

**CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO:  
RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NOS GENES  
BRCA1 E BRCA2 E BUSCA DE NOVOS GENES DE  
SUSCEPTIBILIDADE**

**MÁRCIA CRISTINA PENA FIGUEIREDO**

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente  
para a obtenção do título de Doutor em Ciências  
Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra Dirce Maria Carraro**

**São Paulo**

**2014**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Figueiredo, Márcia Cristina Pena

**Câncer de mama hereditário: rastreamento de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 e busca de novos genes de susceptibilidade** / Márcia Cristina Pena Figueiredo – São Paulo; 2014.

117p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. NEOPLASIAS DA MAMA. 2. SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS EM LARGA ESCALA. 3. GENE BRCA1. 4. GENE BRCA2. 4. SÍNDROME HEREDITÁRIA DE CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO.

## ***Versos de Reflexão***

*são frutos da experiência,  
da leitura, da pesquisa,  
das ideias de influência,  
constituindo um acervo,  
da mais alta consistência.*

*Refleta sobre o que fez,  
procurando melhorar,  
no presente e no futuro,  
que há tempo para mudar,  
agradaça sempre a Deus,  
ter força para caminhar.*

*O que tanto se deseja  
é possível acontecer,  
mas precisa acreditar  
no melhor para receber,  
criando oportunidades,  
para que possa merecer.*

*Espere o momento certo,  
para tomar decisão,  
não dê margem ao desespero,  
nem à precipitação.*

*Ao tomar uma decisão,  
pense cuidadosamente,  
se zombarem dos seus sonhos,  
afirme-se competente,  
acredite em você mesmo,  
que você é inteligente.*

*Esperança e otimismo,  
coragem e vitalidade,  
ação, trabalho e progresso,  
perseverança e vontade,  
firmeza e todas virtudes,  
são uma necessidade.*

*Suportar provocações  
não é sinal de fraqueza,  
mas de fé, compreensão,  
coragem, força e firmeza,  
aprendizagem e humildade,  
confiança e fortaleza.*

*A filosofia ensina,  
que o homem é aquilo que pensa,  
mentalize a saúde,  
a serenidade e vença,  
sinta-se firme e capaz,  
que a sua força é imensa.*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Dirce Maria Carraro pela oportunidade, incentivo e aprendizado.

Aos pacientes e familiares que permitiram a realização deste trabalho de pesquisa.

À Dra. Erika Maria Monteiro Santos, ao Dr. Benedito Mauro Rossi e ao Dr. Samuel Aguiar Junior, pelo suporte e fornecimento dos dados clínicos dos pacientes.

À Dra Ana Krepischi, pela atenção, incentivo e ensinamentos nos ensaios de aCGH.

Ao Departamento de Oncogenética, em especial a Dra. Maria Isabel Achatz e Amanda França de Nóbrega, pela dedicação aos pacientes e auxílio na coleta dos dados referentes ao histórico familiar de cada paciente, os quais foram fundamentais neste trabalho.

À minha banca de acompanhamento, Dra. Silva Rogatto, obrigada pelas sugestões e considerações.

Aos amigos do Laboratório, Adriana, Ana Paula, Andréa, Bruna, Claudia, Daiana, Danielle, Felipe, Elisa, Eloisa, Giovana, Louise, Mabel, Rafael, Roberto, Tatiana e Vanina.

Em especial ao Felipe e Bianca e pela imensa contribuição neste projeto e à Bruna, Elisa, Giovana e Andréa pelo apoio e disponibilidade em me acompanhar nos experimentos.

A todos do Laboratório de Bioinformática do A.C.Camargo Cancer Center, em especial ao Renan Valieris, Dr. Jorge Estefano S. de Souza e Dr. Sandro de Souza Jorge, pela assistência e colaboração.

Ao Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE) do A.C.Camargo Cancer Center por ter me oferecido toda estrutura para que o projeto fosse desenvolvido.

A todos os alunos, funcionários e pesquisadores do CIPE.

Ao Departamento de Pós-Graduação, em especial Ana Maria, Luciane e Vanuza pela paciência com os alunos.

À Suely Francisco, pela ajuda e apoio na revisão desta tese.

À CAPES e à FAPESP, pelo suporte financeiro.

Agradeço a Deus acima de tudo, por guiar em todos meus caminhos e por me fortalecer nos momentos difíceis.

Ao Marcos, companheiro em todos os momentos, obrigada por fazer parte da minha vida.

Aos meus pais, João e Vera, pelo incentivo incondicional e por acreditarem em mim por compreender meu esforço e dedicação pela educação.

Aos meus irmãos, Luciana e Welington, pelo apoio concedido em todos os momentos da minha vida.

A toda minha família, por compreenderem meus dias ausentes do seu convívio, pelo tempo dedicado à elaboração deste trabalho.

Ao meu sogro, Cid que me incentivou torcendo sempre pelo meu sucesso.

Às minhas queridas amigas Cristiane, Fátima, Marina e Vanessa pela amizade e companheirismo.

A todos os amigos que sempre torceram por mim em especial, a Flávia, Claudia, Sally, Walmir, Tarcísio, Sr. Zé, Chiquinha, Izildinha, Ramon e Mirian por acreditarem em mim, pela paciência, pelas palavras de carinho e incentivo nos momentos difíceis.

## RESUMO

Figueiredo MCP. **Câncer de mama hereditário: rastreamento de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e busca de novos genes de susceptibilidade.** São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O Câncer de Mama Hereditário (HBC) é uma doença autossômica dominante caracterizada, principalmente, por mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* que conferem alto risco em desenvolver câncer de mama e ovário. A identificação da causa genética responsável pelo aumento de risco em mulheres com critérios clínicos para HBC é extremamente importante para o manejo das mesmas. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar mutações pontuais germinativas e alterações no número de cópias (CNV) nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em 128 famílias brasileiras, as quais preencheram os seguintes critérios para HBC: 108 para Câncer de Mama e Ovário Hereditário (HBOC), 20 para Câncer de Mama e Colón Hereditário (HBOC), sendo que 32 preencheram critérios clínicos para ambos. Amostras de DNA de sangue periférico foram utilizadas para avaliar a presença de mutações germinativas através do sequenciamento completo dos genes *BRCA1* e *BRCA2* nas sequências codificadoras e limites éxon-íntron e também verificar as mutações pontuais nos genes *TP53* (R337H) e *CHEK2* (1100delC). Os pacientes não portadores de mutações nos genes *BRCA1/2* foram selecionados para análise de MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) para avaliar as CNVs nestes genes. A prevalência de mutações patogênicas neste estudo foi de 25% (32/128), incluindo 21 no *BRCA1* (2 *splice site*, 2 *missense*, 9 *frameshift*, 6 *nonsense* e 2 CNVs), 7 no *BRCA2* (3 *frameshift* e 4 *nonsense*), 3 no *TP53* (3 *missense*) e uma no gene *CHEK2* (1100delC). Sete (25% - 7/28) das mutações patogênicas identificadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foram descritas pela primeira vez neste estudo, cinco no gene *BRCA1*, incluindo uma nova mutação no sítio de *splice* no *BRCA1*, cuja patogenicidade foi confirmada através da análise do transcrito; e duas no gene *BRCA2*. Dentre os portadores de VUS nestes genes, 18 variantes foram distintas e duas delas foram descritas pela primeira vez. As análises das VUS pelos três algoritmos de predição de patogenicidade das proteínas (Polyphen, SIFT e GVG-Align) mostraram que sete variantes foram classificadas como

provavelmente patogênicas, em pelo menos um deles (quatro em um algoritmo, dois em dois algoritmos e um em todos os três algoritmos). Em nosso estudo, nós detectamos duas alterações no número de cópias (2%) no gene *BRCA1* nos pacientes HBOC. Uma das alterações foi uma amplificação no éxon 24 no gene *BRCA1*, nunca anteriormente relatada, confirmada pela análise de *array*-CGH e duplex PCR quantitativa. Nossos resultados mostraram que mutações no gene *BRCA1* (75%) são mais prevalentes do que no *BRCA2* (25%) na população brasileira. Em resumo, nós relatamos uma análise abrangente das bases, clínica e genética, das famílias HBC no Brasil, da qual revelou-se altamente complexa. Para a detecção de novos genes de alto risco para câncer de mama, nós utilizamos o sequenciamento do exoma em 17 casos de câncer de mama que apresentaram histórico familiar bem caracterizado e que não eram portadores de mutações nas regiões codificantes e sítios de *splice* dos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* e na mutação pontual do gene *CHEK2* (1100delC). Além disso, incluímos 5 probandos portadores de mutações nos genes *BRCA1*, como grupo controle, para filtrar as variantes genéticas comuns que provavelmente não estão associadas ao risco do câncer de mama. O sequenciamento do exoma foi realizado com as plataformas SOLiD 5500 e Ion Proton. Uma média de 1.092 variações de nucleotídeos (SNVs) (mínimo 284 e máximo 2.051) e 15 INDELS (mínimo 8 e máximo 20) foram detectadas para cada paciente. Para filtragem das alterações encontradas, nós selecionamos as variantes genéticas (SNVs e INDELS) exclusivamente identificadas no grupo das pacientes e não nos controles. Considerando todas as 17 pacientes, foram identificadas 3.130 SNVs na sequência codificadora: 2.964 *non-synonymous*, 107 *nonsense*, 56 sítio de *splice* nas extremidades 3' ou 5', 3 *stop codons* e 77 Indels: 74 *frameshift* e 3 sítio de *splice* na extremidade 3'. Primeiramente, nós focamos nas alterações encontradas nas duas irmãs diagnosticadas com câncer de mama, as quais apresentaram 59 alterações em comum, sendo que uma delas, encontrada no gene *ERBB2* parece ser um potencial candidato para gene de susceptibilidade ao câncer de mama. Adicionalmente, as análises de outras 15 pacientes revelaram alterações germinativas em genes envolvidos na via de reparo do DNA de dupla fita, entre eles: *ATM*, *ATRX*, *BARD1*, *FANCD2*, *FANCE* e *TOPBP1* que possivelmente podem estar associados com a predisposição genética para o câncer de mama.

