i>	<i>MANF</i>	<i>NS1BP</i>	<i>PTPRC</i>	<i>SEC23B</i>	<i>THRAP3</i>	<i>ZEB1</i>
<i>BRIP1</i>	<i>CTC1</i>	<i>F10A5</i>	<i>HTATIP2</i>	<i>MAP12</i>	<i>NSA2</i>	<i>PTPRD</i>	<i>SEM3B</i>	<i>THSD1</i>	<i>ZFHX3</i>
<i>BRMS1</i>	<i>CTCF</i>	<i>F120A</i>	<i>HUS1</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>NSD1</i>	<i>PTPRE</i>	<i>SEM3F</i>	<i>TIAM1</i>	<i>ZGPAT</i>
<i>BRNP1</i>	<i>CTDS2</i>	<i>F189B</i>	<i>HUTI</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>NSD2</i>	<i>PTPRH</i>	<i>SEM5A</i>	<i>TIE2</i>	<i>ZKSC3</i>
<i>BTBD12</i>	<i>CTDSL</i>	<i>F210B</i>	<i>HUTU</i>	<i>MAP2K4</i>	<i>NSD3</i>	<i>PTPRJ</i>	<i>SENP1</i>	<i>TIF1A</i>	<i>ZMAT3</i>
<i>BTC</i>	<i>CTIP</i>	<i>FA32A</i>	<i>HXA9</i>	<i>MAP2K7</i>	<i>NT5C2</i>	<i>PTPRK</i>	<i>SENP6</i>	<i>TIFA</i>	<i>ZMY10</i>
<i>BTG1</i>	<i>CTLA4</i>	<i>FA58B</i>	<i>HXB13</i>	<i>MAP3K1</i>	<i>NTHL1</i>	<i>PTPRN</i>	<i>SEPT5</i>	<i>TINF2</i>	<i>ZMY11</i>
<i>BTG2</i>	<i>CTNB1</i>	<i>FA72A</i>	<i>HYAL1</i>	<i>MAP3K13</i>	<i>NTRK1</i>	<i>PTPRO</i>	<i>SEPT6</i>	<i>TIPRL</i>	<i>ZMYM3</i>
<i>BTG3</i>	<i>CTND1</i>	<i>FA83A</i>	<i>HYAL3</i>	<i>MAPK1</i>	<i>NTRK3</i>	<i>PTPRT</i>	<i>SEPT9</i>	<i>TISB</i>	<i>ZN185</i>
<i>BTK</i>	<i>CTNNA1</i>	<i>FA83B</i>	<i>I17RB</i>	<i>MAPK3</i>	<i>NU214</i>	<i>PTPRU</i>	<i>SERPINA1</i>	<i>TISD</i>	<i>ZN217</i>
<i>BUB1B</i>	<i>CTNNA2</i>	<i>FA83D</i>	<i>IASPP</i>	<i>MAPK5</i>	<i>NUAK1</i>	<i>PTTG1</i>	<i>SESN1</i>	<i>TLK1</i>	<i>ZN320</i>
<i>C15orf65</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>FABP7</i>	<i>ID1</i>	<i>MAPK8</i>	<i>NUDT1</i>	<i>PTTG2</i>	<i>SESN2</i>	<i>TLK2</i>	<i>ZN350</i>

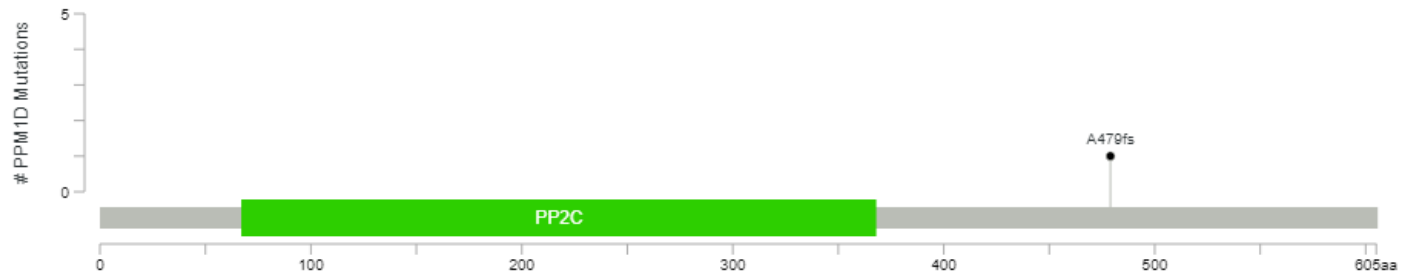
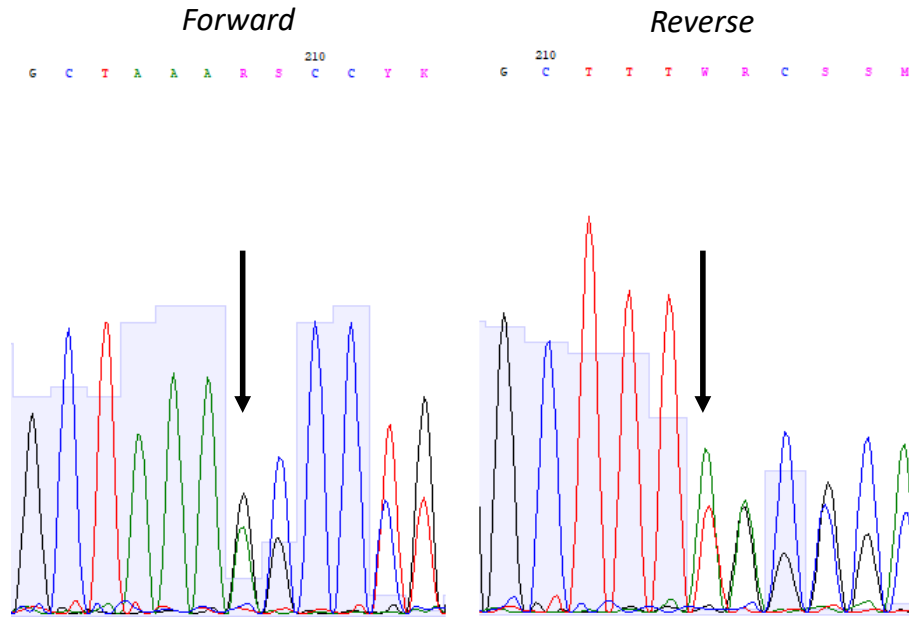
<i>C17orf70</i>	<i>CTNND1</i>	<i>FACD2</i>	<i>ID3</i>	<i>MAPK8IP1</i>	<i>NUMA1</i>	<i>PTTG3</i>	<i>SET</i>	<i>TLX1</i>	<i>ZN365</i>
<i>C19orf40</i>	<i>CTNND2</i>	<i>FADD</i>	<i>IDH1</i>	<i>MAPK8IP2</i>	<i>NUP214</i>	<i>PUM1</i>	<i>SETBP</i>	<i>TLX3</i>	<i>ZN513</i>
<i>C1orf86</i>	<i>CTR9</i>	<i>FAK1</i>	<i>IDH2</i>	<i>MARE1</i>	<i>NUP98</i>	<i>PUM2</i>	<i>SETBP1</i>	<i>TM101</i>	<i>ZN521</i>
<i>C1QBP</i>	<i>CUL1</i>	<i>FAM131B</i>	<i>IER2</i>	<i>MARE3</i>	<i>NUTM1</i>	<i>PWWP2A</i>	<i>SETD1B</i>	<i>TM102</i>	<i>ZN655</i>
<i>C1TC</i>	<i>CUL2</i>	<i>FAM135B</i>	<i>IF16</i>	<i>MAS</i>	<i>NUTM2A</i>	<i>PXMP4</i>	<i>SETD2</i>	<i>TM115</i>	<i>ZN703</i>
<i>C2D1A</i>	<i>CUL3</i>	<i>FAM175A</i>	<i>IF2B3</i>	<i>MATK</i>	<i>NUTM2B</i>	<i>QKI</i>	<i>SETMAR</i>	<i>TM127</i>	<i>ZNF198</i>
<i>C2orf44</i>	<i>CUL4A</i>	<i>FAM3C</i>	<i>IF4E</i>	<i>MATR3</i>	<i>NYNRIN</i>	<i>R144B</i>	<i>SETMR</i>	<i>TM158</i>	<i>ZNF278</i>
<i>C56D2</i>	<i>CUL4B</i>	<i>FAM46C</i>	<i>IF5A2</i>	<i>MAVS</i>	<i>OBF1</i>	<i>RA51C</i>	<i>SF3B1</i>	<i>TM9S4</i>	<i>ZNF331</i>
<i>C7orf11</i>	<i>CUL5</i>	<i>FAM47C</i>	<i>IFFO1</i>	<i>MAX</i>	<i>OBFC2B</i>	<i>RA51D</i>	<i>SFPQ</i>	<i>TMC6</i>	<i>ZNF384</i>
<i>CA052</i>	<i>CUL7</i>	<i>FAN1</i>	<i>IFIX</i>	<i>MB21D2</i>	<i>OBSCN</i>	<i>RA54B</i>	<i>SFRP4</i>	<i>TMC8</i>	<i>ZNF429</i>
<i>CA053</i>	<i>CUX1</i>	<i>FANCA</i>	<i>IFM1</i>	<i>MBD4</i>	<i>OGG1</i>	<i>RAB11B</i>	<i>SG2A2</i>	<i>TMED4</i>	<i>ZNF479</i>
<i>CA2D2</i>	<i>CUZD1</i>	<i>FANCB</i>	<i>IFM3</i>	<i>MBP</i>	<i>OGR1</i>	<i>RAB26</i>	<i>SGK1</i>	<i>TMED8</i>	<i>ZNF521</i>
<i>CA2D3</i>	<i>CXCL12</i>	<i>FANCC</i>	<i>IFNA1</i>	<i>MC1R</i>	<i>OLIG2</i>	<i>RAB5A</i>	<i>SH21B</i>	<i>TMEM127</i>	<i>ZNF687</i>
<i>CABLES1</i>	<i>CXCR4</i>	<i>FANCD2</i>	<i>IFNG</i>	<i>MCF2</i>	<i>OMD</i>	<i>RAB7A</i>	<i>SH2B1</i>	<i>TMF1</i>	<i>ZNRF3</i>
<i>CACNA1D</i>	<i>CXXC5</i>	<i>FANCE</i>	<i>IFRD2</i>	<i>MCF2L</i>	<i>OPCM</i>	<i>RAB8A</i>	<i>SH2B2</i>	<i>TMPRSS2</i>	<i>ZRSR2</i>
<i>CADH1</i>	<i>CYCS</i>	<i>FANCF</i>	<i>IGF1</i>	<i>MCL1</i>	<i>OS9</i>	<i>RABEP1</i>	<i>SH2B3</i>	<i>TNAP3</i>	<i>ZSC32</i>
<i>CADH2</i>	<i>CYLD</i>	<i>FANCG</i>	<i>IGF1R</i>	<i>MCM4</i>	<i>OTU7B</i>	<i>RAC1</i>	<i>SH2D1A</i>	<i>TNC</i>	<i>ZW10</i>
<i>CADH3</i>	<i>CYP19A1</i>	<i>FANCI</i>	<i>IGF2</i>	<i>MCTS1</i>	<i>P2RY8</i>	<i>RACK1</i>	<i>SH3G1</i>	<i>TNF</i>	<i>ZWINT</i>
<i>CADM1</i>	<i>CYP1A1</i>	<i>FANCI</i>	<i>IGF2BP2</i>	<i>MD1L1</i>	<i>P3H1</i>	<i>RAD1</i>	<i>SH3GL1</i>	<i>TNF15</i>	<i>ZZEF1</i>

**Anexo 2 – Heredogramas dos pacientes com variantes provavelmente patogênicas e patogênicas, eletroferograma com o sequenciamento para confirmação da variante e representação da localização proteica**

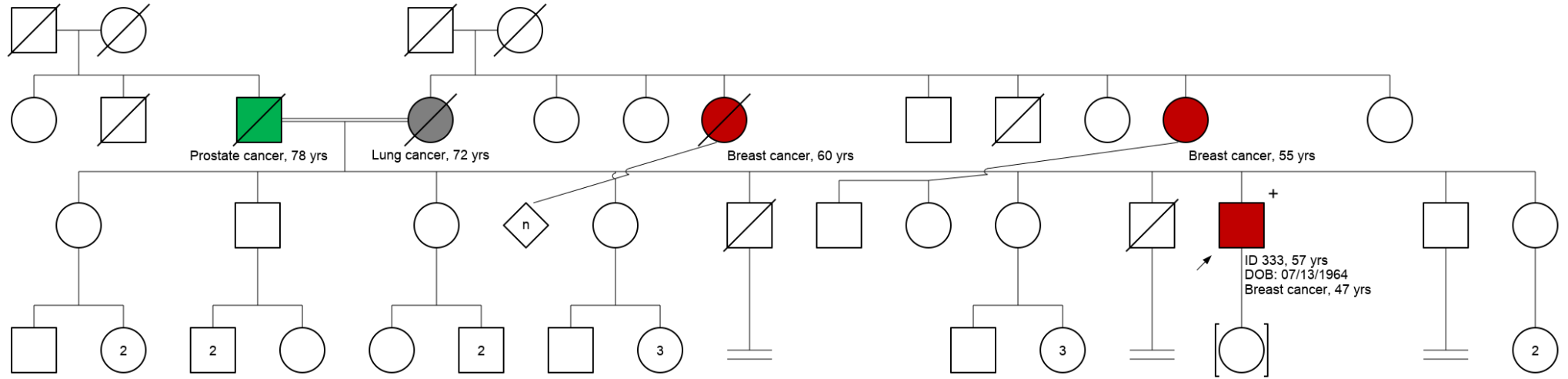
**Anexo 2A – ID 148**



**PPM1D c.1438dupA (p.Ala479fs)**



Anexo 2B – ID 333



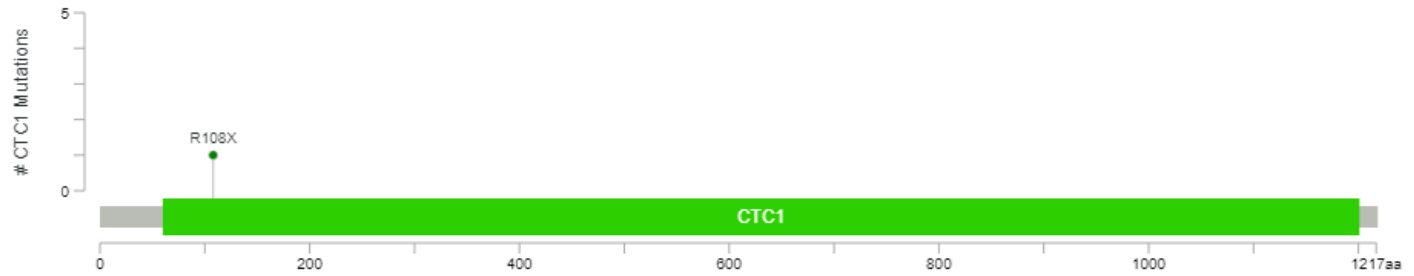
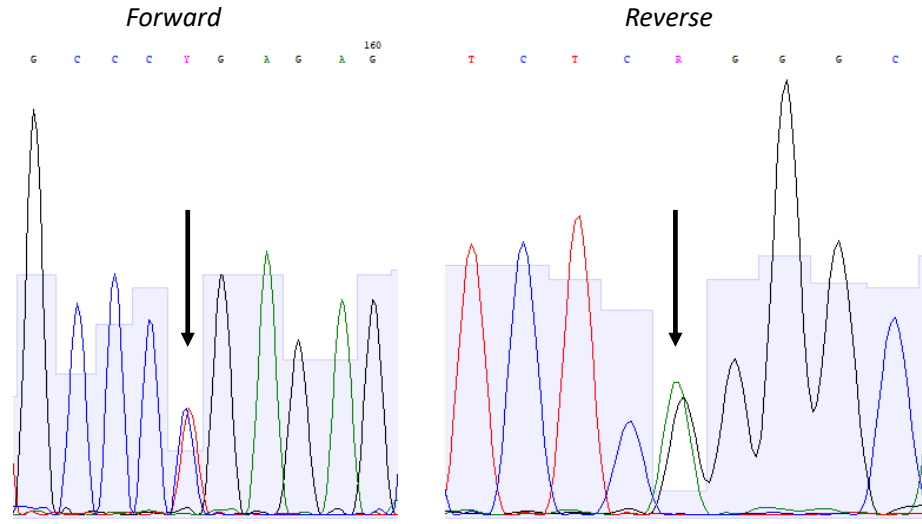
**LEGEND**

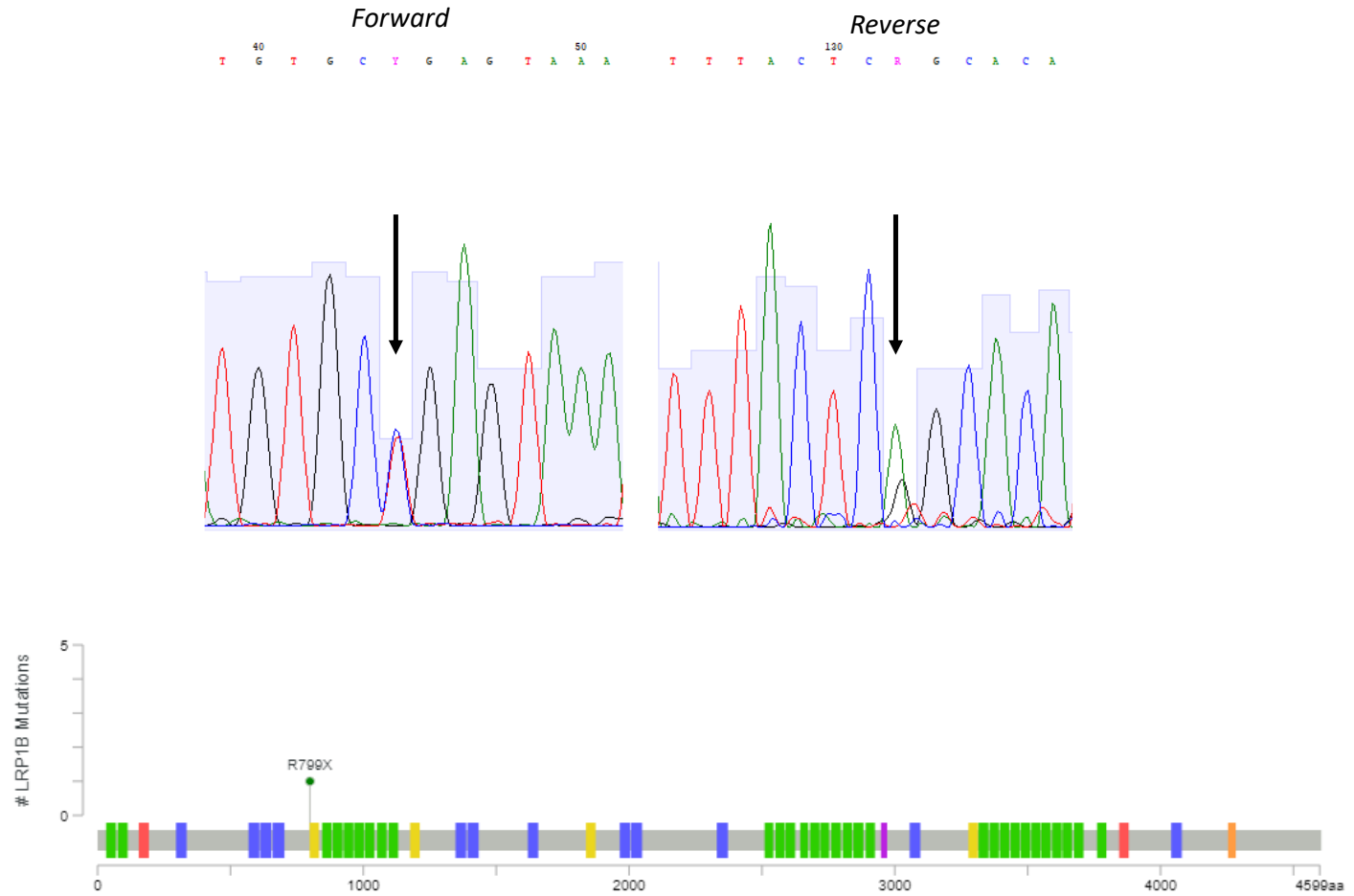
- Breast cancer
- Prostate cancer
- Lung cancer

**NOTES**

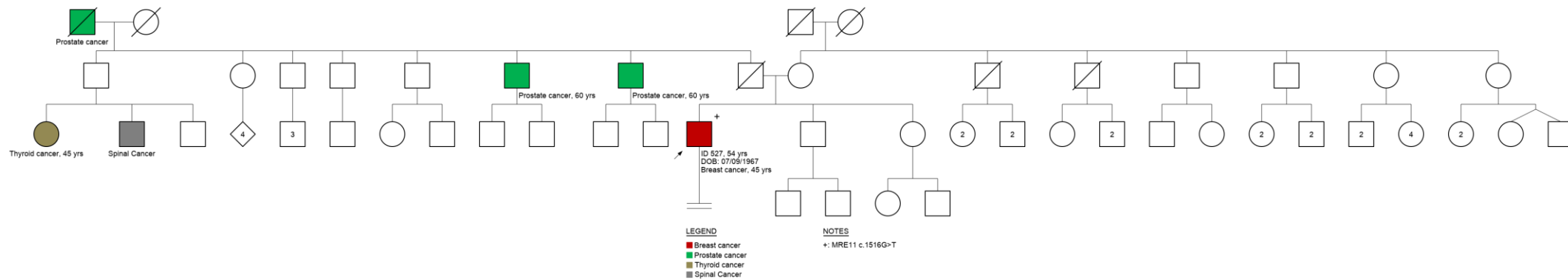
- +: LRP1B c.2395C>T
- +: CTC1 c.322C>T

**CTC1 c.322C>T (p.Arg108Ter)**

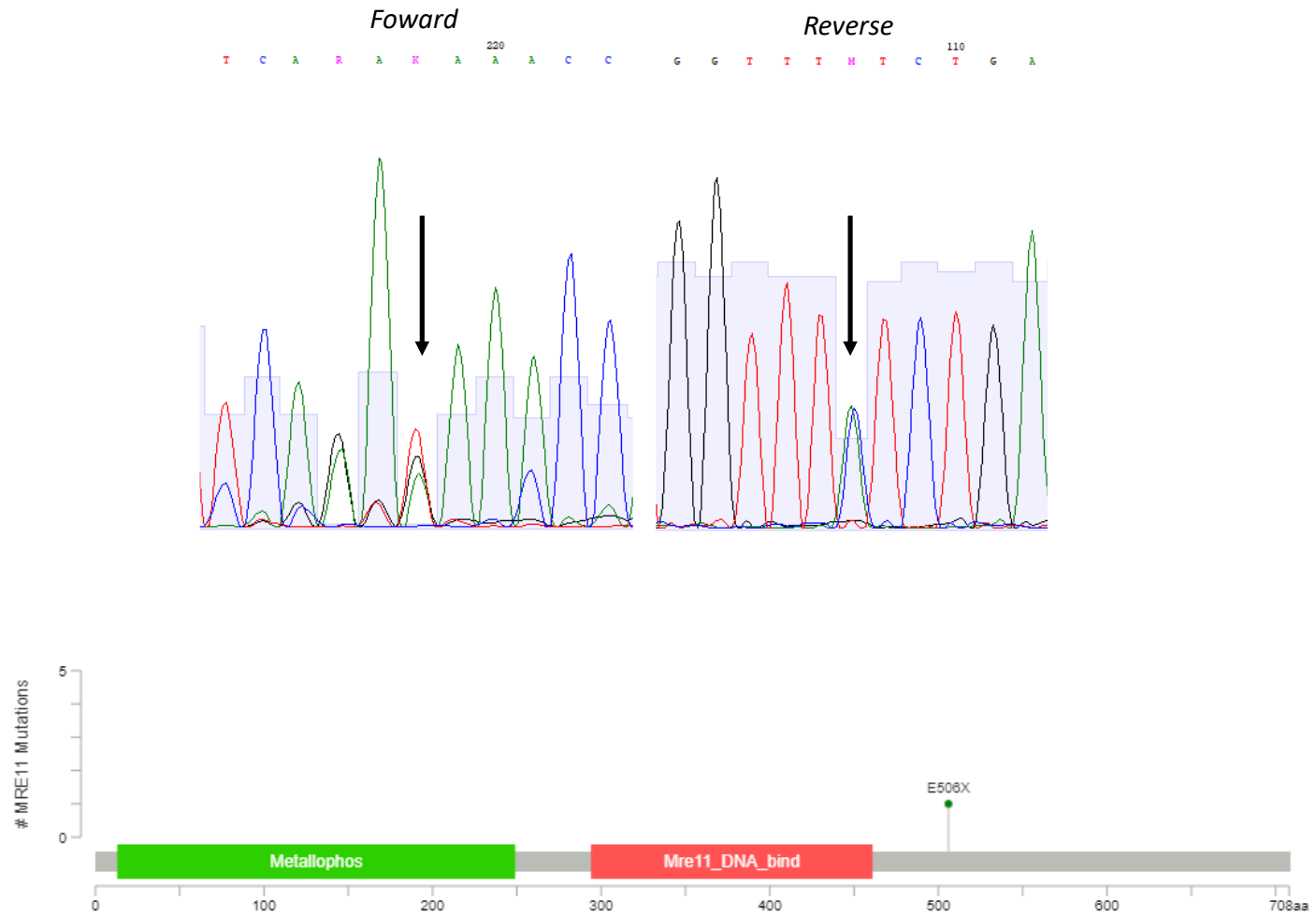


**LRP1B c.2395C>T (p.Arg799Ter)**

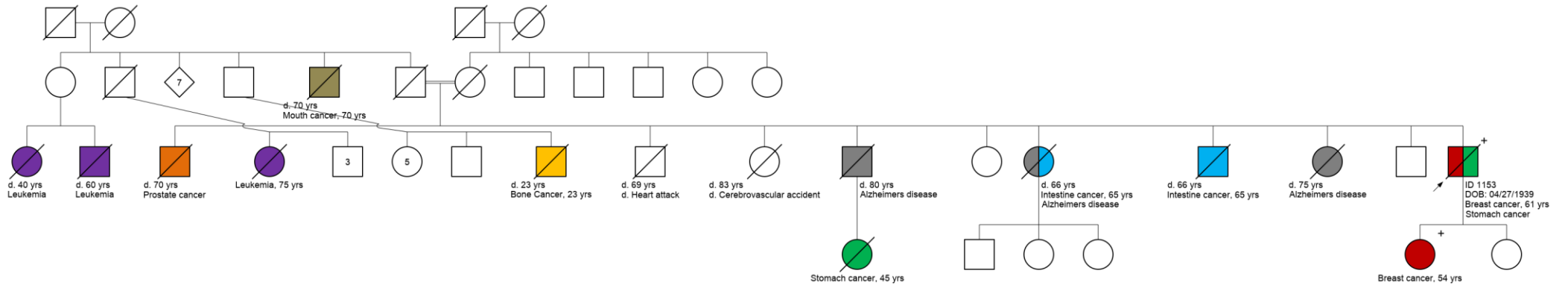
Anexo 2C – ID 527



**MRE11 c.1516G>T (p.Glu506Ter)**



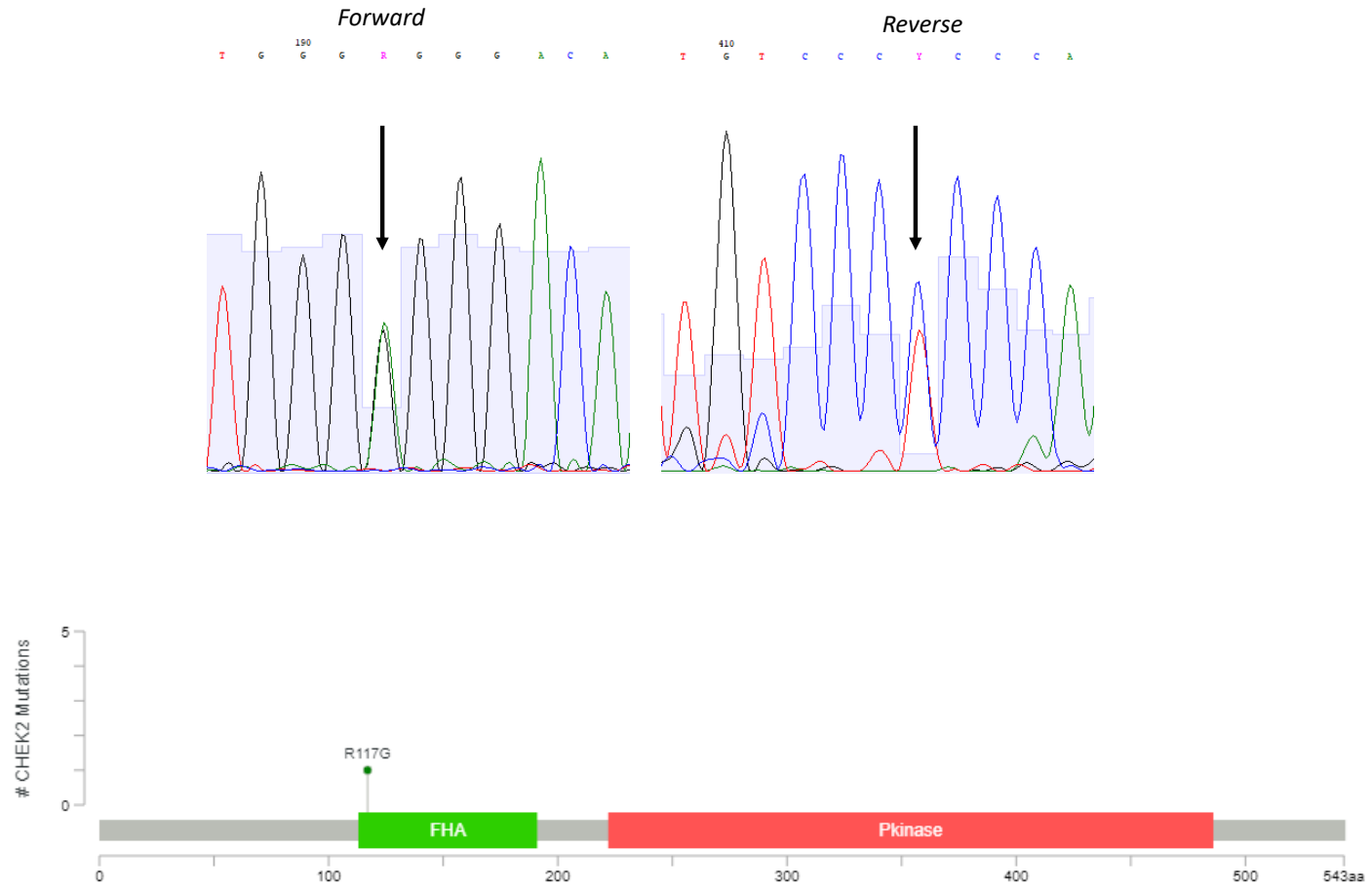
Anexo 2D – ID 1153



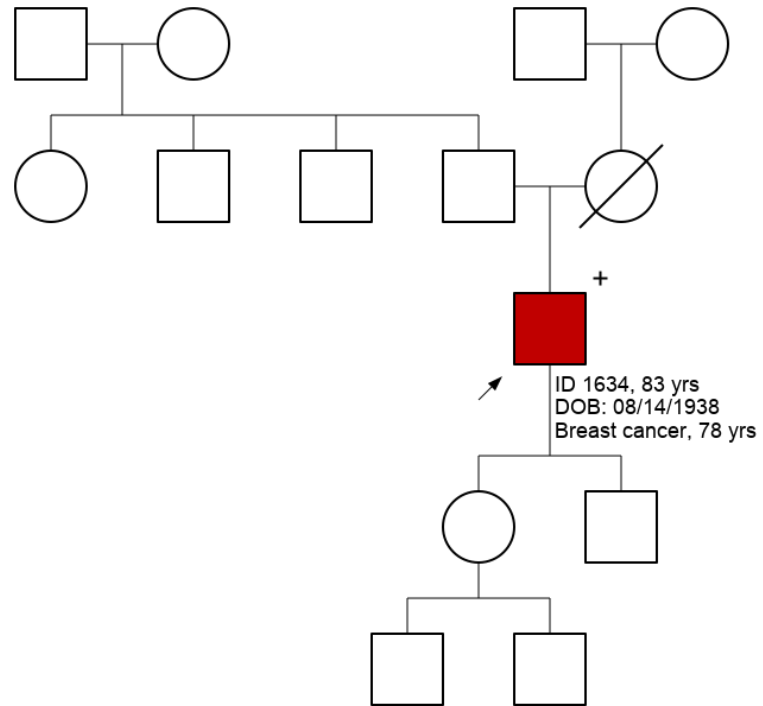
- LEGEND**
- Breast cancer
  - Stomach cancer
  - Prostate cancer
  - Alzheimers disease
  - Intestine cancer
  - Mouth cancer
  - Bone Cancer
  - Leukemia

**NOTES**  
 +: CHEK2 c.349A>G

ID 1153  
 DOB: 04/27/1939  
 Breast cancer, 61 yrs  
 Stomach cancer

**CHEK2 c.349A>G (p.Arg117Gly)**

Anexo 2E – ID 1634



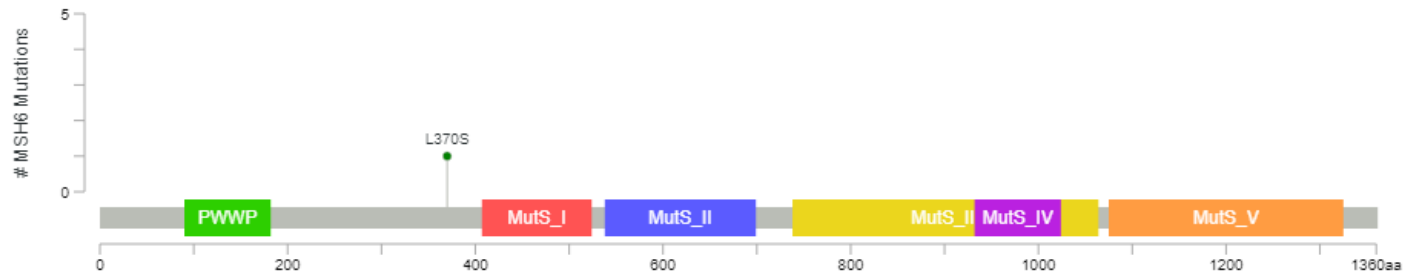
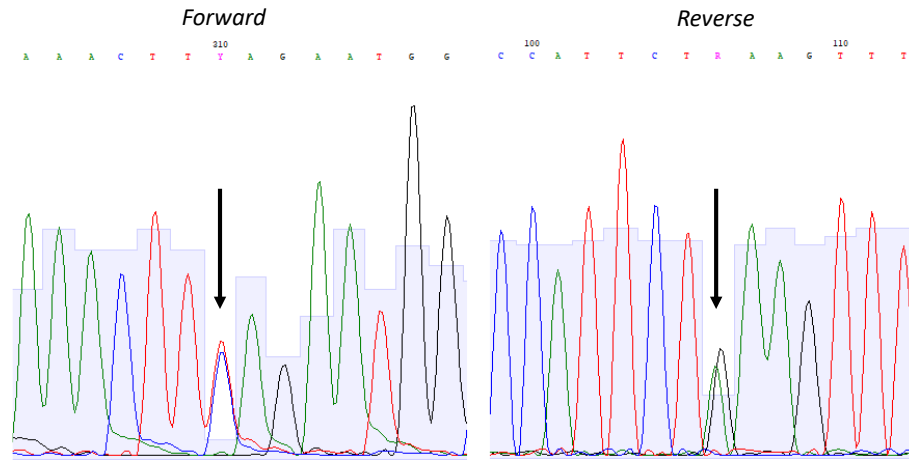
LEGEND