## SUMMARY

Figueiredo MCP. [**Hereditary breast cancer: screening for mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes and search for new susceptibility genes**]. São Paulo; 2014. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Hereditary Breast Cancer (HBC) is an autosomal dominant disease mainly characterized by germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes that confer high risk for developing breast and ovarian cancer. The identification of high-risk women carrying mutations responsible for the disease is extremely important for their management. Thus, the aim of this study was to evaluate germline mutations and copy number variations (CNVs), in *BRCA1* and *BRCA2* in 128 Brazilian families, who met the following criteria for HBC: 108 for Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC) and 20 for Hereditary Breast and Colon Cancer (HBCC). Thirty two patients met clinical criteria for both syndromes. DNA samples from peripheral blood were used to assess the presence of germline mutations by capillary sequencing of the entire coding sequence of *BRCA1* and *BRCA2* genes, exon - intron boundaries, as well as *TP53* (R337H) and *CHEK2* (1100delC) variants. Patients who did not carry mutations in the *BRCA1/2* genes were selected for MLPA analysis (multiplex ligation-dependent probe amplification) to assess CNVs in these genes. The prevalence of pathogenic mutations in this study were 25 % (32 /128) , including 21 in *BRCA1* (2 splice site, 2 missense, 9 frameshift, 6 nonsense and 2 CNVs), 7 *BRCA2* (3 nonsense and 4 frameshift ), 3 in *TP53* (3 missense) and one in *CHEK2* gene. Seven (25 % - 7/28) out of 28 pathogenic mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes were first described in this study, of which five were in the *BRCA1*, including a novel splice site mutation, whose pathogenicity was confirmed by transcript analysis and two in the *BRCA2* gene. Among the VUS carriers 18 different were found variants, where two of them were described for the first time. The analysis of the three algorithms for protein prediction of VUS ( Polyphen, SIFT and Align-GVGD) showed that seven variants have been classified as probably pathogenic in at least one of them (four in one algorithm , two in two algorithms and one in all three



algorithms). In our study, we detected two copy number variations (2%), in the *BRCA1* gene, including an exon 24 amplification, not previously reported, that were confirmed by array-CGH and duplex quantitative PCR. Our results showed that mutations in the *BRCA1* gene (75%) are more prevalent than in *BRCA2* (25%) in our population. In summary, we report a comprehensive analysis of the clinical and genetic basis of Brazilian HBC families, which reveals to be highly complex. For the identification of novel susceptibility genes in high risk breast cancer women, we performed exome sequencing in 17 breast cancer cases who presented well characterized family history of cancer and were not carriers of mutations in coding regions and splice sites of *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* genes and point mutation in *CHEK2* gene (1100delC). In addition, we included five carriers of *BRCA1* pathogenic mutations as positive controls to filter out common genetic variants probably not associated with breast cancer risk. The exome sequencing was performed with the SOLID 5500 and Ion Proton platforms. An average of 1,092 SNVs (minimum 284 and maximum 2,051) and 15 Indels (minimum 8 and maximum 20) were detected for each patient. For filtering out variants, we selected genetic variants (SNVs and Indels) uniquely identified in the group of patients and not found in controls. Considering all 17 patients, 3,130 SNVs were identified in the coding sequence: 2,964 non-synonymous, 107 nonsense, 56 splice site at the 3' or 5' end, 3 stop codons and 77 Indels: 74 frameshift and 3 splice site at the 3' end. First, we focus on the variants found in two sisters diagnosed with breast cancer, who presented 59 variants in common, including one found in *ERBB2* gene that appears to be a potential candidate gene for breast cancer susceptibility. Additionally, the analyzes of the other 15 patients showed germ line alterations in genes involved in the double-strand break repair pathway, including *ATM*, *ATRX*, *BARD1*, *FANCD2*, *FANCE* and *TOPBP1* which possibly may be associated with genetic predisposition to breast cancer.

## LISTA DE FIGURAS

|                  |  |    |
|------------------|--|----|
| <b>Figura 1</b>  | Caracterização da variante c.560T>A no sítio de splice na paciente MO-15.....  | 48 |
| <b>Figura 2</b>  | Heredograma da paciente MO-041, portadora da mutação 1100delC.....   | 50 |
| <b>Figura 3</b>  | Eletroferograma do gene <i>CHEK2</i> no éxon 10 identificou a mutação 1100delC na paciente MO-041.....   | 50 |
| <b>Figura 4</b>  | Representação esquemática dos domínios funcionais das Proteínas BRCA1 e BRCA2 com todas as mutações patogênicas e VUS identificadas.....                       | 51 |
| <b>Figura 5</b>  | Eletroferograma do gene <i>BRCA2</i> no éxon 11 identificou uma VUS (c.2578A>G; p.M784V) na paciente SM-24 e sua irmã SM-23-2.....                             | 53 |
| <b>Figura 6</b>  | Heredograma da paciente SM-24, portadora da variante de significado incerto (c.2578A>G; p.M784V).....  | 54 |
| <b>Figura 7</b>  | Eletroferograma do gene <i>BRCA2</i> no éxon 11 identificou uma VUS (c.2578A>G; p.M784V) na paciente SM-39 e sua irmã SM-39-2 não apresenta esta variante..... | 54 |
| <b>Figura 8</b>  | Heredograma da paciente SM-039, portadora da variante designificado incerto (c.2578A>G; p.M784V).....  | 55 |
| <b>Figura 9</b>  | Descrição das alterações no números de cópias.....   | 57 |
| <b>Figura 10</b> | Resultado falso positivo identificado no gene <i>BRCA2</i> pela técnica de MLPA.....   | 59 |

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Figura 11</b> | Resultado do eletroferograma do SNP identificado no <i>BRCA2</i> .....                                | 59 |
| <b>Figura 12</b> | Eletroferograma do gene <i>TP53</i> no éxon 10 identificou a mutação p.R337H na paciente SM-031.....  | 60 |
| <b>Figura 13</b> | Fluxograma representando os 2 grupos referente ao sequenciamento do exoma das amostras em estudo..... | 63 |
| <b>Figura 14</b> | Distribuição dos genes potencialmente associados com câncer de mama hereditário.....                  | 70 |
| <b>Figura 15</b> | Distribuição dos genes relacionados ao câncer.....  | 71 |
| <b>Figura 16</b> | Eletroferogramas dos genes validados pelo sequenciamento Sanger....                                   | 73 |

## LISTA DE QUADRO E TABELAS

|                  |   |    |
|------------------|---|----|
| <b>Quadro 1</b>  | Critérios de inclusão para indivíduos HBOC e HBCC.....  | 27 |
| <b>Tabela 1</b>  | As diferenças das plataformas Ion Proton e SOLiD.....   | 39 |
| <b>Tabela 2</b>  | Características moleculares e a média de idade pelo critério de inclusão dos 128 probandos..... | 45 |
| <b>Tabela 3</b>  | Mutações patogênicas nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> .....                                | 47 |
| <b>Tabela 4</b>  | Distribuição das variantes de significado desconhecido.....                                     | 52 |
| <b>Tabela 5</b>  | Análise de segregação e avaliação no grupo controle das 5 VUS selecionadas.....                 | 53 |
| <b>Tabela 6</b>  | Dados clínicos e histopatológicos das pacientes.....  | 62 |
| <b>Tabela 7</b>  | Resultados da cobertura do sequenciamento das regiões exônicas.....                             | 66 |
| <b>Tabela 8</b>  | Resultados das alterações (SNPs e Indels) encontradas nos Probandos                             | 67 |
| <b>Tabela 9</b>  | Resultados das alterações (SNPs e Indels) encontradas com filtro controle.....                  | 67 |
| <b>Tabela 10</b> | Distribuição das 59 alterações comuns encontradas nas irmãs.....                                | 68 |

## LISTA DE ABREVIACOES

|               |   |
|---------------|---|
| <b>ATM</b>    | <i>Ataxia telangiectasia mutated</i>                    |
| <b>ATR</b>    | <i>Ataxia telangiectasia and RAD3- related protein</i>  |
| <b>BARD1</b>  | <i>BRCA1- associated RING domain 1</i>                  |
| <b>BIC</b>    | <i>Breast Cancer Information Core database</i>          |
| <b>BRCA1</b>  | <i>Breast cancer 1, early onset</i>                     |
| <b>BRCA2</b>  | <i>Breast cancer 2, early onset</i>                     |
| <b>CCR</b>    | <i>Colorectal cancer</i>                                |
| <b>CDH1</b>   | <i>Cadherin 1</i>                                       |
| <b>CGH</b>    | <i>array-comparative genomic hybridization</i>          |
| <b>CHEK2</b>  | <i>Checkpoint kinase 2</i>                              |
| <b>CNVs</b>   | <i>Copy number variations</i>                           |
| <b>DNA</b>    | <i>Deoxyribonucleic acid</i>                            |
| <b>DSBs</b>   | <i>Double strand breaks</i>                             |
| <b>INDELS</b> | <i>Alteraco de inserco ou delecco</i>                |
| <b>FGFR2</b>  | <i>Fibroblast growth factor receptor 2</i>              |
| <b>FISH</b>   | <i>Fluorescent in situ Hybridisation</i>                |
| <b>GATK</b>   | <i>Genome analysis toolkit</i>                          |
| <b>HBOC</b>   | <i>Hereditary breast and ovarian cancer</i>             |
| <b>HBCC</b>   | <i>Hereditary breast and colon cancer</i>               |
| <b>HNPCC</b>  | <i>Hereditary Non Polyposis Colorectal Carcinoma</i>    |
| <b>HR</b>     | <i>Homologous Recombination</i>                         |
| <b>IARC</b>   | <i>International Agency for Research on Cancer</i>      |
| <b>LFS</b>    | <i>Li-Fraumeni syndrome</i>                             |
| <b>LFL</b>    | <i>Li-Fraumeni like</i>                                 |
| <b>LOVD</b>   | <i>Leiden Open Variation Database</i>                   |
| <b>MAP3K1</b> | <i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i> |
| <b>MDC1</b>   | <i>Mediator of DNA damage checkpoint protein1</i>       |
| <b>MLH1</b>   | <i>MutL homolog 1</i>                                   |
| <b>MLPA</b>   | <i>Multiplex ligation dependent probe amplification</i> |

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>MSH2</b>     | <i>MutS homolog 2</i>                        |
| <b>NCCN</b>     | <i>National Comprehensive Cancer Network</i> |
| <b>NGS</b>      | Sequenciamento de nova geração               |
| <b>NHEJ</b>     | <i>Non Homologous End Joining</i>            |
| <b>NSY</b>      | <i>Non-synonymous variation</i>              |
| <b>PALB2</b>    | <i>Partner and localizer of BRCA2</i>        |
| <b>PCR</b>      | <i>Polymerase chain reaction</i>             |
| <b>PMS2</b>     | <i>Postmeiotic segregation increased 2</i>   |
| <b>Polyphen</b> | <i>Polymorphism Phenotyping</i>              |
| <b>PTEN</b>     | <i>Phosphatase and tensin homolog</i>        |
| <b>RAD51</b>    | <i>RAD51 recombinase</i>                     |
| <b>SIFT</b>     | <i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>      |
| <b>SNPs</b>     | <i>Single nucleotide polymorphism</i>        |
| <b>SNVs</b>     | <i>Single nucleotide variants</i>            |
| <b>STP</b>      | <i>Stop codons</i>                           |
| <b>STK11</b>    | <i>Serine/threonine kinase 11</i>            |
| <b>TP53</b>     | <i>Tumor protein p53</i>                     |
| <b>VUS</b>      | <i>Variants of uncertain significance</i>    |

# ÍNDICE

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1      | Genes associados às síndromes hereditárias com aumento de risco para<br>câncer de mama.....                | 3         |
| 1.2      | Mutações germinativas nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> .....  | 10        |
| 1.3      | Avaliação da patogenicidade das VUS nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> .....                            | 13        |
| 1.4      | Métodos para determinação das causas genéticas associadas à predisposição<br>ao câncer de mama .....       | 14        |
| 1.5      | Aconselhamento genético .....  | 20        |
| 1.6      | Justificativa .....  | 21        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS.....</b>  | <b>23</b> |
| 2.1      | Objetivo Geral.....  | 23        |
| 2.2      | Objetivos Específicos.....   | 23        |
| <b>3</b> | <b>CASUÍSTICA E MÉTODOS.....</b>   | <b>25</b> |
| 3.1      | Casuística .....   | 25        |
| 3.2      | Métodos.....   | 27        |
| 3.2.1    | Extração do DNA genômico .....   | 27        |
| 3.2.2    | Desenho dos <i>primers</i> .....   | 28        |
| 3.2.3    | Amplificação das Sequências de DNA .....   | 29        |
| 3.2.4    | Comparação das leituras obtidas com as sequências referências.....   | 30        |
| 3.2.5    | Descrição das mutações encontradas .....   | 30        |
| 3.2.6    | Interpretação das alterações encontradas .....   | 31        |
| 3.2.7    | Análise de segregação e rastreamento nos controles normais .....   | 33        |
| 3.2.8    | Análise do transcrito .....  | 33        |
| 3.2.9    | Técnica de MLPA .....  | 34        |
| 3.3      | Validações por outras metodologias das alterações no números de cópias<br>encontrados através do MLPA..... | 36        |
| 3.3.1    | PCR de longo alcance .....   | 36        |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.3.2    | Dosagem gênica por PCR quantitativa em tempo real .....  | 37        |
| 3.3.3    | Hibridação genômica comparativa baseada em <i>arrays</i> .....   | 38        |
| 3.3.4    | Detecção de mutações por sequenciamento de nova geração.....   | 39        |
| 3.3.5    | Plataforma SOLiD.....  | 39        |
| 3.3.6    | Plataforma Ion Proton .....  | 41        |
| 3.3.7    | Análise dos resultados do SOLiD e Ion Proton .....   | 43        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>45</b> |
| 4.1      | Rastreamento dos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> por sequenciamento direto.....                        | 46        |
| 4.2      | Alterações no gene <i>BRCA1</i> não descritas .....  | 46        |
| 4.3      | Alterações no gene <i>BRCA2</i> não descritas .....  | 49        |
| 4.4      | Rastreamento do gene <i>CHEK2</i> por sequenciamento direto .....  | 49        |
| 4.5      | Variantes de significado clínico desconhecido .....  | 50        |
| 4.6      | Análise de segregação e avaliação nos grupos controles.....  | 52        |
| 4.7      | Análise de MLPA .....  | 55        |
| 4.8      | Rastreamento do gene <i>TP53</i> por sequenciamento direto para seleção dos<br>pacientes negativos ..... | 60        |
| 4.9      | Sequenciamento de nova geração .....   | 61        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO.....</b>  | <b>74</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÕES.....</b>   | <b>91</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>   | <b>93</b> |

## ANEXOS

**Anexo 1 A** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Pesquisa-  
CEP da Fundação Antônio Prudente

**Anexo 1 B** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Indivíduos  
com Câncer de Mama

**Anexo 2** Heredogramas dos pacientes com alteração identificada



- Anexo 3** Heredogramas dos pacientes selecionados para fazer sequenciamento do exoma
- Anexo 4** Descrição das sondas do kit SALSA MLPA P087-B1 BRCA1
- Anexo 5** Descrição das sondas do kit SALSA MLPA P045-B3 BRCA2 e CHEK2
- Anexo 6** Lista dos 119 genes associados ao Câncer de Mama Hereditário
- Anexo 7** Lista dos 479 genes mutados em câncer
- Anexo 8** Resumo das alterações encontradas nas listas
- Anexo 9** Artigo aceito para publicação na revista *BMC Medical Genetics*

# 1 INTRODUÇÃO

Mundialmente, o câncer de mama é uma das mais importantes causas de mortalidade entre as mulheres. No Brasil, segundo as estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) o câncer de mama será responsável por 57.120 novos casos em 2014 (Ministério da Saúde 2014).

O câncer é o resultado do acúmulo de mutações somáticas, provenientes de interações complexas causadas pela combinação de fatores genéticos e ambientais (NAGY et al. 2004). Estima-se que 5 a 10% de todos os casos de câncer de mama sejam hereditários causados principalmente por mutações germinativas em genes de alta penetrância (NAGY et al. 2004).

Em 1866, o câncer de mama hereditário foi inicialmente referenciado pelo francês Paul Broca o qual relatou 10 casos de mulheres diagnosticadas com câncer de mama, juntamente com vários outros casos de cânceres nas respectivas famílias em quatro gerações consecutivas (KRUSH 1979). Vários estudos posteriores confirmaram a associação entre história familiar e a predisposição aumentada ao câncer de mama (OTTMAN et al. 1983; KOZAK et al. 1986; EISINGER et al. 1998).

O câncer de mama hereditário possui características clínicas distintas em relação ao câncer de mama esporádico: a idade de acometimento é consideravelmente precoce, maior prevalência de bilateralidade e associação com outros tipos de tumores em famílias afetadas como câncer de ovário e colorretal (LOURENÇO et al. 2004; LYNCH et al. 2008).

A identificação dos indivíduos afetados com câncer hereditário é fundamental para prevenção e detecção precoce da doença, portanto, é muito importante também a identificação dos familiares em risco para que possam ser adequadamente aconselhados e que medidas apropriadas sejam tomadas (OFFIT et al. 1998; NAROD e OFFIT 2005; FACKENTHAL e OLOPADE 2007; SON et al. 2012).