■ Breast cancer

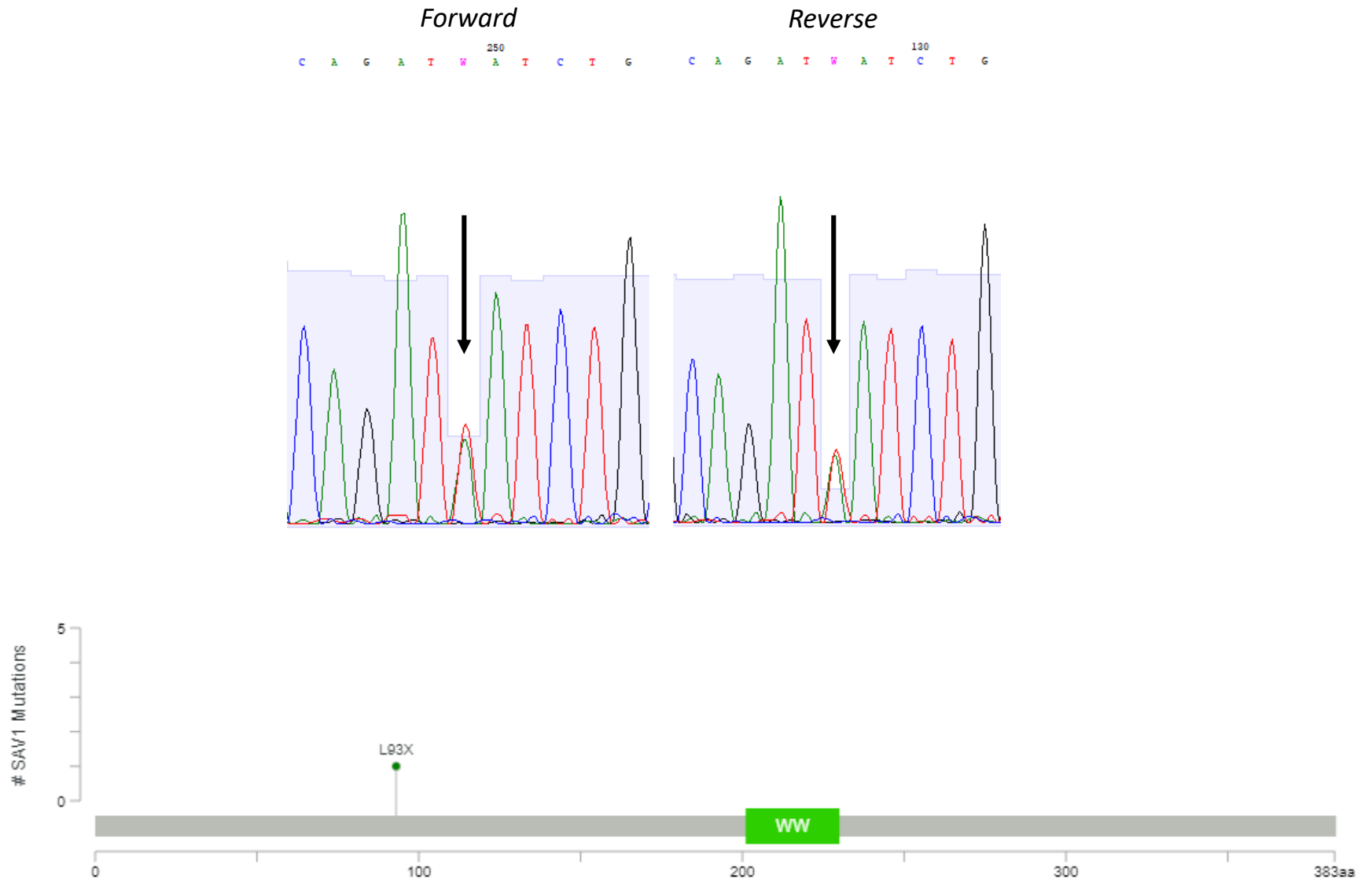
NOTES

+: MSH6 c.1109T>C

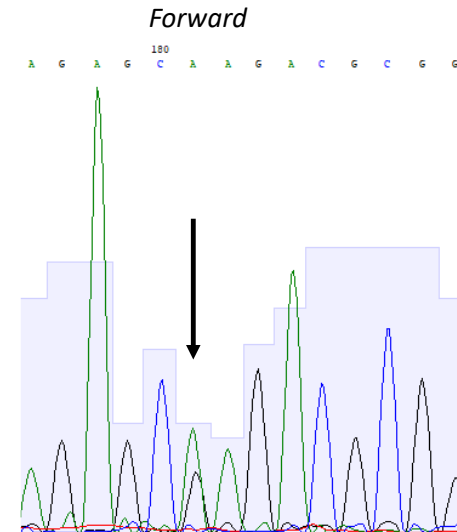
**MSH6 c.1109T>C (p.Leu370Ser)**



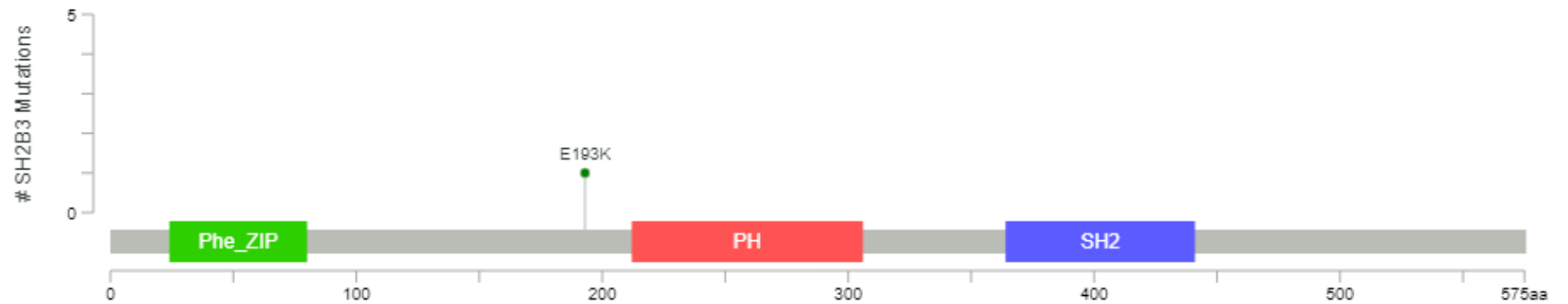


**SAV1 c.278T>A (p.Leu93Ter)**

**SH2B3 c.1183G>A (p.Glu395Lys)**

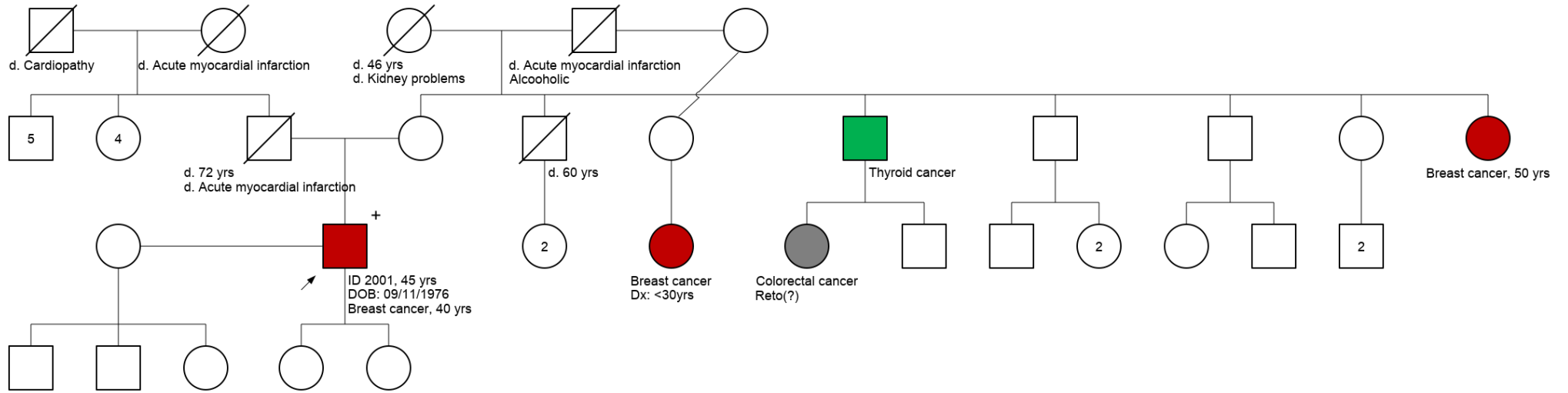


\*O sequenciamento reverse não apresentou boa qualidade em nenhuma das tentativas realizadas



\*\*A posição proteica descrita e a marcada na figura não são as mesmas por causa da RefSeq utilizada pelo cBioPortal, no entanto a variante indicada na figura se trata da mesma descrita

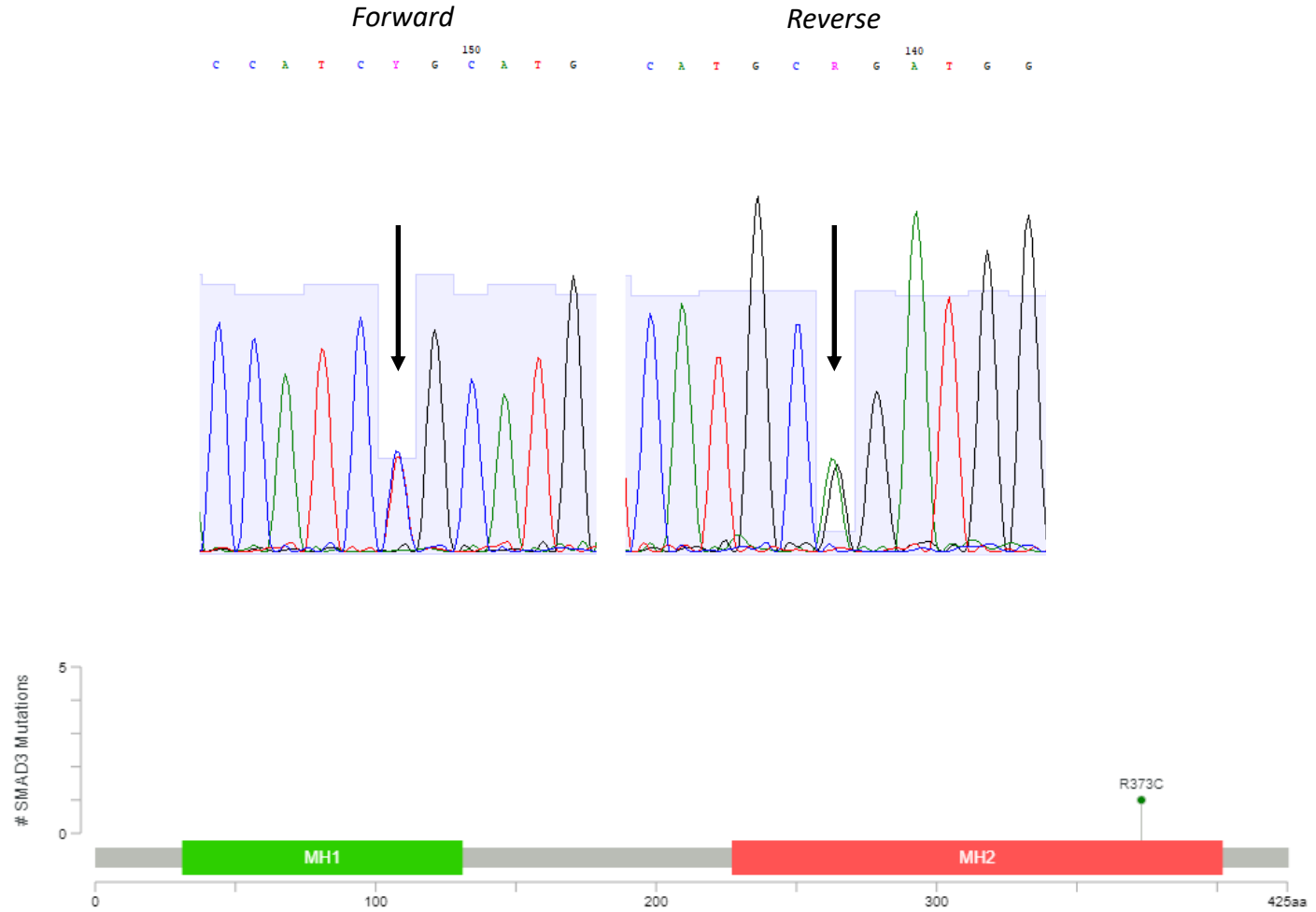
**Anexo 2G – ID 2001**



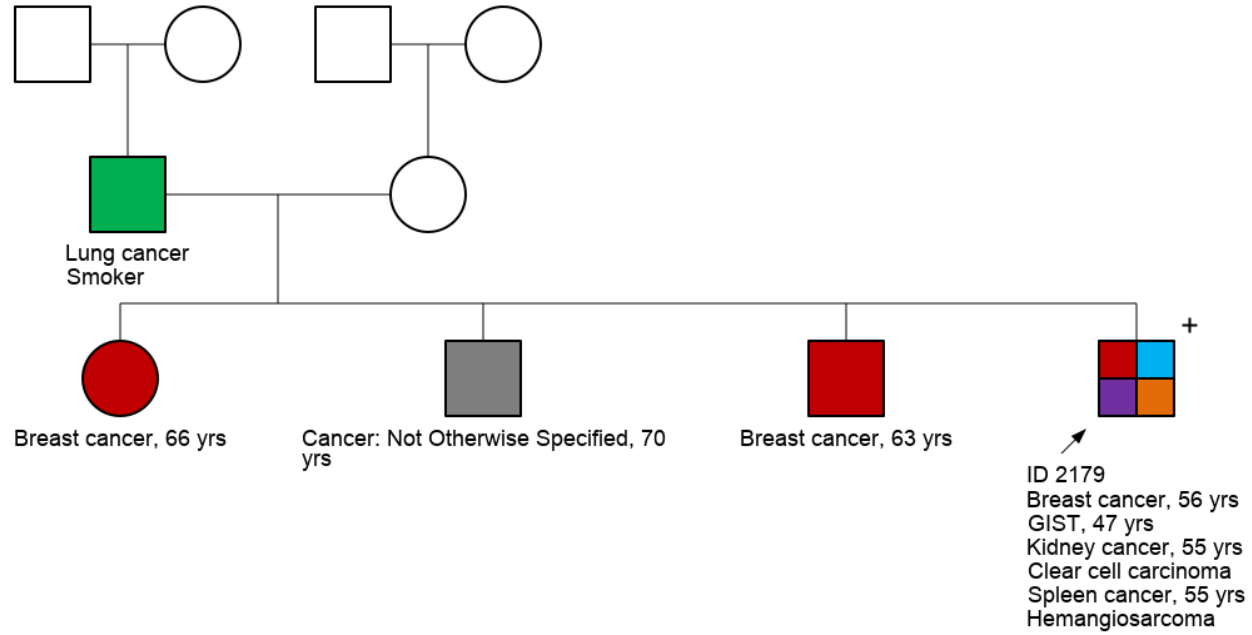
**LEGEND**  
 ■ Breast cancer  
 ■ Thyroid cancer  
 ■ Colorectal cancer