Cada vez mais é reconhecida a complexidade da herança genética no câncer de mama. A penetrância dos genes de susceptibilidade ao câncer de mama pode ser classificada em três grupos (genes de alta, moderada e baixa penetrância), de acordo com a frequência de indivíduos portadores de uma mutação patogênica que desenvolve o câncer de mama ao longo da vida (FOULKES et al. 2008). Os genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11* e *CDHI* são de alta penetrância. Estes genes estão envolvidos no câncer de mama familiar e conferem um risco relativo maior ou igual a 5 vezes para o aparecimento da doença (FOULKES et al. 2008). Os genes *ATM*, *CHEK2*, *PALB2* e *BRIP* apresentam moderada penetrância, estes genes são raros na maioria das populações e conferem um risco relativo de 2 a 3 vezes maior para desenvolvimento do câncer de mama (FOULKES et al. 2008; JENSEN et al. 2009). Já os genes de baixa penetrância *FGFR2*, *TNRC9*, *MAP3K1* e *LSP* apresentam um risco relativo maior ou igual a 1,01 e menor que 1,5 para desenvolver o câncer de mama (FOULKES et al. 2008). Estes genes podem levar ao desenvolvimento da doença somente em conjunto com outros fatores de risco ou com outros genes mutados (EASTON et al. 2007; ANTONIOU et al. 2001).

## 1.1 GENES ASSOCIADOS ÀS SÍNDROMES HEREDITÁRIAS COM AUMENTO DE RISCO PARA CÂNCER DE MAMA

Uma das síndromes mais comuns de câncer hereditário é a Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário (HBOC, do inglês *Hereditary breast and ovarian cancer*), sendo que mutações nos genes *BRCA1* e/ou *BRCA2* são as mais prevalentes e carregam um alto risco cumulativo para o desenvolvimento do câncer chegando a 85% nos casos de câncer de mama, 54% e 23% para câncer de ovário quando a mutação ocorre em *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente (KING et al. 2003; PETRUCELLI et al. 2010). Esta é uma síndrome autossômica dominante não está associada somente com o câncer de mama precoce e ao câncer de ovário, mas também com o aumento do risco de outros tipos de cânceres como: pâncreas, estômago, laríngeo, tuba uterina e câncer de próstata (ROY et al. 2011). Em mama, mutações germinativas em *BRCA1* estão associadas ao risco de desenvolvimento de tumores de mama que não expressam os receptores hormonais, estrógeno e progesterona (ER e PR negativos) e em *BRCA2* ao risco de desenvolvimento de tumores positivos para os receptores (ER ou PR positivos) (YOUNG et al. 2009; ROBERTSON et al. 2012). Essa associação foi também verificada em um estudo de nosso grupo (CARRARO et al. 2013).

Além disso, alguns estudos sugerem uma nova síndrome caracterizada pela coocorrência de câncer de mama e cólon (HBCC, do inglês *Hereditary breast and colon cancer*) no mesmo indivíduo ou em parentes próximos (LYNCH et al. 1972; MEIJERS-HEIJBOER et al. 2003).

NASEEM et al. (2006) identificaram a presença de mutações nos genes *CHEK2*, *MLH1*, *MSH2*, *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes com critérios para a síndrome de câncer de mama e também com critérios para síndrome de câncer de cólon hereditário, e sugeriram que mutações germinativas nestes genes podem conferir um risco aumentado para o desenvolvimento do câncer de mama ou de cólon nos familiares dos pacientes. Alguns estudos mostraram que mulheres portadoras de mutações no gene *BRCA1* apresentam um risco aumentado em desenvolver câncer colorretal (FORD et al. 1994; LIPTON et al. 2001; PHELAN et al. 2014).

MEIJERS-HEIJBOER et al. (2003) relataram um grupo de famílias com múltiplos casos de câncer de mama que desenvolveram também câncer colorretal, destes 18% (10/55) dos familiares com HBCC e 4% (15/380) dos familiares sem HBCC apresentaram a mutação 1100delC no gene *CHEK2*, esses resultados fortalecem a possível associação desta alteração com à síndrome HBCC. No entanto, alguns autores questionam sobre esse assunto, sugerindo que a mutação no gene *CHEK2* é pouco frequente, e provavelmente não está associada à síndrome (LIPTON et al. 2001; NASEEM et al. 2006; NAROD e LYNCH 2007).

O gene *CHEK2*, cuja alteração mais encontrada é uma deleção do nucleotídeo citosina (C) na posição 1100 (1100del C), está envolvido na via metabólica do reparo de DNA (LEE et al. 2000) e desempenha uma função importante na transdução do sinal para as proteínas de reparo em resposta ao dano no DNA (WEISCHER et al. 2008; STRACKER et al. 2009).

Particularmente, a mutação na linhagem germinativa c.1100delC no gene *CHEK2* mostrou um aumento no risco de até 2 vezes para desenvolver o câncer de mama (EASTON 2004). Também foi identificada a presença dessa mutação em

famílias que apresentavam câncer de mama hereditário e síndrome Li-Fraumeni e que não apresentavam alteração nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (MEIJERS-HEIJBOER et al. 2002).

Existem outras síndromes com transmissão autossômica dominante que apresentam um risco aumentado à predisposição ao câncer de mama. Entre elas podemos destacar a Síndrome de *Cowden* associada a mutações no gene *PTEN* (LIAW et al. 1997), Síndrome de *Peutz-Jeghers* associada a mutações no gene *STK11* (HEMMINKI et al. 1998) e a Síndrome de *Li-Fraumeni* (LFS, do inglês Li-Fraumeni syndrome) associada à mutações no gene *TP53* (MALKIN et al. 1990).

Uma característica comum encontrada em famílias com LFS e Li-Fraumeni like (LFL) é a presença do aparecimento de câncer de mama em idade precoce, que é uma particularidade que se sobrepõe nas famílias com câncer de mama hereditário (MALKIN et al. 1990; GARBER et al. 1991).

ACHATZ et al. em 2007 demonstraram alta ocorrência da mutação germinativa do gene *TP53* no códon 337 (c.1010G>A; p. R337H) em famílias brasileiras que preenchem os critérios de LFS/LFL e vivem no sul do Brasil, e foi demonstrado que a mutação p.R337H aumenta o risco de câncer de mama nas mulheres destas famílias (ASSUMPÇÃO et al. 2008; PALMERO et al. 2008).

A frequência de mutações patogênicas no gene *TP53* em mulheres com diagnóstico de câncer de mama em idade precoce, tem sido investigado em vários estudos (PROSSER et al. 1991; WALSH et al. 2006; ARCAND et al. 2008; LEE et al. 2012), sugerindo que elas são responsáveis em percentuais que variam de 1% (LEHMAN et al. 2000; ARCAND et al. 2008) a 5% (GONZALEZ et al. 2009) das famílias com câncer de mama em idade jovem.

Estudos recentes no sudeste do Brasil, em famílias em risco para o câncer identificaram uma mutação germinativa fundadora no gene *TP53* (p.R337H) com uma alta prevalência (1:3.000), quando comparado com outros estudos com mutações germinativas no gene *TP53* (ACHATZ et al. 2009). Uma variedade de outros tipos de cânceres foram encontrados em famílias portadoras do gene *TP53* especificamente a alteração p.R337H, são eles: sarcomas de partes moles, tumores do cérebro, carcinomas adrenocorticais, além de câncer da mama (ACHATZ et al. 2009).

- **Gene *BRCA1***

O gene *BRCA1* foi mapeado no cromossomo 17q21 em 1990 pelo grupo de pesquisadores liderado por MARY-CLAIRE KING (HALL et al. 1990), o resultado foi imediatamente confirmado pelos pesquisadores GILBERT LENOIR, STEVEN NAROD e seus colaboradores, os quais mapearam à predisposição ao câncer de mama e ovário na mesma localização, utilizando os mesmos marcadores, em diferentes famílias (NAROD et al. 1991). Na época, a existência de um gene para à predisposição ao câncer de mama e a possibilidade de isolá-lo por clonagem desencadeou um enorme interesse aos grandes laboratórios do governo, universidades e setor privado (KING 2014).

Portanto, em 1994 o gene *BRCA1* foi clonado por MIKI e colaboradores. Este gene contém 24 éxons, sendo 22 éxons codificantes e codifica uma proteína de 1.863 aminoácidos.

As mutações deletérias no gene *BRCA1* aumentam o risco de desenvolver câncer de mama em relação à população geral. BRCA1 é uma proteína que possui várias funções, envolvida na manutenção da estabilidade genômica, regulação do ciclo celular, reparo de quebra de dupla fita de DNA, regulação transcricional, apoptose e remodelamento de cromatina (SCULLY e LIVINGSTON 2000; YOSHIDA e MIKI 2004; NAROD e FOULKES 2004). O papel de reparo do DNA cromossômico de quebra de dupla fita ocorre durante as fases S e G2 do ciclo celular, quando uma intacta cromátide irmã pode servir como modelo para o reparo. Isto é crucial para manutenção da fidelidade de replicação, pois nesta fase é quando a célula possui a maior quantidade de proteínas BRCA1 (CORTEZ et al. 1999; ROY et al. 2011; CAESTECHKER e VAN DE WALLE 2013).

Existem evidências que a proteína BRCA1 seja fosforilada pela proteína ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) após a radiação ionizante (CORTEZ et al. 1999; ROY et al. 2011). Em resposta a danos no DNA, ATM (*ataxia telangiectasia mutation*) e ATR (*ataxia telangiectasia and RAD3- related protein*) fosforilam a histona  $\gamma$  H2AX que atrai as proteínas de reparo ao sítio de quebra (KHANNA e JACKSON 2001; WANG et al. 2005), interagindo com o mediador MDC1 (*Mediator of DNA damage checkpoint protein1*) que transmite, amplifica o sinal de *checkpoint* e recruta as proteínas de reparo, como BRCA1 e RAD51 para o sítio de quebra do DNA (KHANNA e JACKSON 2001; LOU et al. 2003; STUCKI et al. 2005).

Foi demonstrado que BRCA1 interage com a proteína RAD51, responsável pela troca das fitas e conversão gênica durante o reparo de quebra de dupla fita de DNA (HUEN et al. 2010), participando desta forma na ativação da recombinação



homóloga (*Homologous Recombination*) ou não homóloga (*Non Homologous End Joining-NHEJ*). BRCA1 também está presente no complexo de SWI/SNF, permitindo a ativação de transcrição e reparo do DNA, através do remodelamento da cromatina (BOCHAR et al. 2000; NAROD e FOULKES 2004; CAESTECHKER e VAN DE WALLE 2013).

A interação da proteína BRCA1 com as demais proteínas envolvidas no processo de reparo do DNA ocorre principalmente através de dois domínios protéicos: o domínio RING (*Really Interesting New Gene*) localizado na porção N-terminal da proteína e o domínio BRCT (*BRCA C terminus*) em *tandem*. O domínio RING é encontrado em várias E3 ubiquitina ligases, que mediam a ubiquitilação das proteínas (HASHIZUME et al. 2001; CHRISTENSEN et al. 2007) e podem estar envolvidas no reparo de dano do DNA. O domínio BRCT é um motivo que liga proteínas fosforiladas que estão envolvidas, principalmente na resposta ao dano no DNA (YU et al. 2003; ROY et al. 2011). Estes domínios estão envolvidos na interação proteína-proteína com as fosfoproteínas, como a BRIP1/FANCI e CtIP (YU et al. 2003; HUEN et al. 2010). O fato destes domínios altamente conservados serem frequentemente alvos de mutações clinicamente importantes, indica que eles são essenciais para função da proteína BRCA1 (HUEN et al. 2010).

O domínio de ligação RING também pode interagir com o domínio BRCA1-associated RING domain 1 (BARD1) (BRZOVIC et al. 2001; YU et al. 2006; CAESTECHKER et al. 2013), formando um complexo heterodímero que tem sido implicado na manutenção da estabilidade genômica e supressão do tumor, através da sua participação na sinalização do dano, reparo do DNA e regulação transcricional (HUEN et al. 2010).

- **Gene *BRCA2***

Em 1995, um segundo gene denominado *BRCA2* foi relacionado ao câncer de mama hereditário (WOOSTER et al. 1995). Este gene localiza-se no braço longo do cromossomo 13 (13q12.3) (WOOSTER et al. 1994), contém 27 éxons, todos codificantes, distribuídos em cerca de 70.000 pares de base (bp), e codifica uma proteína de 3.418 aminoácidos (TAVTIGIAN et al. 1996). *BRCA2* é um gene supressor de tumor que tem papel fundamental na manutenção da integridade genômica e supervisão do ciclo celular. A proteína BRCA2 pode interagir com BRCA1, participando diretamente no reparo do DNA danificado, pela ativação de recombinação homóloga e reparo da quebra de dupla fita do DNA (CHEN et al. 1999; SY et al 2009).

BRCA2 é fundamental para a recombinação homóloga quando interage com a proteína RAD51 (MOYNAHAN et al. 2001; ROY et al. 2011). Células deficientes de RAD51 exibem fenótipo similar às células deficientes de BRCA2, o que fornece evidência genética que interações de BRCA2 e RAD51 são eventos fundamentais para a manutenção da divisão celular e da estrutura dos cromossomos (YOSHIDA e MIKI 2004; ROY et al. 2011).

MCALLISTER et al. (2006) demonstraram que mutações na linhagem germinativa dos genes *BRCA2* e *TP53* em células tumorais, influenciam na sobrevivência, na suscetibilidade e no desenvolvimento inicial do tumor. A instabilidade genética originada pela perda da função do *BRCA2* também poderia desencadear mutações em genes de *checkpoint* do ciclo celular como *TP53* (LEE et al. 1999; MCALLISTER et al. 2006) assim como a perda das funções dos genes

*BRCA2* e *TP53* podem levar ao descontrole dos *checkpoints*, e conseqüentemente, a uma proliferação descontrolada e crescimento invasivo (YOSHIDA e MIKI 2004).

Portanto, as proteínas *BRCA1* e *BRCA2* trabalham em uma via metabólica comum em proteção ao genoma. Entretanto, possuem diferentes funções em estágios diferentes da resposta ao dano e reparo do DNA, sendo que, *BRCA1* é uma proteína pleiotrópica em resposta ao dano no DNA, o qual funciona tanto na ativação do *checkpoint*, quanto no reparo do DNA e a proteína *BRCA2* é um mediador do mecanismo de recombinação homóloga (ROY et al. 2011).

## **1.2 MUTAÇÕES GERMINATIVAS NOS GENES *BRCA1* E *BRCA2***

Uma vez que *BRCA1* e *BRCA2* são genes altamente polimórficos e as mutações podem ocorrer em toda a extensão dos mesmos, é necessário realizar o sequenciamento completo destes genes para identificar as regiões de ocorrência das mutações germinativas de ponto.

Mais de 2000 mutações diferentes foram relatadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* incluindo deleções, inserções, e muitas substituições de um único nucleotídeo em regiões codificadoras e não codificadoras destes genes (Breast Cancer Information Core database-NHGRI 2014). Os tipos mais comuns de mutações patogênicas são atribuídas as pequenas inserções, deleções, variações *missense* e mutações no sítio de *splice*, que podem resultar na produção de proteínas não funcionais (KARAMI e MEHDIPOUR 2013).

Algumas mutações são mais prevalentes em indivíduos de grupos étnicos específicos ou geográficos (NAROD e SALMENA 2011). Isto é devido à presença

de mutações fundadoras nesta população. Em judias de origem Ashkenazi (descendentes da Europa Central e Oriental), foram identificadas três *hot spots* mutacionais prevalentes, dois no gene *BRCA1* (185delAG e 5382insC) e outro no gene *BRCA2* (6174delT) (KING et al. 2003) que correspondem a mais de 90% de todas as mutações patogênicas de famílias HBOC (TONIN et al. 1996). Em mulheres judias, aproximadamente 12% de todos os cânceres de mama e 35% de todos os cânceres de ovário são devido a uma mutação fundadora (WARNER et al. 1999; MOSLEHI et al. 2000).

Outras mutações fundadoras já foram descritas em várias populações, como por exemplo, na Holanda (deleção 2804delAA no gene *BRCA1*), na Islândia (a mutação 999del5 em *BRCA2*), em Portugal (mutação no exon3 inserção *Alu*, no *BRCA2*) e Suécia (3171ins5 no *BRCA1*) (PEELEN et al. 1997; IAU et al. 2001; EINBEIGI et al. 2001; MACHADO et al. 2007).

Bahamas é o país com maior frequência (23%) conhecida de mutações fundadoras encontradas no gene *BRCA1* entre os casos de câncer de mama (DONENBERG et al. 2011). No Canadá (uma população etnicamente mista, possui poucas mutações fundadoras), correspondem cerca de um por cento. As mutações fundadoras também foram observadas em outras populações, incluindo a Groenlândia (HARBOE et al. 2009) e Chipre (LOIZIDOU et al. 2007), e acredita-se que estas mutações fundadoras refletem no isolamento geográfico destas ilhas.

Outras populações com importantes mutações fundadoras incluem etnias isoladas, como holandeses (VERHOOG et al. 2001), franco-canadenses (GHADIRIAN et al. 2009) e em muitos países da Europa Oriental com origens eslavas, incluindo a Polônia (GÓRSKI et al. 2000), Rússia (SOKOLENKO et al.

2007), Belarus (UGLANITSA et al. 2010), e os Estados Bálticos (ELSAKOV et al. 2010). Em países que apresentam mutações fundadoras torna-se importante rastrear todos os pacientes de câncer de mama para as mutações. Em Ontário, no Canadá, foi proposto que todas as mulheres judias sejam aconselhadas a fazer os testes genéticos, independentemente de sua história pessoal ou familiar de câncer (METCALFE et al. 2010).

A identificação de mutações patogênicas nas famílias com critérios HBOC e HBCC é determinante no seu seguimento clínico, pois permite realizar o diagnóstico pré-sintomático, ao fornecer informações importantes para o aconselhamento genético (DOMCHEK e WEBER 2008). As mutações dos tipos *missense* já descritas e classificadas como clinicamente relevantes, as grandes deleções exônicas, e todas as alterações *nonsense* (que geram códon de parada prematuro), e *frameshift*, que originam mudança no quadro de leitura e resultam na perda dos domínios funcionais importantes da proteína, foram classificadas como patogênicas, ou seja, mutações que causam perda da função da proteína (CHENEVIX-TRENCH et al. 2006).