**NOTES**  
 +: SMAD3 c.1117C>T  
 +: DACH1 c.235\_241del

**SMAD3 c.1117C>T (p.Arg373Cys)**



Anexo 2H – ID 2179

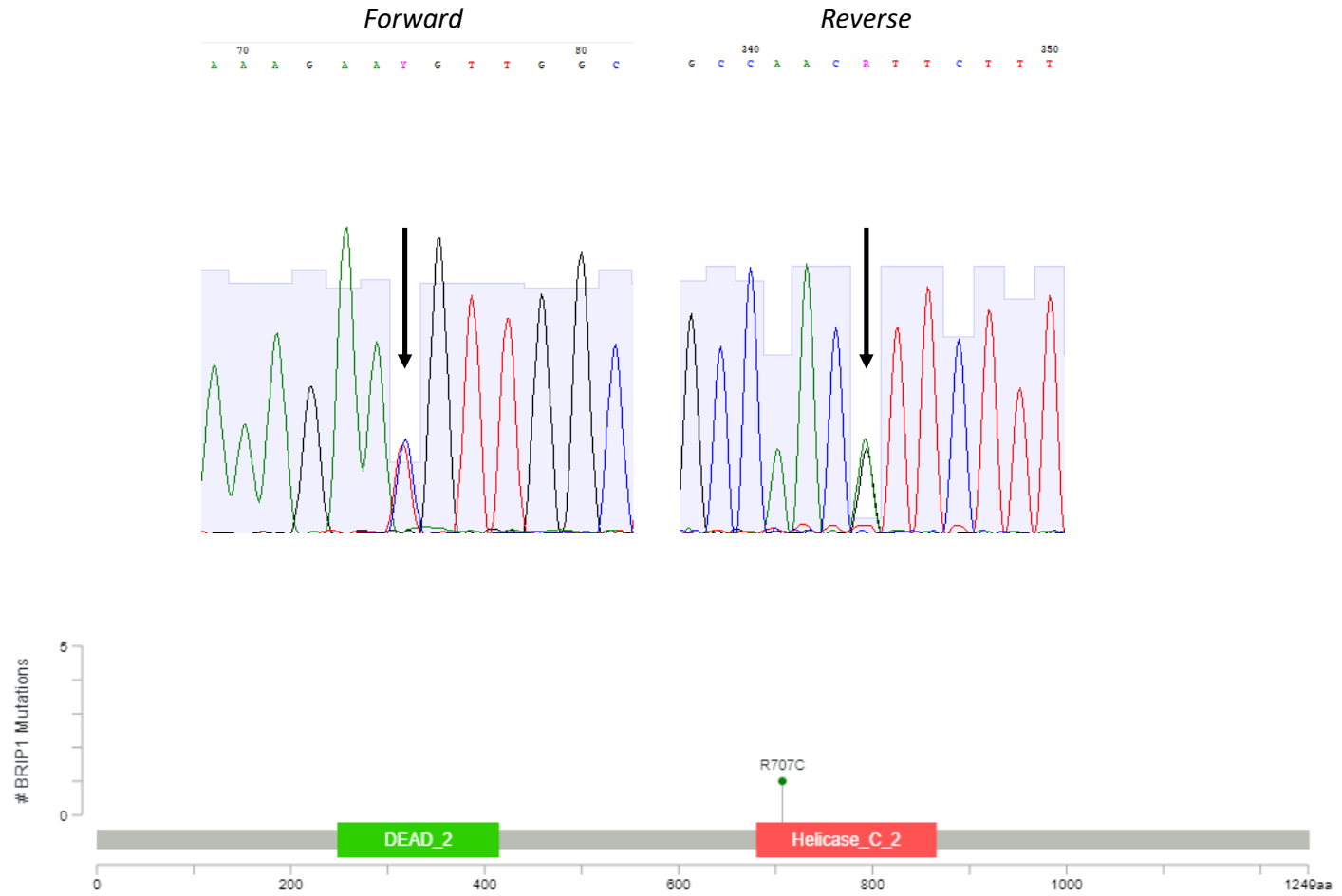


LEGEND

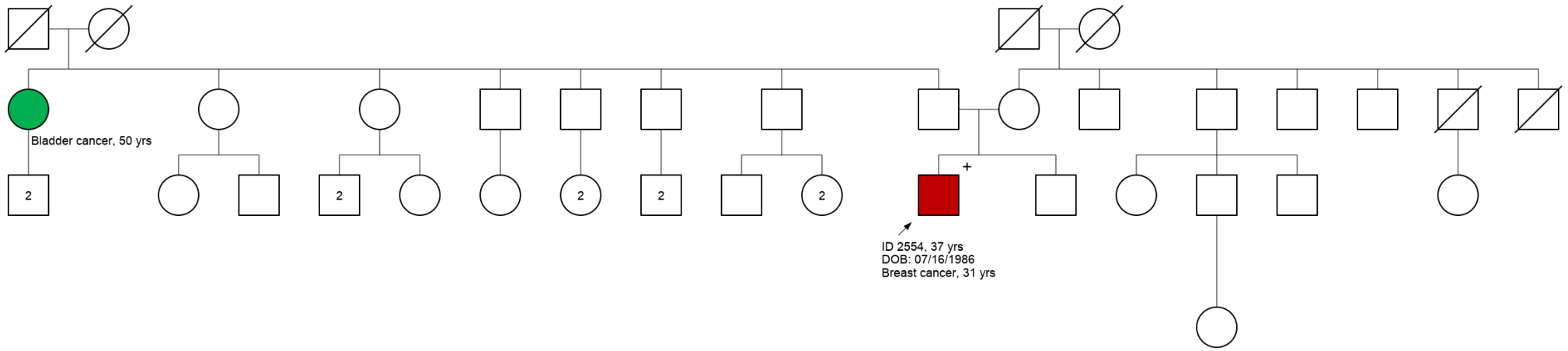
- Breast cancer
- GIST
- Kidney cancer
- Spleen cancer
- Lung cancer
- Cancer: Not Otherwise Specified

NOTES

+: BRIP1 c.2119C>T

**BRIP1 c.2119C>T (p.Arg707Cys)**

Anexo 21 – ID 2554

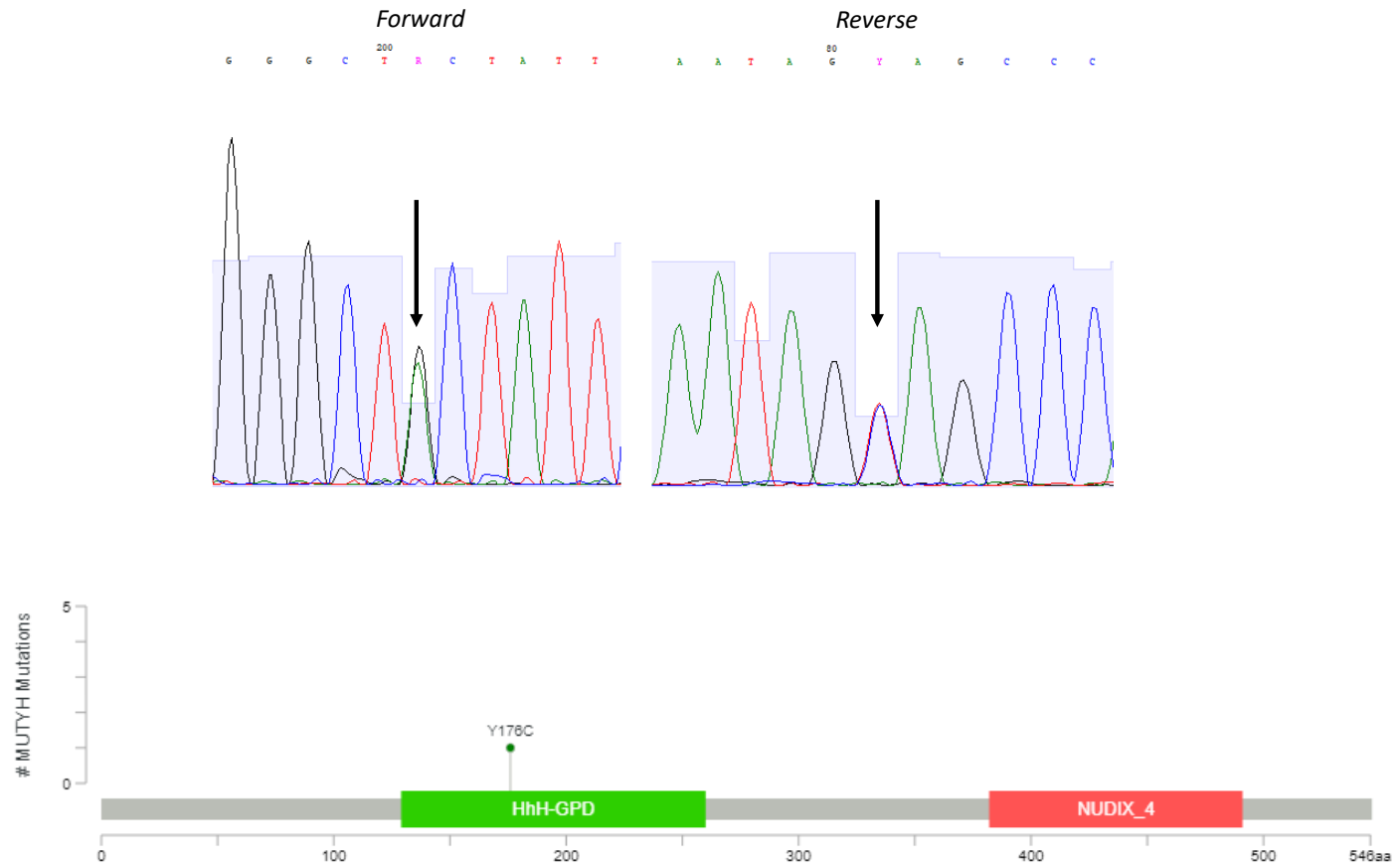


LEGEND

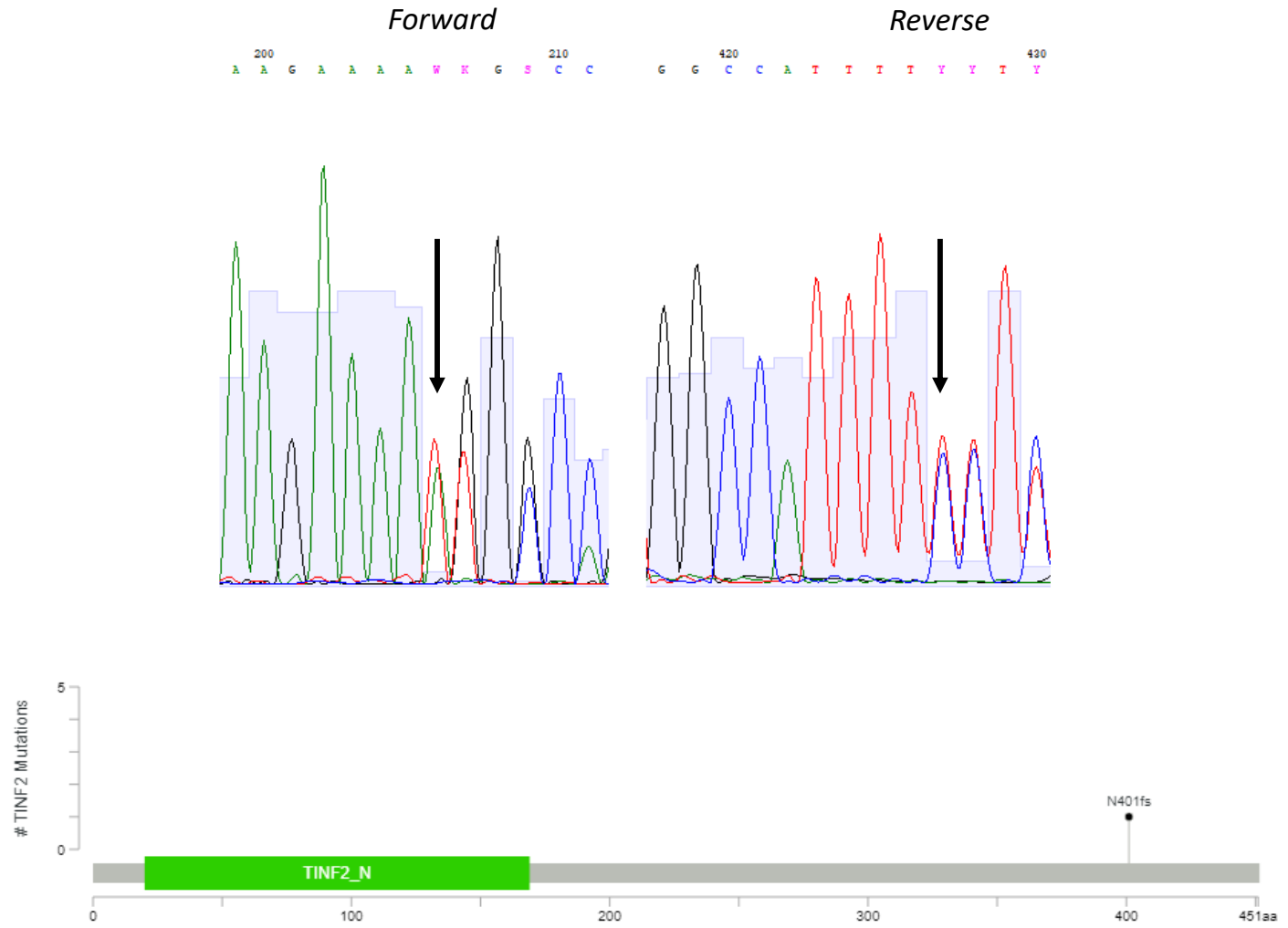
- Breast cancer
- Bladder cancer

NOTES

- +: TINF2 c.1202dupA
- +: MUTYH c.527A>G

**MUTYH c.452A>G (p.Tyr151Cys)**

**TINF2 c.1202dupA (p.Asn401fs)**



**Anexo 3 – Variantes de significado clínico incerto (VUS) identificadas em homens diagnosticados com câncer de mama**

ID	Gene	Transcrito	Variante no cDNA (HGVS)	Mudança a nível proteico	ClinVar	dbSNP	ACMG-AMP	REVEL	gnomAD (FA)	ABraOM (FA)
527	ABCB1	NM_001348946	c.1762C>T	p.Arg588Cys	Responsivo a drogas	rs201122883	3	0.916	0.0159	NR
148	ABCG2	NM_004827	c.221G>A	p.Gly74Asp	NR	rs199976573	3	0.87	0.0637	0.000821
2279	ABL1	NM_005157	c.2626A>G	p.Arg876Gly	VUS	rs587778012	3	0.238	0.00839	NR
1153	ABTB1	NM_172027	c.266A>G	p.Lys89Arg	NR	NR	3	0.345	0.00399	NR
2272	ACSL6	NM_001009185	c.1234C>T	p.Arg412Cys	NR	rs140341663	3	0.423	0.0004	0.003284
333	AFF1	NM_005935	c.1021C>T	p.Pro341Ser	NR	rs374948523	3	0.535	0.0482	NR
2554	AFF1	NM_005935	c.1232C>T	p.Thr411Ile	NR	NR	3	0.214	NR	NR
1	AFP	NM_001134	c.428A>C	p.Glu143Ala	NR	rs374723455	3	0.358	0.00796	0.001642
4	AIP	NM_001302959	c.47G>A	p.Arg16His	ICP (1 VUS, 6 PB)	rs145047094	3	0.777	0.002	NR
527	ANK1	NM_000037	c.4680G>A	p.Met1560Ile	NR	rs865882131	3	0.059	0.00412	0.001642
187	ANO1	NM_018043	c.1625T>C	p.Ile542Thr	NR	NR	3	0.78	NR	NR
2001	APC	NM_000038	c.7158G>C	p.Lys2386Asn	VUS	NR	3	0.445	NR	NR
2554	APC	NM_000038	c.8524T>G	p.Ser2842Ala	VUS	rs587780610	3	0.394	0.012	NR
2554	APTX	NM_001195248	c.879G>A	p.Trp293fs	NR	rs104894103	3	SP	0.0002	0.000821
1784	ARHGEF12	NM_015313	c.1526G>A	p.Arg509Gln	NR	rs138160103	3	0.689	0.0016	NR
2170	ARID2	NM_152641	c.3887G>A	p.Gly1296Glu	NR	NR	3	0.391	0.00797	NR
2318	ATM	NM_000051	c.1444A>C	p.Lys482Gln	ICP (9 VUS, 3 PB)	rs202173660	3	0.156	0.0955	NR
2302	ATP4A	NM_000704	c.1979G>A	p.Arg660His	NR	rs752094325	3	0.327	0.0718	NR
2302	BANP	NM_001173539	c.155C>G	p.Ser52Cys	NR	rs777421580	3	0.19	0.00796	NR
2318	BCAR1	NM_014567	c.665A>G	p.Tyr222Cys	NR	rs890933316	3	0.399	0.0141	NR
67	BCL2L12	NM_001282516	c.478C>T	p.Arg160Cys	NR	rs201494242	3	0.12	0.0001	NR
2302	BCR	NM_004327	c.2086C>T	p.Arg696Trp	NR	NR	3	0.324	NR	NR
2279	BLM	NM_000057	c.715G>C	p.Asp239His	VUS	rs200756519	3	0.136	0.0199	NR
2318	BRCA1	NM_007294	c.4390C>G	p.Pro1464Ala	NR	NR	3	0.14	0.00398	NR
333	BRD3	NM_007371	c.1967C>T	p.Ser656Leu	NR	rs200522998	3	0.179	0.012	NR
1439	CARD11	NM_032415	c.2119C>T	p.Arg707Cys	VUS	rs143049136	3	0.196	0.0935	NR
187	CASP9	NM_001229	c.85C>A	p.Leu29Met	NR	NR	3	0.244	0.00725	NR

187	CBLB	NM_170662	c.1670C>T	p.Pro557Leu	NR	rs148064625	3	0.467	0.0955	0.000821
2302	CBLC	NM_012116	c.1030A>G	p.Met344Val	NR	rs149074838	3	0.799	0.0072	0.007389
148	CDH23	NM_022124	c.8407G>A	p.Val2803Ile	VUS	rs369697366	3	0.134	0.0001	0.002463
2284	CDH23	NM_022124	c.7382C>T	p.Ser2461Phe	VUS	rs373823262	3	0.568	0.0201	NR
187	CEP57	NM_014679	c.95C>T	p.Ser32Phe	ICP (1 VUS, 1 PB)	rs139110744	3	0.175	0.0003	NR
2104	CLIP1	NM_198240	c.3421G>A	p.Gly1141Arg	NR	NR	3	0.186	NR	NR
1153	COL2A1	NM_001844	c.3802A>G	p.Ser1268Gly	VUS	rs374360275	3	0.27	NR	NR
148	COL2A1	NM_001844	c.4157C>A	p.Ser1386Tyr	NR	NR	3	0.652	NR	NR
2284	COL3A1	NM_000090	c.3326G>A	p.Arg1109Gln	VUS	rs730880062	3	0.593	0.016	NR
2302	CPNE3	NM_003909	c.90A>C	p.Leu30Phe	NR	NR	3	0.343	NR	NR
2421	CTNND2	NM_001332	c.1598C>T	p.Pro533Leu	NR	rs201675268	3	0.675	0.0001	0.000821
4	CYR61/CCN1	NM_001554	c.757A>C	p.Asn253His	NR	NR	3	0.587	0.00398	0.000821
2353	DDX10	NM_004398	c.960T>G	p.Phe320Leu	NR	NR	3	0.267	NR	NR
2421	DDX10	NM_004398	c.1900G>A	p.Asp634Asn	NR	NR	3	0.158	0.0478	NR
1918	DMC1	NM_007068	c.449G>A	p.Gly150Asp	NR	rs58396845	3	0.293	0.0002	0.001642
1439	DMTF1	NM_001142327	c.2176C>A	p.Pro726Thr	NR	NR	3	0.348	0	NR
2179	DNMT3B	NM_006892	c.481C>T	p.Pro161Ser	VUS	NR	3	0.263	NR	NR
2349	DNMT3B	NM_006892	c.73G>A	p.Gly25Arg	VUS	rs151128145	3	0.477	0.0008	0.000821
2349	E2F1	NM_005225	c.672G>A	p.Met224Ile	NR	rs199745489	3	0.161	0.0000478	0.001642
2200	E2F2	NM_004091	c.854A>G	p.Asp285Gly	NR	NR	3	0.192	0.0421	NR
2170	ECT2L	NM_001195037	c.2227C>T	p.Gln743fs	NR	rs199963616	3	SP	0.001	0.001642
2279	ECT2L	NM_001195037	c.2027_2028del	p.Lys676fs	NR	rs554645676	3	SP	0.006	NR
2302	ECT2L	NM_001195037	c.2027_2028del	p.Lys676fs	NR	rs554645676	3	SP	0.006	NR
2344	ELF3	NM_004433	c.13T>C	p.Cys5Arg	NR	rs143610955	3	0.269	0.0003	0.000821
1153	EPAS1	NM_001430	c.1556C>T	p.Thr519Met	NR	rs377001303	3	0.241	0.0000485	0.000821
333	EPHA4	NM_004438	c.2420T>G	p.Val807Gly	NR	NR	3	0.943	NR	NR
2349	EPN1	NM_001130072	c.1691C>T	p.Pro564Leu	NR	rs371999678	3	0.051	0.00681	NR
2272	ERC1	NM_178040	c.2207G>A	p.Arg736Gln	NR	rs140918161	3	0.25	0.0005	NR
2353	ERCC2	NM_000400	c.1802G>A	p.Arg601Gln	NR	rs140522180	3	0.674	0.0003570	NR
2284	ERCC4	NM_005236	c.23G>A	p.Arg8Gln	NR	rs759843019	3	0.076	0.00824	NR

1918	ERCC6	NM_000124	c.1666A>T	p.Thr556Ser	NR	NR	3	0.336	0.012	NR
1634	ETS2	NM_001256295	c.128G>A	p.Arg43Lys	NR	rs1023036362	3	SP	NR	NR
148	FAN1	NM_014967	c.80C>T	p.Ser27Phe	VUS	rs139353520	3	0.22	0.0958	0.000821
333	FAN1	NM_014967	c.1772G>A	p.Arg591Gln	NR	rs768146914	3	0.337	0.0199	NR
148	FANCD2	NM_001018115	c.860A>C	p.His287Pro	NR	NR	3	0.406	NR	NR
148	FANCD2	NM_001018115	c.2180C>T	p.Pro727Leu	ICP (3 VUS, 1 PB)	rs146509445	3	0.23	0.0001	NR
148	FAT1	NM_005245	c.7957G>A	p.Gly2653Ser	NR	rs200149452	3	0.69	0.0006	0.004105
2318	FAT1	NM_005245	c.3817_3818delinsTGG	p.His1273delinsLeuAsp	NR	rs328418	3	SP	NR	NR
2421	FAT1	NM_005245	c.7298A>G	p.Asn2433Ser	NR	rs183723851	3	0.329	0.0602	NR
1634	FAT3	NM_001008781	c.11012G>A	p.Arg3671His	NR	rs535363004	3	0.439	0.0281	NR
2318	FAT3	NM_001008781	c.5566A>T	p.Ser1856Cys	NR	rs200829005	3	0.329	0.0005	0.001642
2344	FAT4	NM_001291303	c.12812C>T	p.Thr4271Ile	NR	NR	3	0.564	NR	0.000821
333	FBLN2	NM_001004019	c.472C>T	p.Arg158Trp	NR	rs199776248	3	0.151	0.0002	0.000821
2170	FGF22	NM_001300812	c.454C>T	p.Pro152Ser	NR	rs11572889	3	SP	0.0054	0.009046
2421	FGF6	NM_020996	c.413T>C	p.Phe138Ser	NR	NR	3	0.92	NR	NR
2179	FGFR3	NM_000142	c.2272G>A	p.Asp758Asn	ICP (1 VUS, 1 PB)	rs56266857	3	0.283	0.0003	0.000824
2284	FLOT1	NM_005803	c.775G>A	p.Val259Met	NR	rs149283777	3	0.19	0.0004	0.000821
2302	FLT1	NM_002019	c.2911T>G	p.Phe971Val	NR	NR	3	0.67	0.00398	NR
2302	FLT4	NM_182925	c.3761C>T	p.Thr1254Ile	NR	rs201542981	3	0.645	0.0518	NR
2349	FOLH1	NM_004476	c.802C>T	p.Leu268Phe	NR	rs140123322	3	0.312	0.0013	NR
1342	FOXA1	NM_004496	c.69G>C	p.Gln23His	NR	rs139801655	3	0.166	0.0009	0.002463
4	FOXE1	NM_004473	c.743C>G	p.Ala248Gly	VUS	rs538912281	3	0.662	0.002	0.002517
2179	FOXO1	NM_002015	c.1036A>G	p.Met346Val	NR	rs1004836513	3	0.254	NR	NR
2344	FURIN	NM_002569	c.433C>T	p.His145Tyr	NR	rs370390012	3	0.185	0.0159	0.004105
2170	GEN1	NM_001130009	c.56T>C	p.Leu19Ser	NR	NR	3	0.619	0.00398	NR
2272	GNAS	NM_080425	c.1642G>A	p.Ala548Thr	VUS	rs760016801	3	0.249	0.00479	NR
4	GPC5	NM_004466	c.456A>T	p.Leu152Phe	NR	rs766646280	3	0.254	0.0159	NR
2554	GRB7	NM_005310	c.1547G>A	p.Arg516His	NR	rs369894051	3	0.24	0.0479	0.000821
2554	GRM3	NM_000840	c.1567C>A	p.Pro523Thr	NR	NR	3	0.389	NR	NR
2104	HCLS1	NM_005335	c.487G>A	p.Val163Met	NR	rs372191150	3	0.302	0.00398	NR

1342	HELQ	NM_001297755	c.47A>G	p.Lys16Arg	NR	rs150540222	3	0.207	0.0012	0.002463
2353	HELQ	NM_001297755	c.196C>T	p.Leu66Phe	NR	rs185984250	3	0.026	0.0239	NR
4	HEXB	NM_000521	c.1367A>C	p.Tyr456Ser	VUS	rs121907982	3	0.778	0.0000875	NR
2344	HIF3A	NM_152795	c.512C>T	p.Thr171Ile	NR	rs143277530	3	0.55	0.0001	0.000821
2279	HLTF	NM_003071	c.2729T>C	p.Leu910Pro	NR	NR	3	0.903	NR	NR
2554	HOXA9	NM_152739	c.565C>A	p.Pro189Thr	NR	rs140596580	3	0.398	0.0004	NR
2554	HOXA9	NM_152739	c.193G>A	p.Ala65Thr	NR	rs200385248	3	0.237	0.0003	NR
2284	HOXD11	NM_021192	c.661G>T	p.Gly221Trp	NR	rs771107863	3	0.503	0.0669	NR
527	HTATIP2	NM_001098522	c.109G>T	p.Glu37fs	NR	rs202128953	3	SP	0.0718	NR
2318	HTATIP2	NM_001098520	c.62T>C	p.Leu21Pro	NR	rs535685405	3	0.152	NR	NR
67	IL10	NM_000572	c.185A>C	p.Asp62Ala	NR	NR	3	0.392	NR	NR
2318	IL1B	NM_000576	c.2T>C	p.Met1Thr	NR	rs533327440	3	0.63	0.0994	0.001642
2179	ILK	NM_004517	c.806C>T	p.Thr269Ile	NR	rs770920688	3	0.728	0.0119	NR
1342	INSL3	NM_005543	c.143dupG	p.Gly48fs	NR	rs757862609	3	SP	0.0774	NR
1634	JAK3	NM_000215	c.2152G>C	p.Val718Leu	ICP (1 VUS, 3 PB)	rs146837396	3	0.125	0.0007	0.002463
2421	JAK3	NM_000215	c.2773C>A	p.Arg925Ser	ICP (1 PP, 2 VUS, 2 PB)	rs149452625	3	0.52	0.001	0.005757
2200	JUND	NM_005354	c.1010A>G	p.Gln337Arg	NR	rs200000692	3	0.29	0.0002	NR
2349	KANK1	NM_015158	c.1699A>C	p.Asn567His	NR	NR	3	0.309	NR	NR
1342	KAT6B	NM_012330	c.2207C>T	p.Ser736Leu	NR	NR	3	0.836	0.00000398	NR
2200	KLK2	NM_005551	c.164_195del	p.Val55fs	NR	rs748506110	3	SP	0.0879	NR
2284	KLK2	NM_005551	c.164_195del	p.Val55fs	NR	rs748506110	3	SP	0.0879	NR
2179	KLK3	NM_001648	c.70C>T	p.Arg24Trp	NR	rs141576693	3	0.312	0.0797	NR
1918	KMT2D	NM_003482	c.5911A>G	p.Ser1971Gly	NR	NR	3	0.395	NR	NR
2170	KRT7	NM_005556	c.796G>A	p.Ala266Thr	NR	NR	3	0.423	NR	NR
2200	KRT7	NM_005556	c.1078G>A	p.Ala360Thr	NR	rs1021750369	3	0.723	NR	0.000821
2179	LMNA	NM_001282624	c.92G>A	p.Arg31Gln	NR	rs1036587100	3	0.11	0.0043	NR
2200	LMNA	NM_170707	c.986G>A	p.Arg329His	VUS	rs397517913	3	0.581	0.00002	NR
333	LTK	NM_002344	c.496G>T	p.Asp166Tyr	NR	rs752575788	3	0.331	1.23e-05	NR
1439	MAFB	NM_005461	c.565G>A	p.Gly189Arg	NR	NR	3	0.294	0.028	NR
1634	MAGI1	NM_001033057	c.92C>T	p.Thr31Met	NR	rs139524567	3	0.054	0.0004	NR

2344	MAG11	NM_001033057	c.92C>T	p.Thr31Met	NR	rs139524567	3	0.054	0.0004	NR
2279	MAP2K4	NM_003010	c.83C>T	p.Ala28Val	NR	NR	3	0.098	NR	NR
2200	MAP3K13	NM_004721	c.434T>C	p.Ile145Thr	NR	rs767133399	3	0.757	0.0558	NR
1	MBD4	NM_001276270	c.347T>G	p.Leu116Arg	NR	rs200082149	3	0.377	0.0001	NR
2353	MCF2L	NM_001112732	c.79+1G>C	.	NR	rs760992655	3	SP	0.006799	NR
2279	MCF2L	NM_001112732	c.2035C>G	p.Leu679Val	NR	NR	3	0.294	NR	NR
2170	MDH2	NM_005918	c.725C>T	p.Ala242Val	NR	rs782141356	3	0.524	0.0164	NR
1439	MIB2	NM_001170688	c.2536C>T	p.Arg846Trp	NR	rs568026207	3	0.014	0.0002	0.000836
2421	MIB2	NM_001170688	c.1907C>T	p.Thr636Met	NR	rs367618378	3	0.205	0.0161	NR
2344	MINK1	NM_153827	c.2422C>T	p.Arg808Trp	NR	rs756866863	3	0.41	0.0122	0.000821
1757	MKL1/ MRTFA	NM_020831	c.1477C>T	p.Pro493Ser	VUS	rs200565523	3	0.332	0.00819	NR
4	MKRN2	NM_014160	c.853A>G	p.Ile285Val	NR	rs772310390	3	0.402	0.00796	NR
1153	MLLT10	NM_001195626	c.1147C>T	p.Arg383Cys	NR	NR	3	0.184	0.00398	NR
4	MME	NM_007289	c.68G>A	p.Arg23Gln	VUS	rs201850855	3	0.609	0.0002	NR
4	MMP9	NM_004994	c.773C>T	p.Thr258Ile	ICP (4 VUS, 1 PB)	rs41529445	3	0.467	0.001	NR
1342	MMP9	NM_004994	c.773C>T	p.Thr258Ile	ICP (4 VUS, 1 PB)	rs41529445	3	0.467	0.001	NR
1	MPL	NM_005373	c.1805T>C	p.Met602Thr	VUS	rs770770219	3	0.12	0.0517	NR
4	MPP3	NM_001932	c.617C>A	p.Ser206Tyr	NR	rs189143886	3	0.575	0.0053	0.009852
2344	MSH2	NM_000251	c.286C>A	p.Arg96Ser	VUS	NR	3	0.77	NR	NR
2554	MSI2	NM_138962	c.904G>A	p.Ala302Thr	NR	rs145489286	3	0.148	0.0007	NR
4	MUC4	NM_018406	c.13187C>G	p.Ala4396Gly	NR	rs765093267	3	0.356	0.00398	NR
1784	MUC4	NM_018406	c.6948_6952del	p.Gly2316fs	NR	rs780998555	3	SP	0.0197	NR
2104	MXI1	NM_005962	c.69G>C	p.Glu23Asp	NR	rs369915050	3	0.159	0.0002	0.000865
333	MYH11	NM_001040113	c.1261A>G	p.Lys421Glu	NR	NR	3	0.595	NR	NR
187	NBPF3	NM_001256416	c.106C>T	p.Arg36fs	NR	rs758505231	3	SP	0.00399	NR
2554	NF2	NM_000268	c.1018G>T	p.Ala340Ser	VUS	rs780430071	3	0.316	NR	NR
2284	NFATC2	NM_012340	c.1796C>T	p.Thr599Met	NR	rs141528841	3	0.621	0.0000517	NR
527	NFKB2	NM_001322934	c.2531T>C	p.Val844Ala	VUS	NR	3	0.743	NR	NR
1153	NHEJ1	NM_024782	c.455A>G	p.Glu152Gly	NR	NR	3	0.365	NR	NR
2344	NIN	NM_020921	c.2509G>C	p.Glu837Gln	NR	NR	3	0.084	NR	NR

2284	NOTCH1	NM_017617	c.6476G>A	p.Arg2159His	VUS	rs1060502233	3	0.5	0.00407	NR
1	NOTCH2	NM_024408	c.3995G>A	p.Arg1332His	VUS	rs587609362	3	0.231	0.0429	0.00165
1757	NTRK1	NM_002529	c.2242C>T	p.Arg748Trp	VUS	rs778520978	3	0.65	0.0443	NR
148	NUP214	NM_005085	c.107A>T	p.Lys36Met	NR	rs934461763	3	0.544	NR	NR
333	OBSCN	NM_001098623	c.20514_20515del	p.Ala6838fs	NR	rs536227878	3	SP	0.0034	0.004926
2318	OLIG2	NM_005806	c.608C>T	p.Ala203Val	NR	NR	3	0.092	NR	NR
2353	PAX3	NM_013942	c.611C>T	p.Ser204Phe	NR	rs28945095	3	0.213	0.0002	NR
527	PCM1	NM_001315507	c.2954G>A	p.Arg985His	NR	rs777684049	3	0.5	0.0161	NR
2349	PDE4DIP	NM_001198834	c.4187G>A	p.Trp1396fs	NR	rs782516582	3	SP	0.0757	NR
2284	PDGFD	NM_025208	c.7C>G	p.Arg3Gly	NR	rs147228586	3	0.068	0.0002	NR
2318	PIDD1	NM_145886	c.719G>A	p.Arg240Gln	NR	rs371538473	3	0.032	0.0001	NR
333	PINK1	NM_032409	c.835C>T	p.Arg279Cys	VUS	rs61735932	3	0.546	0.0596	NR
2279	PNKP	NM_007254	c.1321G>A	p.Ala441Thr	VUS	NR	3	0.157	0.00682	NR
2279	POLD1	NM_002691	c.3256C>T	p.Arg1086Trp	VUS	rs963136799	3	0.171	0.00000826	NR
2272	POLE4	NM_019896	c.28G>A	p.Gly10Arg	NR	NR	3	0.161	0	NR
2104	POLG	NM_002693	c.2145A>T	p.Gln715His	VUS	rs796052882	3	0.292	0.00398	0.000821
2001	PREX2	NM_024870	c.3184C>T	p.Arg1062Cys	NR	rs200550325	3	0.168	0.0845	0.001642
67	PTCH2	NM_003738	c.898G>A	p.Gly300Arg	NR	NR	3	0.941	NR	NR
1757	PTPRU	NM_133178	c.1136A>C	p.Lys379Thr	NR	rs72649292	3	0.664	0.0015	0.002463
2421	RAD18	NM_020165	c.676C>T	p.Arg226Cys	NR	rs773677079	3	0.177	0.0319	NR
1918	RAD51B	NM_001321812	c.1042A>G	p.Arg348Gly	NR	rs2525524	3	SP	NR	NR
2421	RASAL1	NM_001193520	c.2137G>C	p.Val713Leu	NR	rs776452112	3	0.169	NR	0.000821
1	RBBP8	NM_002894	c.1601C>T	p.Ser534Leu	NR	rs75541516	3	0.156	0.00813	NR
2302	RBL1	NM_002895	c.3181G>A	p.Val1061Ile	NR	NR	3	0.47	0.004	NR
1439	RBL2	NM_005611	c.247G>A	p.Asp83Asn	NR	rs372989712	3	0.361	0.0361	NR
2349	RBL2	NM_005611	c.2815A>G	p.Arg939Gly	NR	NR	3	0.631	0.004	NR
1439	RECQL4	NM_004260	c.1684C>T	p.Arg562Trp	VUS	rs61759892	3	NR	0.0003	NR
333	RINT1	NM_021930	c.2361G>A	p.Trp787Ter	VUS	NR	3	SP	0.000378	NR
1757	RIOX2	NM_153182	c.602C>T	p.Pro201Leu	NR	rs56183666	3	0.48	0.0057	0.00821
2200	RIOX2	NM_153182	c.602C>T	p.Pro201Leu	NR	rs56183666	3	0.48	0.0057	0.00821