Estima-se que 20% das mutações germinativas detectadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são variantes de significado incerto ou VUS (do inglês, *variants of uncertain significance*) que são variações na sequência nucleotídica de um gene, que leva ou não a alteração na sequência da proteína, porém o impacto na sua função é desconhecido (DOMCHEK e WEBER 2008). As VUS incluem: as alterações *missense*, pequenas deleções *in frame*, cujo efeito sobre a estrutura da proteína não pode ser imediatamente inferida e também sugere que as variantes intrônicas e exônicas podem potencialmente afetar o *splicing* do pré-mRNA (RADICE et al. 2011).

Mesmo utilizando metodologias como o sequenciamento direto do gene para identificação das mutações de ponto nos genes *BRCA*, resultados negativos ou inconclusivos são relativamente comuns.

### **1.3 AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DAS VUS NOS GENES *BRCA1* E *BRCA2***

As variantes de significado desconhecido podem ser caracterizadas através de estudos de segregação, análises *in silico* e estudos funcionais.

Quando um resultado apresenta uma VUS, uma das estratégias a ser utilizada deve ser, quando possível, a sua avaliação em um grande número de indivíduos da família em questão para determinar se a variante segrega com o câncer na família e determinar se a variante tem potencial ou não de ser deletéria, ou se tem potencial de representar um polimorfismo (DOMCHEK e WEBER 2008).

Em geral, quando uma VUS não segrega com a doença na família (não está presente em pelo menos um familiar afetado com câncer de mama ou câncer de ovário em idade precoce) torna-se improvável que seja patogênica, neste caso pode se tratar de uma variante neutra ou de um polimorfismo. Quando uma VUS segrega com a doença na família, é possível que seja patogênica. Entretanto, o número de familiares afetados vivos nem sempre é suficiente para conseguir tirar conclusões a partir dos dados de cosegregação (GOLDGAR et al. 2004; CHENEVIX-TRENCH et al. 2006; EASTON et al. 2007; DOMCHEK e WEBER 2008).

Quando uma VUS é encontrada com uma mutação patogênica particularmente em *trans* (uma mutação em cada alelo) no mesmo gene, em via de

regras, sugere-se que a VUS não seja patogênica (RADICE et al. 2011). As mutações patogênicas homozigóticas no gene *BRCA1* são letais para o desenvolvimento do embrião (GOWEN et al. 1996; HOHENSTEIN et al. 2001). Em relação ao gene *BRCA2* foi identificado que os indivíduos homozigóticos para mutações patogênicas são fatais ou originam fenótipo de anemia de *Fanconi* tipo D1 (HOWLETT et al. 2002).

A detecção de uma VUS numa população de controles normais com frequência igual ou superior a 1% sugere-se fortemente tratar de um polimorfismo. No entanto, o fato de uma VUS apresentar uma frequência inferior a 1% não se pode garantir que se trata de uma variante patogênica e nem de uma variante neutra, pouco frequente na população. Segundo CHENEVIX-TRENCH et al. (2006), dado que a frequência de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* na população caucasiana é inferior a 0,1% e dada a enorme variedade de mutações patogênicas descritas nestes genes, é muito pequena a probabilidade de uma variante ser patogênica com uma frequência de 0,5% na população controle.

#### **1.4 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DAS CAUSAS GENÉTICAS ASSOCIADAS À PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER DE MAMA**

O sequenciamento completo dos genes é considerado uma tecnologia padrão ouro e tem sido descrito como a técnica de maior sensibilidade para detectar a localização exata das mutações germinativas. No entanto, sequenciamento completo

não é a abordagem ideal para a detecção dos rearranjos genômicos (HERMAN et al. 2012).

A ausência de mutações de ponto nos genes *BRCA1* e *BRCA2* não excluem a possibilidade da presença de alterações como os rearranjos genômicos. Os grandes rearranjos genômicos, incluindo deleções e duplicações não são identificados por métodos de sequenciamento direto (HERMAN et al. 2012).

As sequências *Alu* estão presentes em alta frequência no genoma humano (aproximadamente 3% do genoma humano ou 1 repetição *Alu* para cada 5kb) (KOLOMIETZ et al. 2002), que aparentemente media rearranjos cromossômicos e eventos de recombinação homóloga, resultando em translocações, duplicações, inversões ou deleções (KOLOMIETZ et al. 2002; TANCREDI et al. 2004). As sequências *Alu* podem ser consideradas, portanto como fatores de instabilidade genômica, sendo responsáveis por *hot spots* de recombinação em determinados genes (PUGET et al. 2002).

Atualmente, verificou-se um crescente número de rearranjos genômicos em *BRCA1*. Há evidências de que a maioria dos rearranjos detectados em *BRCA1* esteja relacionada a eventos de recombinação desigual de sequências repetitivas no DNA como os elementos *Alu* (BATZER et al. 2002), sendo que a maioria dos rearranjos genômicos encontrados no gene *BRCA1* localiza-se na região desses elementos (MAZOYER et al. 2005). Poucos rearranjos foram descritos em *BRCA2*, o que pode ser explicado pela menor densidade de repetições *Alu* do que observado em *BRCA1* (AGATA et al. 2005; WOODWARD et al. 2005).

Um estudo recente em famílias Portuguesas com síndrome HBOC, foi identificado um rearranjo genômico no gene *BRCA2* (c.156\_157insAlu) em 8% das



famílias estudadas (PEIXOTO et al. 2009). É o rearranjo genômico mais frequente descrito até o momento na população portuguesa (MACHADO et al. 2007), esta alteração não foi encontrada nos 144 pacientes brasileiros avaliados (PEIXOTO et al. 2011).

Um grupo de famílias do norte da Itália com síndrome de HBOC apresentou uma prevalência de 40% de rearranjos genômicos em *BRCA1* (MONTAGNA et al. 2003). Nos Países Baixos, alguns relatos mostram que os rearranjos genômicos representam 27% a 36% das mutações deletérias de *BRCA1* (PETRIJ-BOSCH et al. 1997; HOGERVORST et al. 2003). Na população espanhola do sudeste da comunidade Valenciana foi identificado em famílias com HBOC, um novo rearranjo genômico fundador no gene *BRCA1* (deleções dos éxons 3-5), o qual representa 20% nesta população (PALANCA et al. 2013).

Em contraste, alguns estudos identificaram uma baixa frequência ou ausência dos rearranjos genômicos, por exemplo: em famílias dinamarquesas que apresentaram a síndrome HBOC, a prevalência dos rearranjos genômicos detectados no gene *BRCA1* foram de 3,8% (THOMASSEN et al. 2006). PAL et al. 2013). Em um estudo realizado com jovens mulheres negras diagnosticadas com câncer de mama nos Estados Unidos da América foram identificados 1,4% dos rearranjos genômicos no gene *BRCA1*. Na Polônia, a prevalência dos grandes rearranjos genômicos no gene *BRCA1* foram de 1,5% em famílias em risco para o câncer de mama e ovário (RUDNICKA et al. 2013). Outro estudo, realizado na Finlândia não detectou os rearranjos nas 82 famílias com risco moderado ou elevado para síndrome HBOC (LAHTI-DOMENICI et al. 2001). Um estudo no Canadá, não encontrou nenhuma evidência dos rearranjos genômicos nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* em

famílias Franco-Canadenses com alto risco de câncer de mama e ovário (MOISAN et al. 2006).

Diversas técnicas são utilizadas para a detecção de deleções e duplicações no número de cópias de sequências de DNA, tal como: array-CGH (*Comparative Genomic Hybridisation*). A maioria destas metodologias pode falhar na detecção de deleções ou duplicações de um ou mais éxons, quando o alelo normal está presente.

Atualmente, para investigação dos rearranjos genômicos em *BRCA1* e *BRCA2* utiliza-se a técnica de MLPA (*Multiplex ligation dependent probe amplification*). MLPA é um método de PCR multiplex que permite que múltiplos alvos sejam amplificados com um único par de iniciadores (SCHOUTEN et al. 2002). Cada sonda consiste de dois oligonucleotídeos que reconhecem sítios alvos adjacentes do DNA. Uma sonda de oligonucleotídeos possui uma sequência reconhecida pelo iniciador *forward*, e a outra sequência reconhecida pelo iniciador *reverse*. Somente quando ambas as sondas são hibridizadas de forma justapostas aos seus respectivos alvos, elas podem se ligar e formar uma sonda completa.

A vantagem de se trabalhar com a sonda em duas partes é que só oligonucleotídeos ligados são amplificados, conferindo alta especificidade ao teste se as duas sondas se ligarem desta forma, a sequência de iniciadores levará à amplificação. Cada sonda completa tem um comprimento específico, uma vez que um dos pares de iniciadores carrega um tamanho diferente de fragmento, de modo que os produtos de amplificação resultantes apresentam tamanhos distintos, sendo separados e visualizados por eletroforese (SCHOUTEN et al. 2002).