2318	RIPK1	NM_001317061	c.101A>G	p.His34Arg	NR	NR	3	0.555	NR	NR
1153	RNF34	NM_194271	c.1003G>A	p.Asp335Asn	NR	rs144819272	3	0.456	0.0011	0.000821
2001	ROBO1	NM_002941	c.4606G>A	p.Asp1536Asn	NR	rs756036592	3	0.084	0.0482	NR
1342	ROR1	NM_005012	c.1639C>T	p.Pro547Ser	VUS	rs137874089	3	0.706	0.0001	NR
2353	RPA1	NM_002945	c.865T>C	p.Cys289Arg	NR	rs755623911	3	0.562	0.00795	NR
1757	RPL5	NM_000969	c.229G>A	p.Ala77Thr	VUS	rs752867126	3	0.611	0.00801	NR
148	RTEL1	NM_001283009	c.1519G>A	p.Asp507Asn	NR	rs778782744	3	0.107	0.012	NR
2279	RTEL1	NM_001283009	c.47A>G	p.Gln16Arg	VUS	rs748145576	3	0.06	0.00796	NR
1439	RUNX3	NM_004350	c.242C>T	p.Ser81Leu	NR	rs757386888	3	0.912	0.0207	0.000821
1757	RUNX3	NM_004350	c.790C>G	p.Pro264Ala	NR	rs759924278	3	0.082	0.00897	NR
4	SAMD9	NM_017654	c.1375C>T	p.Arg459Ter	VUS	rs145018604	3	SP	0.0000678	NR
2554	SASH1	NM_015278	c.3512G>A	p.Arg1171Gln	NR	rs143577116	3	0.558	0.0013	0.001642
1757	SAV1	NM_021818	c.1049T>C	p.Ile350Thr	NR	rs779939064	3	0.457	0.00000796	NR
1757	SCRIB	NM_182706	c.2066C>G	p.Thr689Ser	NR	rs373155569	3	0.008	0.011	NR
2421	SETMAR	NM_001276325	c.755T>C	p.Ile252Thr	NR	rs139483473	3	0.911	0.0997	NR
527	SFRP4	NM_003014	c.916G>A	p.Gly306Arg	NR	rs762703116	3	0.061	0.00398	NR
1634	SFRP4	NM_003014	c.652G>A	p.Val218Met	NR	rs746754945	3	0.349	0.00795	NR
1784	SH2B3	NM_005475	c.622G>C	p.Glu208Gln	ICP (1 VUS, 1 PB)	rs202080221	3	0.108	0.0011	0.002521
187	SH3GL1	NM_003025	c.647C>T	p.Ser216Leu	NR	rs202142863	3	0.265	0.0404	NR
67	SHB	NM_003028	c.122C>A	p.Pro41His	NR	NR	3	0.034	NR	NR
2170	SHB	NM_003028	c.1510G>A	p.Val504Met	NR	rs369726171	3	0.416	0.0281	NR
2349	SMAD6	NM_005585	c.1271C>T	p.Ala424Val	VUS	rs371348775	3	0.532	0.0394	NR
2284	SNTB1	NM_021021	c.1307C>T	p.Ala436Val	NR	rs61762674	3	0.544	0.005	0.004105
1634	SOS1	NM_005633	c.1627T>C	p.Ser543Pro	VUS	rs1057517868	3	0.743	0.012	NR
2554	ST14	NM_021978	c.598C>T	p.Pro200Ser	NR	rs781073815	3	0.362	0.00799	NR
1634	STAT5B	NM_012448	c.950A>G	p.Asn317Ser	NR	NR	3	0.148	NR	NR
1439	STIL	NM_001048166	c.728A>G	p.Lys243Arg	NR	NR	3	0.401	NR	NR
2200	STK3	NM_006281	c.119G>A	p.Ser40Asn	NR	rs187757501	3	0.305	0.003	0.004105
2200	SUFU	NM_016169	c.53C>G	p.Pro18Arg	VUS	NR	3	0.095	NR	NR
2353	SUSD2	NM_019601	c.1927G>A	p.Asp643Asn	NR	rs114116915	3	0.232	0.0001	NR

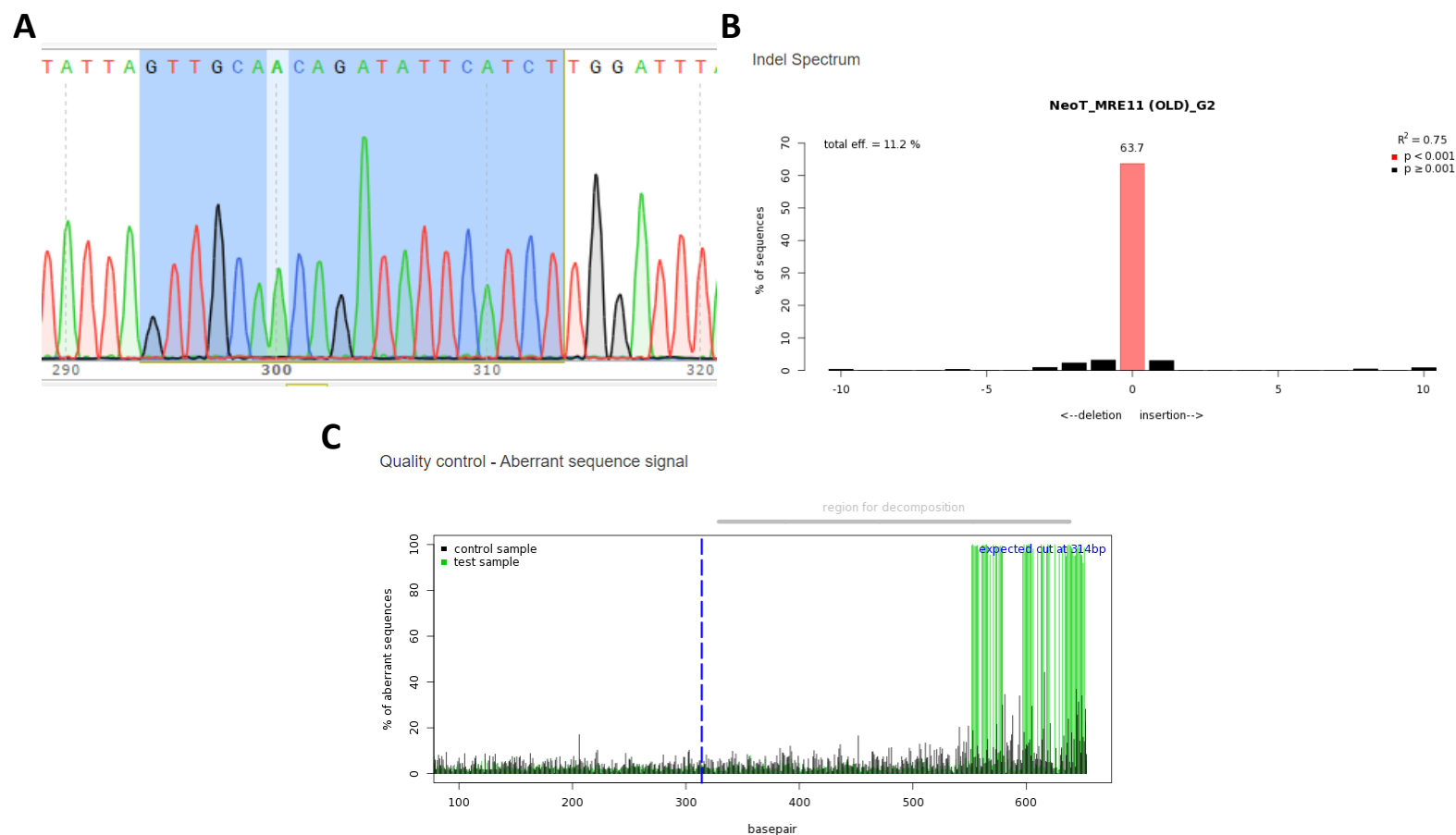
2554	SUSD2	NM_019601	c.2191C>T	p.Pro731Ser	NR	rs149830913	3	0.438	0.0007	0.000821
148	TACC1	NM_006283	c.1976C>T	p.Thr659Ile	NR	rs934392598	3	0.107	NR	NR
187	TAF4	NM_003185	c.973G>T	p.Val325Phe	NR	NR	3	0.057	NR	0.002924
2353	TAF4	NM_003185	c.1135A>G	p.Met379Val	NR	rs578126552	3	0.051	0.0002	0.000826
1918	TAL1	NM_001287347	c.262G>A	p.Val88Met	NR	rs769973350	3	0.576	0.0007	0.002568
2344	TAL1	NM_001287347	c.262G>A	p.Val88Met	NR	rs769973350	3	0.576	0.0007	0.002568
2284	TAL1	NM_001287347	c.395C>G	p.Pro132Arg	NR	rs886951676	3	0.411	0	NR
2554	TAL1	NM_001287347	c.697A>G	p.Met233Val	NR	NR	3	0.713	NR	NR
1	TAOK1	NM_025142	c.2317C>T	p.His773Tyr	NR	NR	3	0.243	0.00398	NR
2272	TBP	NM_003194	c.216_217insG	p.Gln72fs	NR	NR	3	SP	0.002	NR
2353	TBRG1	NM_032811	c.617A>G	p.His206Arg	NR	rs189473082	3	0.889	0.0751	NR
2104	TCEA1	NM_006756	c.464G>C	p.Gly155Ala	NR	rs200590980	3	0.122	0.0017	0.001642
2179	TCF3	NM_003200	c.511A>C	p.Lys171Gln	NR	NR	3	0.27	NR	NR
148	TCF7L2	NM_001146274	c.607G>A	p.Glu203Lys	NR	rs965385818	3	0.441	0.00805	NR
2554	TERT	NM_198253	c.3116C>T	p.Thr1039Met	VUS	rs763381198	3	0.185	0.00804	NR
2329	TET1	NM_030625	c.4591G>A	p.Asp1531Asn	NR	rs144272090	3	0.368	0.0003	NR
2104	TEX15	NM_001350162	c.614A>C	p.Asn205Thr	NR	rs77311674	3	SP	0.0004	NR
2353	TG	NM_003235	c.2560C>T	p.Arg854Trp	VUS	rs202196940	3	0.134	0.0002	0.001642
148	TIAM1	NM_003253	c.3625G>A	p.Ala1209Thr	NR	rs201843661	3	0.098	0.0001	0.000821
2200	TIAM1	NM_003253	c.109C>T	p.Arg37Trp	NR	rs776137189	3	0.336	0.0000199	NR
187	TLX1	NM_005521	c.254C>G	p.Pro85Arg	NR	NR	3	0.188	NR	NR
2329	TLX1	NM_005521	c.194C>T	p.Ala65Val	NR	rs753834322	3	0.234	0.0396	NR
2284	TNFRSF10B	NM_003842	c.1232A>G	p.Glu411Gly	NR	rs564770528	3	0.275	NR	NR
2421	TPGS2	NM_001271953	c.681A>C	p.Lys227Asn	NR	rs557372361	3	SP	0.0002	NR
2302	TRIP13	NM_004237	c.451G>A	p.Asp151Asn	NR	rs749716330	3	0.302	0.00000398	NR
1	TTK	NM_003319	c.323G>C	p.Ser108Thr	NR	NR	3	0.404	NR	NR
527	TTK	NM_003318	c.323G>C	p.Ser108Thr	NR	NR	3	0.403	NR	NR
2302	TTK	NM_003320	c.323G>C	p.Ser108Thr	NR	NR	3	0.405	NR	NR
2344	TTK	NM_003321	c.323G>C	p.Ser108Thr	NR	NR	3	0.406	NR	NR
2200	TXK	NM_003328	c.85C>G	p.Gln29Glu	NR	rs140295228	3	0.041	0.00000798	NR

1342	TYK2	NM_003331	c.256C>A	p.Pro86Thr	VUS	rs141466711	3	0.076	0.0557	NR
2001	TYK2	NM_003331	c.602C>T	p.Pro201Leu	VUS	rs752615354	3	0.064	0.00796	NR
187	TYRO3	NM_006293	c.1491C>G	p.Ser497Arg	NR	NR	3	0.434	NR	NR
1439	USP6	NM_001304284	c.532G>T	p.Glu178fs	NR	NR	3	SP	NR	NR
1439	USP6	NM_001304284	c.3565A>T	p.Lys1189fs	NR	rs200143577	3	SP	0.0014	0.007389
2272	VAV1	NM_005428	c.1588A>G	p.Lys530Glu	NR	NR	3	0.41	NR	NR
527	VAV2	NM_001134398	c.1513G>C	p.Glu505Gln	NR	rs140877645	3	0.553	0.0837	0.000821
527	VAV3	NM_006113	c.1577C>T	p.Ser526Phe	NR	rs769529524	3	0.26	0.0000279	0.000821
2329	VAV3	NM_006113	c.19T>G	p.Cys7Gly	NR	rs146244286	3	0.753	0.0003	0.001642
1	VWA2	NM_001272046	c.1924G>A	p.Gly642Arg	NR	rs10082357	3	0.917	0.0016	0.004926
2344	VWA2	NM_001272046	c.1397G>T	p.Arg466Leu	NR	rs146262074	3	0.175	0.0001	NR
2349	VWA2	NM_001272046	c.206G>T	p.Arg69Met	NR	rs149309552	3	0.591	0.0021	0.001642
2200	WDR48	NM_020839	c.878A>G	p.Glu293Gly	NR	rs766524631	3	0.422	0.00000398	NR
2272	WIF1	NM_007191	c.1136G>T	p.Trp379Leu	NR	rs140474921	3	0.508	0.0002	0.000821
2302	WIPF1	NM_001375834	c.473G>A	p.Arg158Lys	VUS	rs148175242	3	0.032	0.0004	0.000821
148	WWP1	NM_007013	c.650C>T	p.Pro217Leu	NR	rs144084001	3	0.189	0.0955	0.001642
2179	WWP1	NM_007013	c.2220G>C	p.Lys740Asn	NR	rs144060832	3	0.486	0.0005	NR
1153	XRCC1	NM_006297	c.1844dupG	p.Cys615fs	NR	rs773401514	3	SP	0.000119	NR
1153	XRCC5	NM_021141	c.1123G>T	p.Val375Phe	NR	rs192418356	3	0.382	0.036	NR
333	XRCC6	NM_001469	c.809C>T	p.Ser270Phe	NR	NR	3	0.258	NR	NR
1757	XRN1	NM_001282857	c.1241A>G	p.Asp414Gly	NR	rs201934622	3	0.077	0.0002	NR
2421	YAF2	NM_001190979	c.163T>G	p.Phe55Val	NR	rs200164207	3	0.071	0.0006	NR
2279	ZFH3	NM_006885	c.5699A>C	p.Glu1900Ala	NR	rs200008447	3	0.256	0.0318	NR
2554	ZFH3	NM_006885	c.10693G>A	p.Ala3565Thr	NR	rs778895240	3	0.459	0.0239	0.001642

Legenda: HGVS = *Human Genome Variant Society*; dbSNP = *Single Nucleotide Polymorphism database*; ACMG-AMP = *American College of Medical Genetics and Genomics – Association of Molecular Pathology*; FA = Frequência alélica; NR = Não reportada; PB = provavelmente benigna; B = Benigna; PP = Provavelmente patogênica; SP = Sem predição; ICP = Interpretação conflitante de patogenicidade; VUS = Variante de significado clínico incerto (do inglês, *variant of uncertain significance*).

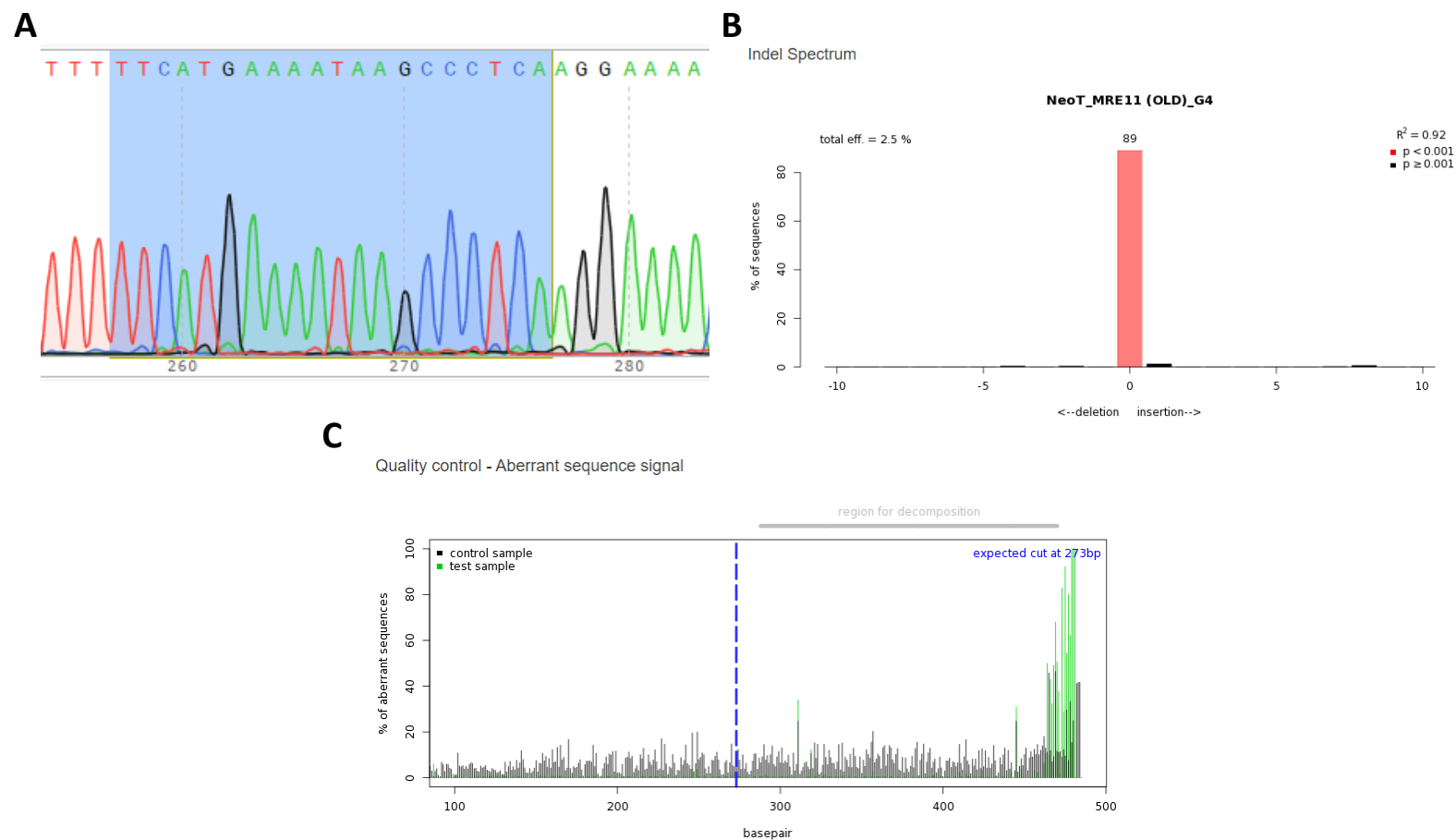
## Anexo 4

### Anexo 4A - Análise de deleção da sequência reconhecida pelo gRNA 2 em *MRE11* no clone MRE11 OLD da linhagem MCF10AneoT