Essa técnica possibilita a quantificação relativa, dado ao número de cópias de mais de 50 sequências de ácidos nucleicos em um único experimento, tornando capaz de detectar deleções e duplicações (GILLE et al. 2002; BUNYAN et al. 2004).

Vários estudos observaram rearranjos genômicos com o uso de MLPA em pacientes com história familiar de câncer de mama e ou ovário, nos quais não haviam sido identificadas mutações de ponto dos genes relacionados a síndromes hereditárias (ENGERT et al. 2008; HANSEN et al. 2009; SLUITER e VAN RENSBURG 2011). A análise de MLPA representa uma técnica de padrão ouro para análise molecular de todas as patologias derivadas da presença variações no número de cópias do gene (STUPPIA et al. 2012).

A metodologia MLPA não substitui o sequenciamento capilar, sendo os dois métodos complementares na identificação dos diferentes tipos de mutações. A utilização das técnicas de identificação de mutações de ponto e de rastreamento de rearranjos genômicos aumenta significativamente a sensibilidade do teste (WALSH et al. 2006).

Portanto, o sequenciamento completo seguido da avaliação de rearranjo genômico por MLPA, favorece a obtenção de informações precisas sobre as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Atualmente, novas metodologias de sequenciamento de nova geração (NGS) estão disponíveis e várias plataformas de captura do exoma humano para o sequenciamento paralelo massivo foram desenvolvidas e são comercializadas até o momento (NG et al. 2009; BAINBRIDGE et al. 2010; ASAN et al. 2011). Essas plataformas utilizam diferentes abordagens de sequenciamento capazes de gerar dados sobre milhões de pares de bases em uma única corrida (MARTH et al. 2011).

Entre as novas tecnologias, podemos citar a plataforma 454FLX da Roche (<http://www.454.com>), Illumina (<http://www.illumina.com>), SOLID *system* (<http://www.appliedbiosystems.com>), Ion Torrent (<http://www.appliedbiosystems.com>), Ion Proton (<http://www.appliedbiosystems.com>) e entre outras.

Entre os métodos para sequenciamento de todos os genes humanos, há aqueles que são baseados na captura de DNA de regiões codificantes dos genes, onde alterações genômicas podem ser identificadas, e influenciar na função da respectiva proteína (MARTH et al. 2011).

Além disso, abordagens para o sequenciamento de pequenos números de genes específicos por NGS, já estão sendo rotineiramente usados. Alguns laboratórios de diagnóstico estão mudando de sequenciamento Sanger para outras plataformas de sequenciamento de nova geração (TARABEUX et al. 2014). O método *target-seq* (sequenciamento alvo) baseado em PCR multiplex é um dos mais utilizados.

Atualmente, TARABEUX et al. (2014) estabeleceram procedimentos de diagnóstico de rotina para sequenciamento completo dos genes *BRCA1/2* através da plataforma Ion Torrent (PGM). Assim, como na nossa instituição A.C.Camargo Cancer Center outros laboratórios estão utilizando esses métodos na rotina.

## 1.5 ACONSELHAMENTO GENÉTICO

Aconselhamento genético (AG) é o processo de comunicação da presença de uma síndrome genética aos portadores e seus familiares. No momento do AG devem ser detalhadas informações sobre a origem, a herança e as implicações da doença, possibilitando ao paciente tomar decisões médicas e pessoais (NUSSBAUM et al. 2002). O aconselhamento genético diminui a intenção das mulheres não portadoras em realizar testes genéticos desnecessariamente, além de diminuir a preocupação, ansiedade e depressão (NELSON et al. 2013). A história familiar é fundamental para a identificação de indivíduos em risco para os cânceres primários, secundários e identificar os indivíduos com maior probabilidade de se beneficiar do aconselhamento e / ou testes genéticos (WOOD et al. 2014). Portanto, os indivíduos considerados de alto risco devem ser encaminhados para o aconselhamento genético onde receberão todas as informações sobre a doença diagnosticada, informações sobre a herança e apoio para o rastreamento precoce (ROCHA e KAGOHARA 2006).

Os primeiros passos do aconselhamento genético para o câncer familiar são: identificar do indivíduo em risco e fornecer informações sobre as estimativas do risco desse indivíduo em adquirir câncer. Sendo confirmada a suspeita diagnóstica de uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer, o AG tem por finalidade transmitir as informações em relação ao diagnóstico, prognóstico, e como proceder com os indivíduos em risco (VARGAS 2002).

Os esclarecimentos sobre a possibilidade de realização do diagnóstico molecular da síndrome têm de ser explicadas ao paciente. Para a confirmação do

diagnóstico clínico o teste genético deve ser oferecido, mas no entanto, o paciente deve estar bem informado que o resultado obtido do teste não irá mudar a conduta nem o diagnóstico clínico da síndrome. Se a detecção da mutação for comprovada, esta poderá ser rastreada em seus familiares possibilitando a identificação de indivíduos que apresentaram ou não a mutação. Os familiares que não tiverem a mutação serão liberados da intensa vigilância clínica. Porém, caso a mutação não seja detectada pelos métodos utilizados, o paciente deve estar ciente de que outros fatores não identificados podem ocasionar a síndrome e que mesmo sem o diagnóstico molecular a família deverá continuar o rastreamento clínico (HEMMINKI e ENG 2004).

## 1.6 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, os avanços na área de biologia molecular e genética permitiram o estabelecimento de uma forte associação entre a presença de mutações germinativas nos genes *BRCA* e o risco de desenvolver síndromes de câncer hereditário.

A maioria das mutações identificadas em *BRCA1* e *BRCA2* são alterações em ponto, sendo possíveis de serem identificadas por sequenciamento completo. No entanto, os rearranjos genômicos não são detectados pelo sequenciamento capilar.

Dessa forma, o nosso projeto foi desenvolvido para rastrear as mutações nas regiões codificadoras dos genes *BRCA1*, *BRCA2*, além das mutações pontuais nos genes *TP53* (R337H) e *CHEK2* (1100delC) em pacientes com diagnóstico clínico para o risco de câncer de mama hereditário. Posteriormente, nós analisamos

rearranjos genômicos através da técnica de MLPA, em pacientes em que mutações patogênicas em linhagem germinativa não tenham sido detectadas pelo sequenciamento nestes genes. Além disso, considerando que as mutações nestes genes têm diferentes distribuições geográficas, é interessante identificar a frequência das mutações e as alterações no número de cópias na população brasileira.

Por outro lado, as pacientes diagnosticadas com câncer de mama hereditário e negativas para as alterações nestes genes são candidatas a apresentarem alterações em outros genes, sendo necessária a continuidade da investigação genética nestes pacientes. Por isso, foi proposto realizar o sequenciamento do exoma de algumas pacientes negativas para mutações patogênicas nos genes *BRCA1/2*, *TP53* e *CHEK2* (1100delC).

Deste modo, a caracterização da causa genética que leva ao aumento do risco de desenvolver câncer de mama em mulheres do Brasil, pode fornecer subsídios para guiar condutas para a aplicação dos testes genéticos, além de fornecer informações essenciais para o aconselhamento genético dos pacientes e seus familiares e também informações sobre a genética de nossa população.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é rastrear mutações pontuais e as alterações no número de cópias nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, além das mutações em ponto nos genes *CHEK2* (1100delC) e *TP53* (R337H) em pacientes que preenchiam critérios clínicos para o câncer de mama hereditário (HBOC e HBCC), e identificar novos genes candidatos à predisposição ao câncer de mama por sequenciamento do exoma nos pacientes negativos para os genes testados.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, através da PCR seguida do sequenciamento capilar.
- Identificar mutações pontuais nos genes *CHEK2* (1100delC) e *TP53* (R337H), através da PCR seguida do sequenciamento capilar.
- Classificar as mutações encontradas nos bancos de dados do *Breast Cancer Information Core database* (BIC), IARC-LOVD (<http://brca.iarc.fr/LOVD>) e no *International Agency for Research on Cancer* - (IARC).
- Estudar o impacto na estrutura e função da proteína das mutações de substituição de bases que não foram descritas nos bancos de dados e que levam a substituição de aminoácido utilizando os programas de predição de



patogenicidade SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*), Polyphen-2 (*Polymorphism Phenotyping*) align-GVGD (*alignments Grantham Variation and Grantham Deviation*).

- Avaliar as alterações no número de cópias nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, através da técnica de MLPA em pacientes que não apresentaram alteração detectada pelo sequenciamento
- Validar as alterações no número de cópias encontradas pela técnica de MLPA, através de outras metodologias complementares (*array-CGH*, PCR de longo alcance, Duplex PCR quantitativa).
- Rastrear as mutações germinativas em outros genes por sequenciamento do exoma em sub grupo de pacientes negativos para os genes testados.

### 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1 CASUÍSTICA

Para a realização deste projeto foram selecionados 128 indivíduos não relacionados, diagnosticados com cânceres de mama e/ou ovário e mama e/ou colorretal hereditários, coletadas no período de 2007/2010 do A.C.Camargo Cancer Center, SP. Também foram incluídos dois membros afetados, cada um de uma família, para análise de segregação. Todos os indivíduos preencheram os seguintes critérios da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN 2014) preconizados para síndromes de câncer de mama hereditário. Estes critérios estão descritos no Quadro 1.