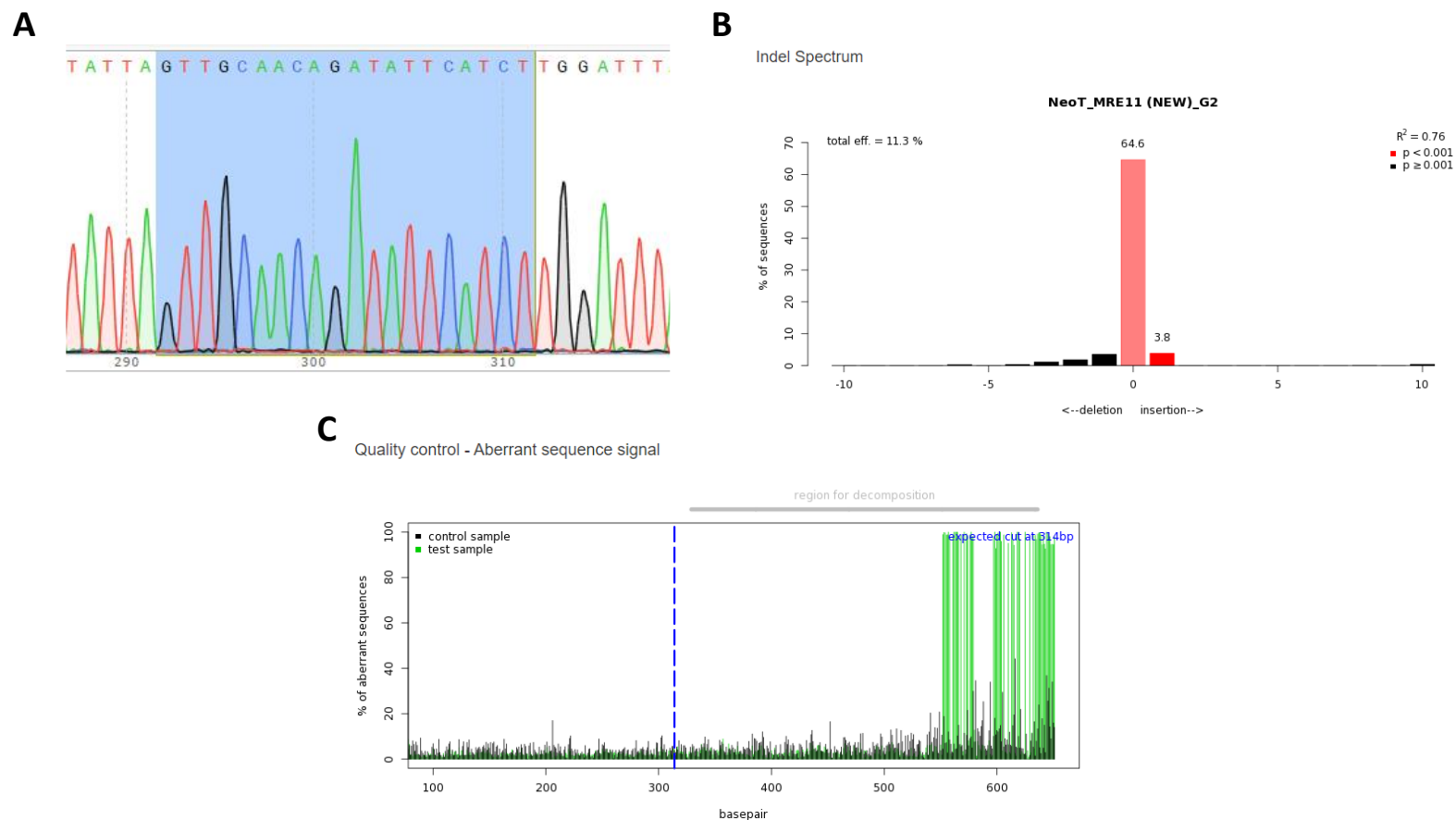
**A** – Eletroferograma da região sequenciada. Destacado em azul a sequência alvo que deveria ter sido deletada. **B** – Análise do espectro de inserções e deleções do clone MRE11 OLD comparado à linhagem MCF10AneoT parental. **C** – Controle de qualidade de porcentagem de similaridade entre o clone MRE11 OLD e a linhagem MCF10AneoT parental. Em tracejado azul está o local onde a deleção deveria ocorrer. Em cinza está destacada a sequência após o local de deleção, onde teríamos o marco de leitura alterado.

### Anexo 4B - Análise de deleção da sequência reconhecida pelo gRNA 4 em *MRE11* no clone MRE11 OLD da linhagem MCF10AneoT



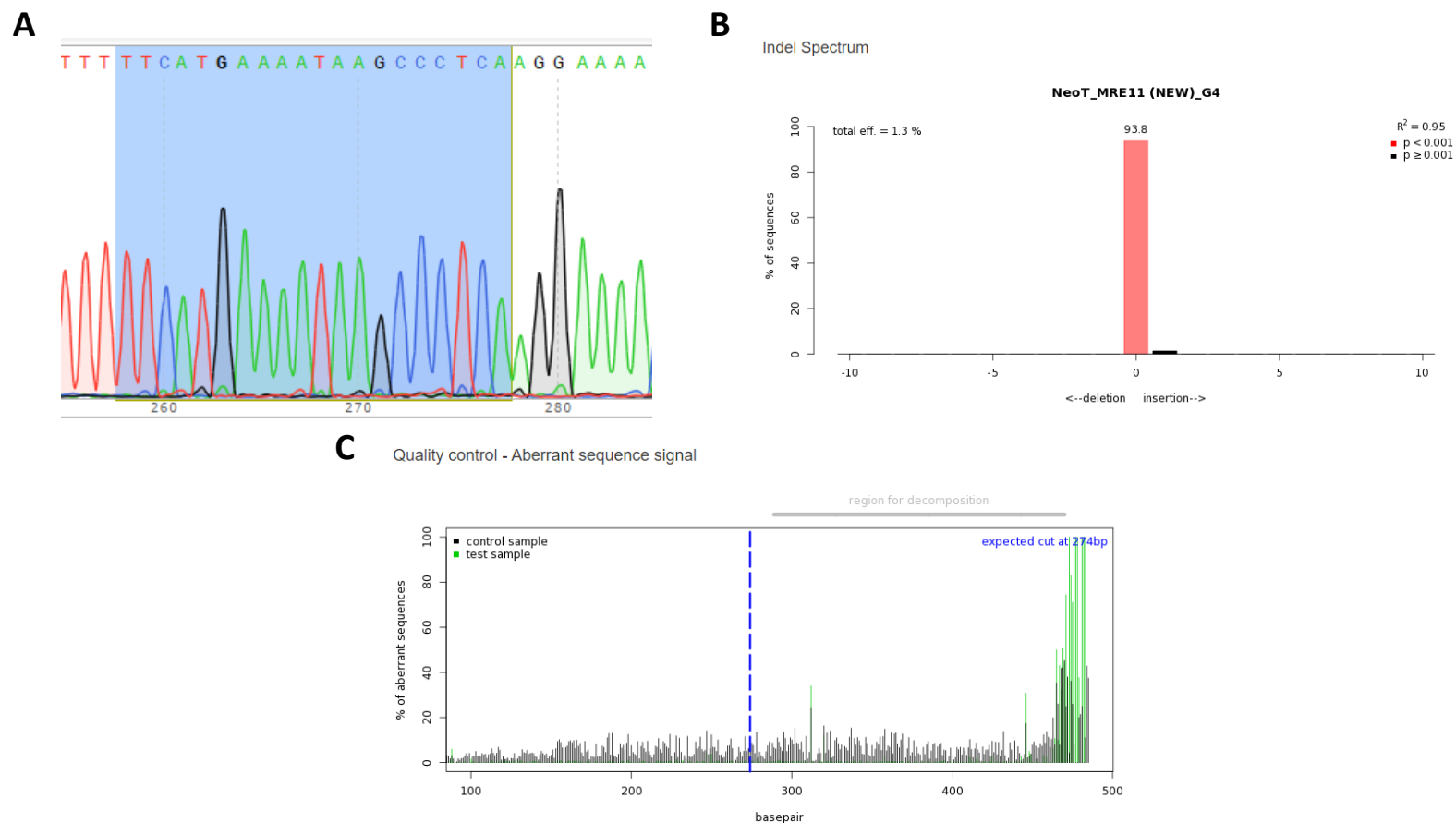
**A** – Eletroferograma da região sequenciada. Destacado em azul a sequência alvo que deveria ter sido deletada. **B** – Análise do espectro de inserções e deleções do clone MRE11 OLD comparado à linhagem MCF10AneoT parental. **C** – Controle de qualidade de porcentagem de similaridade entre o clone MRE11 OLD e a linhagem MCF10AneoT parental. Em tracejado azul está o local onde a deleção deveria ocorrer. Em cinza está destacada a sequência após o local de deleção, onde teríamos o marco de leitura alterado.

### Anexo 4C - Análise de deleção da sequência reconhecida pelo gRNA 2 em *MRE11* no clone MRE11 NEW da linhagem MCF10AneoT



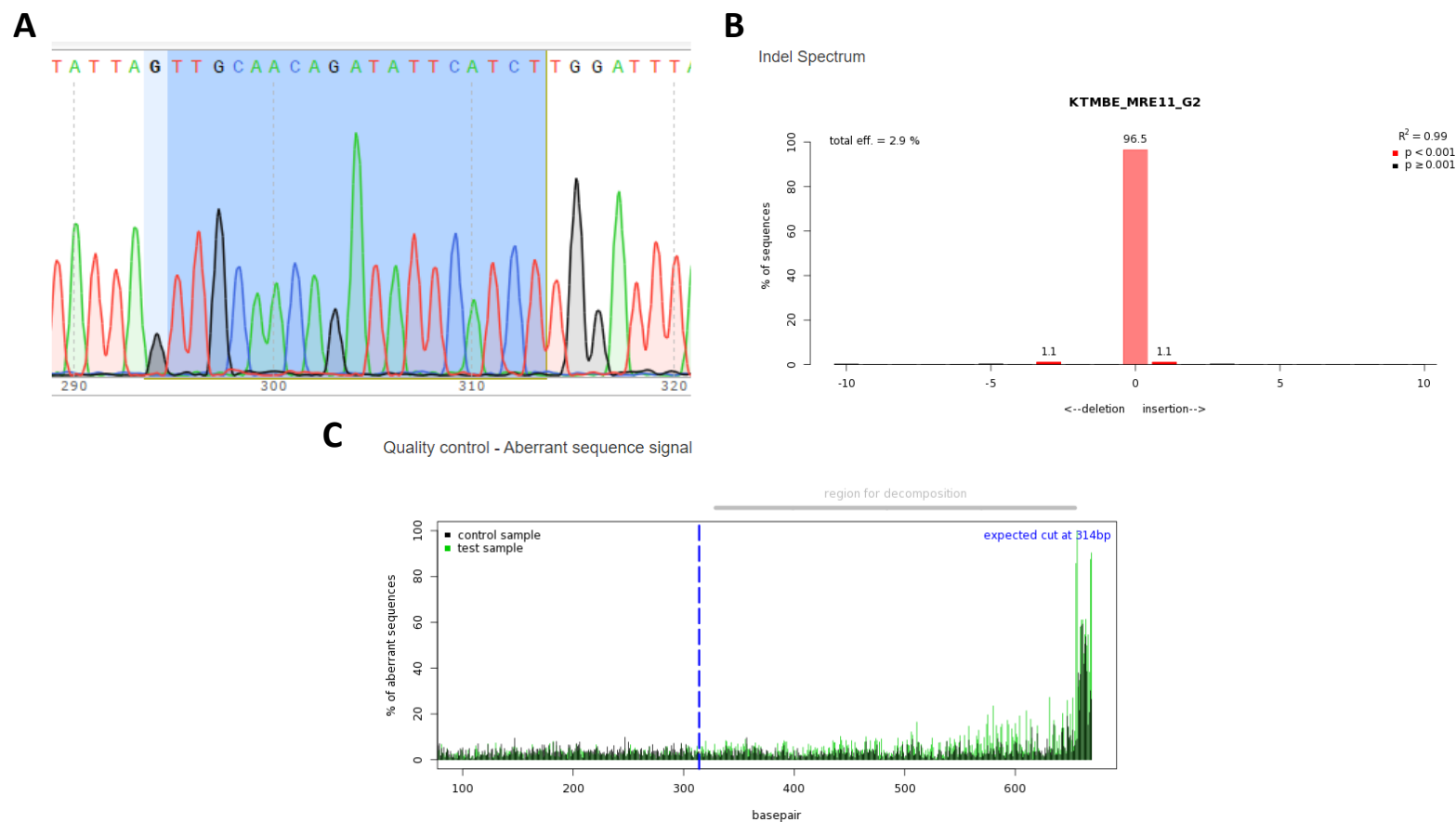
**A** – Eletroferograma da região sequenciada. Destacado em azul a sequência alvo que deveria ter sido deletada. **B** – Análise do espectro de inserções e deleções do clone MRE11 NEW comparado à linhagem MCF10AneoT parental. **C** – Controle de qualidade de porcentagem de similaridade entre o clone MRE11 NEW e a linhagem MCF10AneoT parental. Em tracejado azul está o local onde a deleção deveria ocorrer. Em cinza está destacada a sequência após o local de deleção, onde teríamos o marco de leitura alterado.

### Anexo 4D - Análise de deleção da sequência reconhecida pelo gRNA 4 em *MRE11* no clone MRE11 NEW da linhagem MCF10AneoT



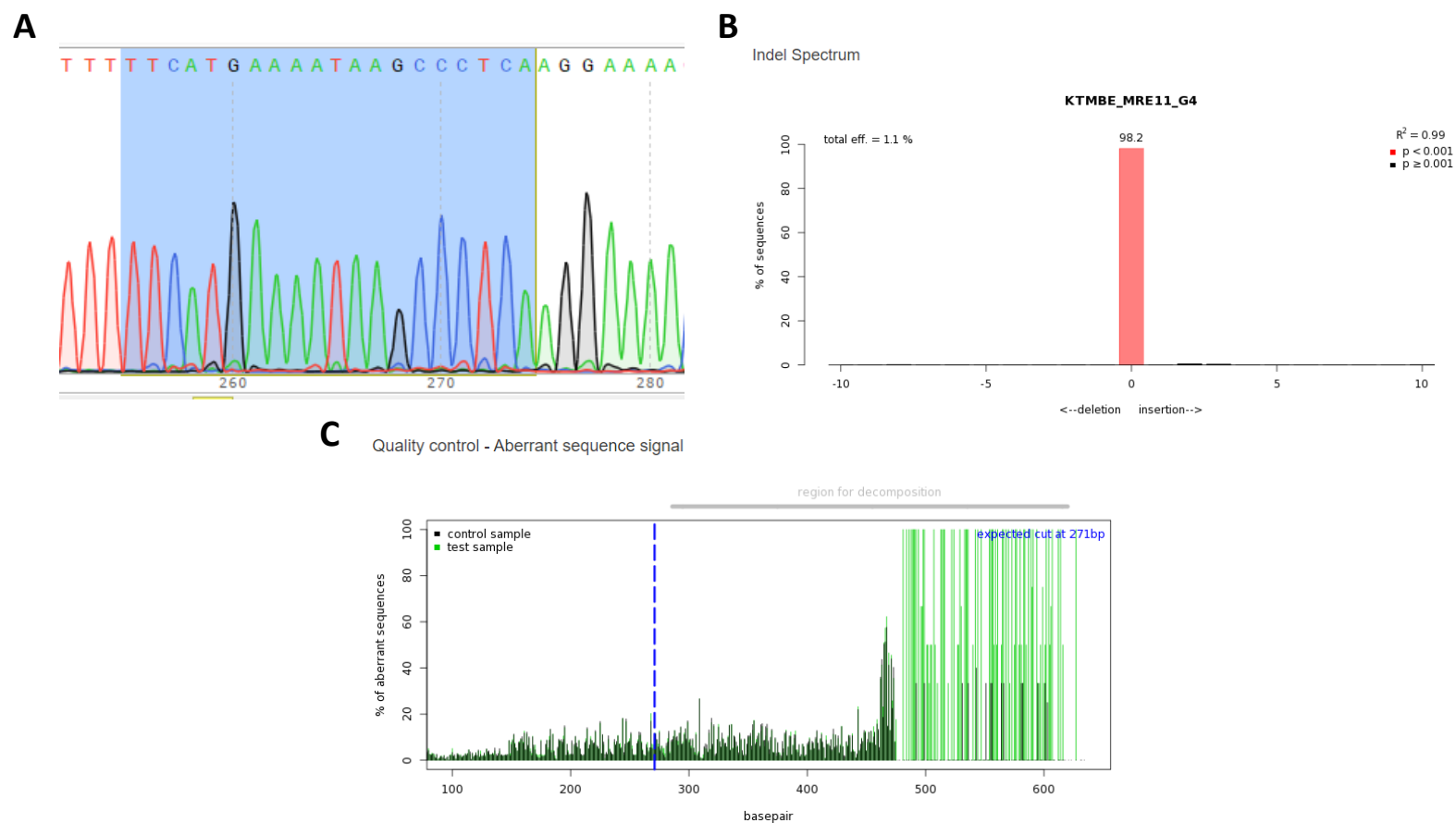
**A** – Eletroferograma da região sequenciada. Destacado em azul a sequência alvo que deveria ter sido deletada. **B** – Análise do espectro de inserções e deleções do clone MRE11 NEW comparado à linhagem MCF10AneoT parental. **C** – Controle de qualidade de porcentagem de similaridade entre o clone MRE11 NEW e a linhagem MCF10AneoT parental. Em tracejado azul está o local onde a deleção deveria ocorrer. Em cinza está destacada a sequência após o local de deleção, onde teríamos o marco de leitura alterado.

## Anexo 4E - Análise de deleção da sequência reconhecida pelo gRNA 2 em *MRE11* no clone MRE11 da linhagem KTMBE



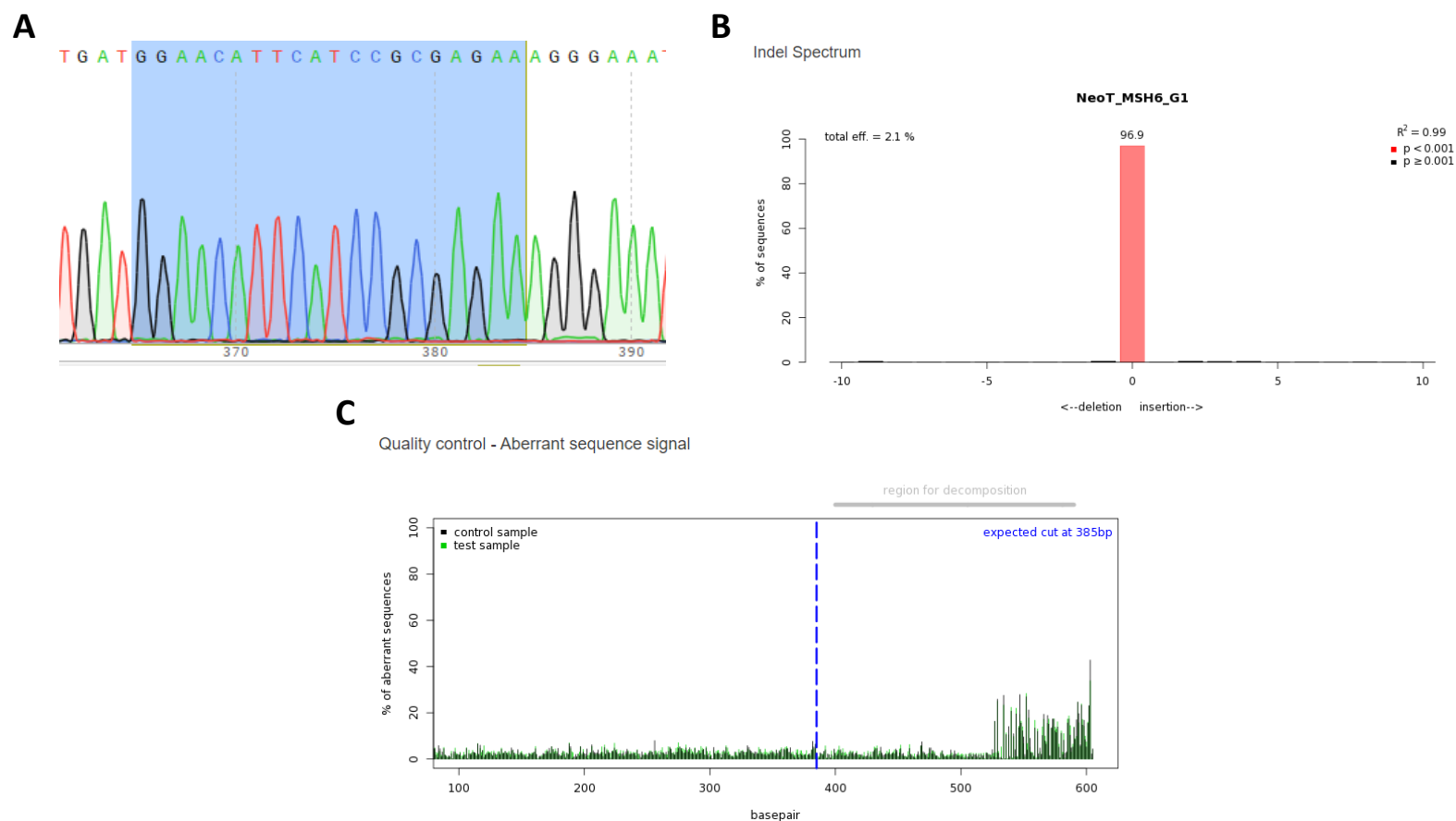
**A** – Eletroferograma da região sequenciada. Destacado em azul a sequência alvo que deveria ter sido deletada. **B** – Análise do espectro de inserções e deleções do clone MRE11 comparado à linhagem KTMBE parental. **C** – Controle de qualidade de porcentagem de similaridade entre o clone MRE11 e a linhagem KTMBE parental. Em tracejado azul está o local onde a deleção deveria ocorrer. Em cinza está destacada a sequência após o local de deleção, onde teríamos o marco de leitura alterado.

### Anexo 4F - Análise de deleção da sequência reconhecida pelo gRNA 4 em *MRE11* no clone MRE11 da linhagem KTMBE



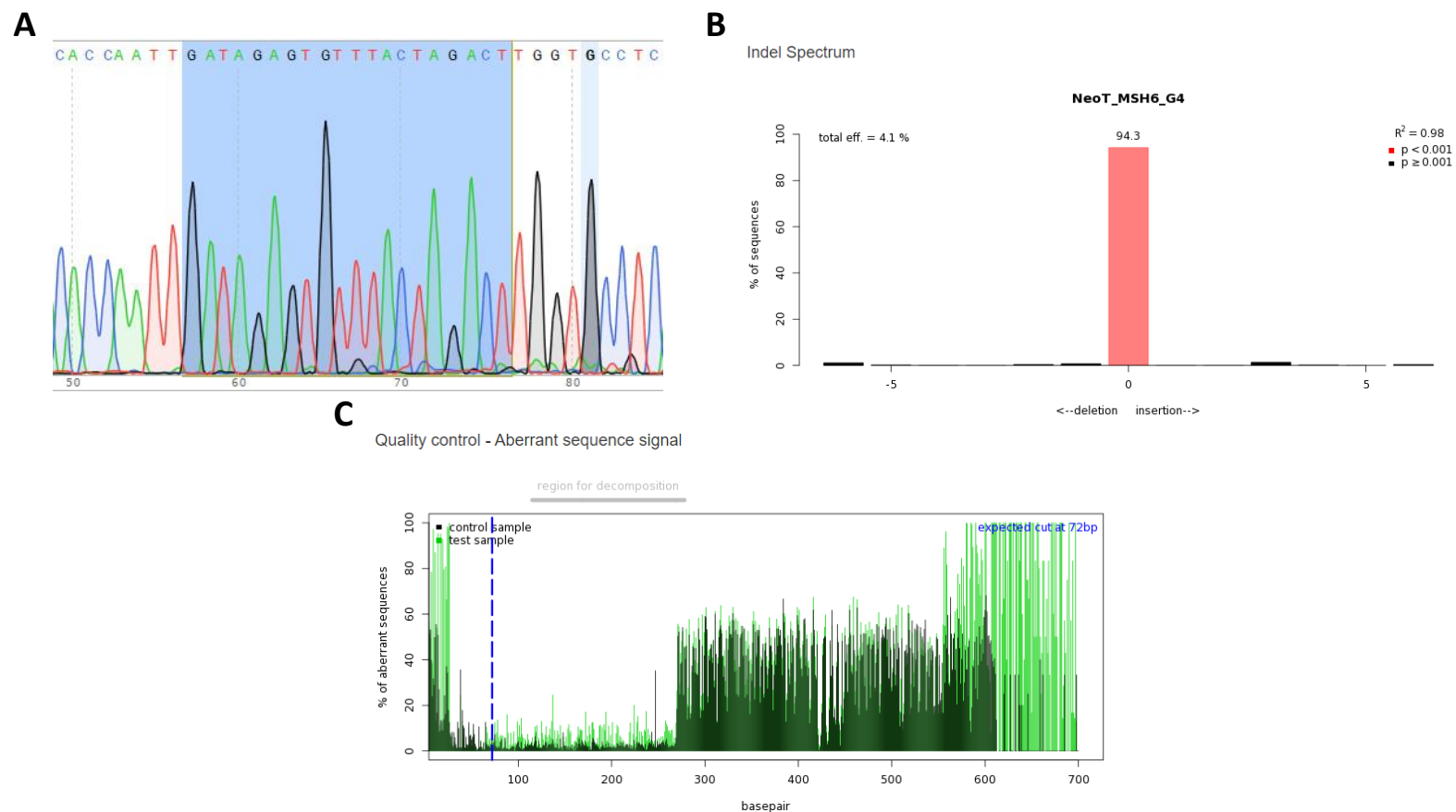
**A** – Eletroferograma da região sequenciada. Destacado em azul a sequência alvo que deveria ter sido deletada. **B** – Análise do espectro de inserções e deleções do clone MRE11 comparado à linhagem KTMBE parental. **C** – Controle de qualidade de porcentagem de similaridade entre o clone MRE11 e a linhagem KTMBE parental. Em tracejado azul está o local onde a deleção deveria ocorrer. Em cinza está destacada a sequência após o local de deleção, onde teríamos o marco de leitura alterado.

## Anexo 4G - Análise de deleção da sequência reconhecida pelo gRNA 1 em *MSH6* no clone MSH6 da linhagem MCF10AneoT



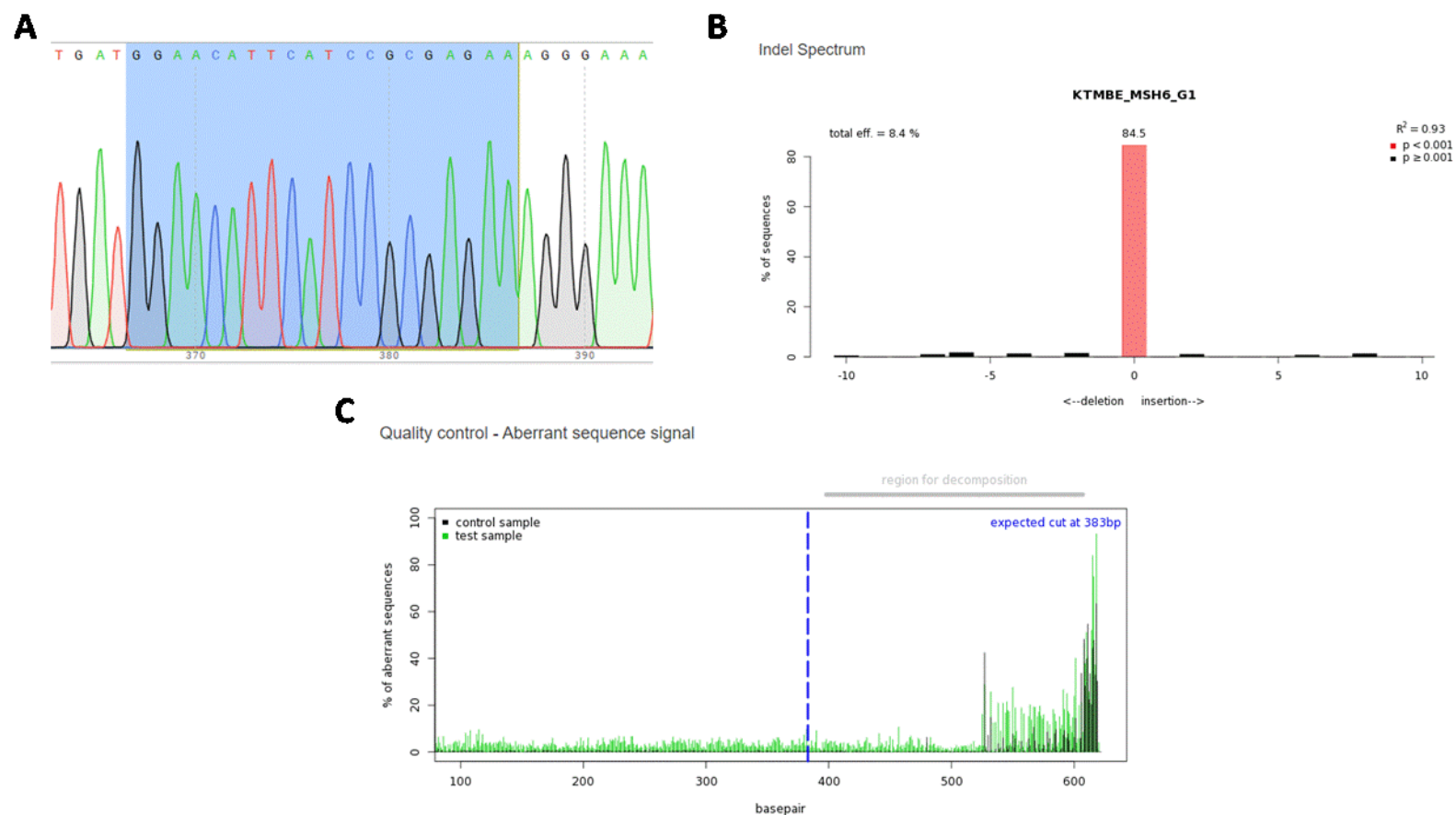
**A** – Eletroferograma da região sequenciada. Destacado em azul a sequência alvo que deveria ter sido deletada. **B** – Análise do espectro de inserções e deleções do clone MSH6 comparado à linhagem MCF10AneoT parental. **C** – Controle de qualidade de porcentagem de similaridade entre o clone MSH6 e a linhagem MCF10AneoT parental. Em tracejado azul está o local onde a deleção deveria ocorrer. Em cinza está destacada a sequência após o local de deleção, onde teríamos o marco de leitura alterado.

## Anexo 4H - Análise de deleção da sequência reconhecida pelo gRNA 4 em *MSH6* no clone MSH6 da linhagem MCF10AneoT



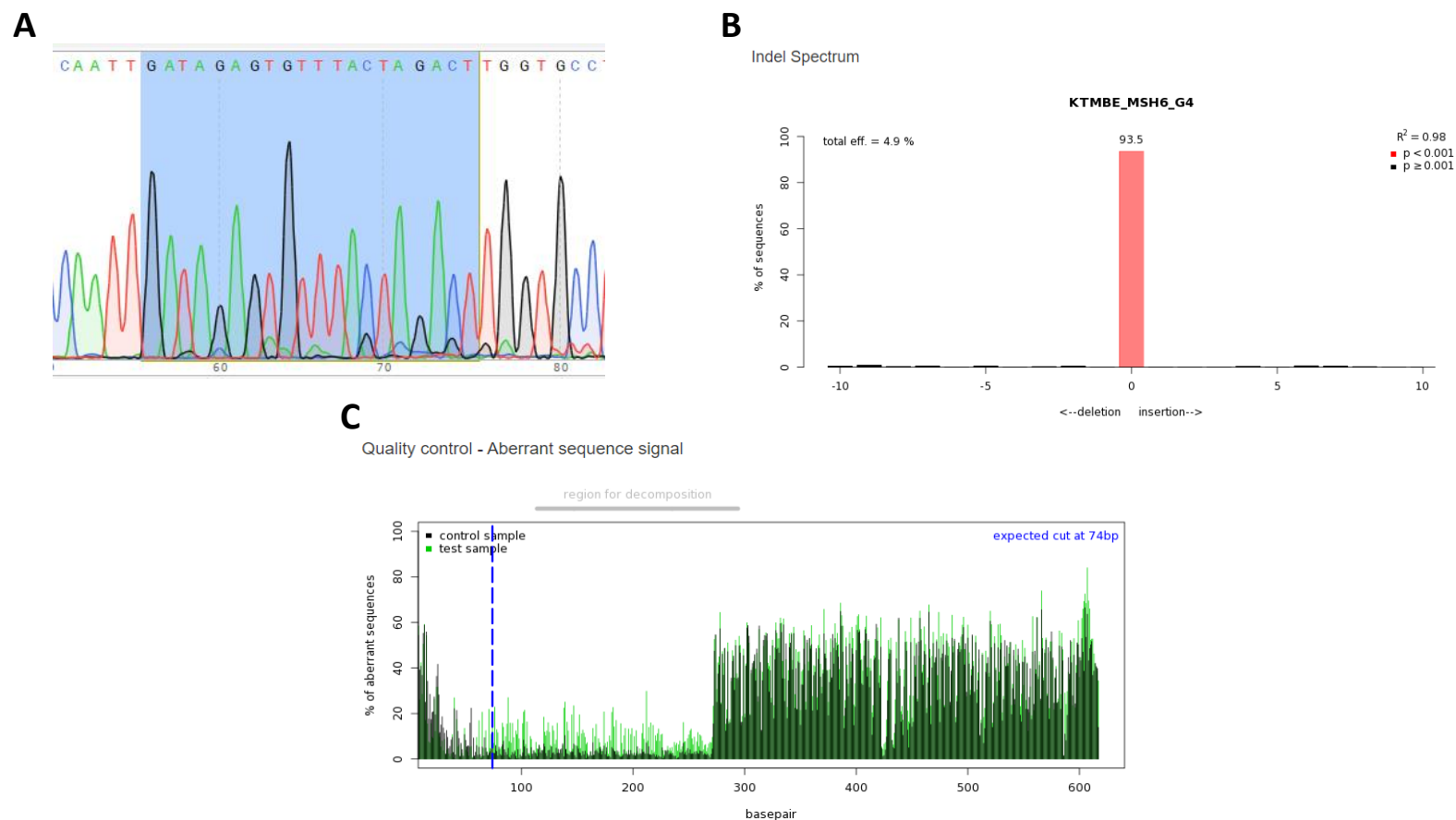
**A** – Eletroferograma da região sequenciada. Destacado em azul a sequência alvo que deveria ter sido deletada. **B** – Análise do espectro de inserções e deleções do clone MSH6 comparado à linhagem MCF10AneoT parental. **C** – Controle de qualidade de porcentagem de similaridade entre o clone MSH6 e a linhagem MCF10AneoT parental. Em tracejado azul está o local onde a deleção deveria ocorrer. Em cinza está destacada a sequência após o local de deleção, onde teríamos o marco de leitura alterado.

## Anexo 4I - Análise de deleção da sequência reconhecida pelo gRNA 1 em *MSH6* no clone MSH6 da linhagem KTMBE



**A** – Eletroferograma da região sequenciada. Destacado em azul a sequência alvo que deveria ter sido deletada. **B** – Análise do espectro de inserções e deleções do clone MSH6 comparado à linhagem KTMBE parental. **C** – Controle de qualidade de porcentagem de similaridade entre o clone MSH6 e a linhagem KTMBE parental. Em tracejado azul está o local onde a deleção deveria ocorrer. Em cinza está destacada a sequência após o local de deleção, onde teríamos o marco de leitura alterado.

## Anexo 4J - Análise de deleção da sequência reconhecida pelo gRNA 1 em *MSH6* no clone MSH6 da linhagem KTMBE



**A** – Eletroferograma da região sequenciada. Destacado em azul a sequência alvo que deveria ter sido deletada. **B** – Análise do espectro de inserções e deleções do clone MSH6 comparado à linhagem KTMBE parental. **C** – Controle de qualidade de porcentagem de similaridade entre o clone MSH6 e a linhagem KTMBE parental. Em tracejado azul está o local onde a deleção deveria ocorrer. Em cinza está destacada a sequência após o local de deleção, onde teríamos o marco de leitura alterado.