Para este estudo foi incluído uma segunda etapa para a identificação de novos genes de susceptibilidade ao câncer de mama hereditário por sequenciamento de regiões exônicas. Para isso, foram selecionados 22 pacientes sendo eles: 5 probandos do estudo presente que não apresentaram alterações nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, e *CHEK2* (1100delC), 5 probandos portadores de mutações nos genes *BRCA1* que foram utilizados como filtro controle para seleção das variantes, e 12 pacientes também negativas para *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* e *CHEK2* (1100delC) (10 indivíduos não relacionados e duas irmãs) oriundos de outro projeto (CARRARO et al. 2013). Os pacientes foram selecionados de acordo com os seguintes critérios: histórico familiar de câncer de mama, paciente e/ou familiares diagnosticados com câncer de mama em idade precoce (<36 anos).

As informações clínicas e o histórico familiar dos pacientes foram obtidos com a colaboração da Dra. Erika Maria Monteiro Santos e Dr. Samuel Aguiar Junior do Departamento de Cirurgia Pélvica do A.C.Camargo Cancer Center, SP, e da Dra. Maria Isabel Waddington Achatz e Amanda França ambas do Departamento de Oncogenética, A.C.Camargo Cancer Center, SP.

Todos os indivíduos foram incluídos após o aconselhamento genético e o preenchimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

A primeira parte deste estudo pertence ao projeto “Predisposição Hereditária ao Câncer Colorretal e ao Câncer de Mama: Manejo de Pacientes de Alto Risco e Suas Famílias Diagnóstico Clínico e Molecular, Aconselhamento de Risco e Implantação de um Sistema de Registro e Gerenciamento de Dados Oncogenéticos” coordenado pelo Dr. Benedito Rossi (CNPq-408833/2006-8) (Anexo 1 B) que já possui aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa-CEP da Fundação Antônio Prudente sob número 870/06 (Anexo 1 A).

A segunda parte deste projeto é parte do projeto temático “Identificação de novos genes de susceptibilidade para câncer hereditário por sequenciamento de regiões exônicas” coordenado pela Dra. Dirce Maria Carraro (FAPESP-2013/23277-8) e este estudo teve aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa-CEP da Fundação Antônio Prudente sob número 1754/13.

As amostras de DNA purificados de leucócitos destes indivíduos estão armazenadas no Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center.

**Quadro 1 - Critérios de inclusão para indivíduos HBOC e HBCC**

| <b>Câncer de Mama e Ovário Hereditário (HBOC)</b>  |
|--|
| 1- Diagnóstico até 45 anos com ou sem história familiar<br>2- Diagnóstico até 45 anos com um familiar com câncer de mama diagnosticado antes dos 45 anos ou com familiar com câncer de ovário epitelial/tumor de trompa/tumor peritoneal primário<br>3- Diagnóstico até 50 anos com um familiar com câncer de mama diagnosticado antes dos 50 anos ou com familiar com câncer de ovário epitelial/tumor de trompa/tumor peritoneal primário<br>4- Dois tumores de mama primários com um diagnosticado antes dos 50 anos<br>5- Diagnóstico em qualquer idade, com dois ou mais familiares com diagnóstico de câncer de mama ou ovário em qualquer idade<br>6- Familiar com câncer de mama masculino<br>7- História pessoal de tumor de ovário epitelial/tumor de trompa/tumor peritoneal primário<br>8- Membros de famílias de etnias associadas com elevada frequência de mutação (Judeus Ashkenazi, Islandeses, Suecos, Húngaros) |
| História pessoal de câncer de ovário epitelial<br>História pessoal de câncer de mama masculino   |
| <b>Câncer de Mama e Cólon Hereditário (HBCC)</b>   |
| 1- História pessoal de câncer de mama e cólon em qualquer idade<br>2- História pessoal de câncer de mama com um familiar de primeiro grau com câncer colorretal  |

Fonte: NCCN (2014)

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Extração do DNA Genômico

A extração do DNA genômico das amostras foi realizada a partir de sangue periférico, usando o kit Puregene®-DNA *purification gene* (Qiagen, SP, Brasil) seguindo as especificações do fabricante, conforme protocolo utilizado no Laboratório de DNA/RNA que faz parte do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center. Foi utilizado 2µg do DNA extraído da amostra de cada paciente.

### 3.2.2 Desenho dos *Primers*

Para a amplificação e sequenciamento completo dos éxons de interesse dos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* especificamente para a alteração 1100delC e para o gene *TP53* especificamente a alteração R337H foram construídos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que flanqueiam essas regiões.

As sequências dos iniciadores foram desenhadas nas regiões intrônicas aproximadamente 70 pb (pares de bases) do limite éxon-íntron. O gene *BRCA1* possui 24 éxons (NM\_007294.3), no qual foram desenhados 23 pares de *primers* para sua análise. O gene *BRCA2* possui 27 éxons (NM\_000059.3), no qual foram desenhados 29 pares de *primers*. Para a análise do gene *CHEK2* foi desenhado 1 par de *primers* específico, onde foi analisado somente o éxon 10 (NM\_145862) para alteração 1100delC, e para o gene *TP53* foi desenhado 1 par de *primers* (NM\_000546), onde foi analisado o éxon 10 para a alteração R337H.

As regras utilizadas para o desenho dos iniciadores com a finalidade de facilitar a extensão dos amplicons foram: proporção de bases C (citosina) e G (guanina) dos iniciadores em torno de 40 a 60%, comprimento de 19 a 24 bases, temperatura de anelamento (por %CG) entre 52 e 59°C. Para verificar a presença de estruturas secundárias (*stem loop* e *homodimer*) foi utilizado o programa OLIGOTECH (Oligos Etc. Inc. & Oligo Therapeutics Inc, 1995), para as quais foram permitidas temperaturas de no máximo 20°C. Os iniciadores *forward* e *reverse* foram desenhados a distâncias de no máximo 1700 pb para as amplificações de PCR e no máximo 600 pb para as reações de sequenciamento. Eles foram desenhados com o intuito de permitir a avaliação de toda a região codificadora dos genes e seus limites

íntron/éxons. Todos os iniciadores foram diluídos a uma concentração estoque de 100  $\mu\text{M}$ , de onde foram feitas alíquotas de trabalho na concentração de 10  $\mu\text{M}$ .

### 3.2.3 Amplificação das Sequências de DNA

#### **\*Reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida do sequenciamento direto**

A amplificação de todos os fragmentos dos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* (1100delC) e *TP53* (R337H), foi realizada com o kit *Master Mix High Fidelity* (Invitrogen®, SP, Brasil) em um volume final de 20  $\mu\text{L}$ . Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com gel *sybr safe* (invitrogen®, SP, Brasil) com duração aproximada de 60 minutos na voltagem de 110V.

#### **\*Rastreamento de mutações por sequenciamento direto**

Os produtos da PCR de todos os fragmentos foram purificados utilizando a exonuclease I (EXO) e fosfatase alcalina (SAP), *dilution buffer* e água em um volume final de 3  $\mu\text{L}$ . A reação enzimática foi incubada por 30 minutos a 37°C, seguida da inativação das enzimas a 80°C por 15 minutos, conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Após a purificação dos produtos de PCR seguiu-se a reação de sequenciamento.

Os fragmentos de DNA amplificados de todos os éxons de *BRCA1*, *BRCA2* e parcialmente para o gene *CHEK2* (éxon 10) e *TP53* (éxon 10) foram diretamente sequenciados pelo método de Sanger, com o kit *BigDye® Terminator v3.1* (Applied Biosystems, SP, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. A reação foi realizada em um volume final de 10  $\mu\text{L}$  com 1  $\mu\text{L}$  de *BigDye* e 5 pmoles de oligonucleotídeos iniciadores *forward* ou *reverse* específico para cada fragmento. A ciclagem utilizada

foi: 95°C por 1 minuto e 30 segundos, 40 ciclos de 95°C por 18 segundos, 52°C por 18 segundos e 60°C por 4 minutos. Para o método de precipitação da reação de sequenciamento, foi utilizado Etanol/EDTA, como sugerido pelo fabricante - *Applied Biosystems*. As amostras foram ressuspensas em 13µL de formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*, SP, Brasil), desnaturadas a 95°C em termociclador por 5 minutos e imediatamente acondicionadas em gelo por 3 minutos e então conduzidas ao aparelho Sequenciador Automático de DNA, *ABI Prism 3130 XL (Applied Biosystems)*.

#### **3.2.4 Comparação das Leituras Obtidas com as Sequências Referências**

O resultado do sequenciamento foi analisado utilizando a ferramenta CLCbio Main Workbench (CLC Bio, Denmark). As sequências referências de cada um dos genes estão descritas abaixo e foram usadas para comparação com as leituras obtidas.

*BRCA1*: NM\_007294.3

*BRCA2*: NM\_000059.3

*CHEK2*: NM\_007194.3

*TP53* : NM\_000546.5

#### **3.2.5 Descrição das Mutações Encontradas**

A nomenclatura utilizada para as mutações encontradas foi baseada em Den Dunnen e Antonarakis (2000) conforme recomendado pela *Human Genome Variation Society* ([www.hgvs.org/mutnomen](http://www.hgvs.org/mutnomen)) e também pelo no banco de dados do BIC (*Breast Cancer Information Core database*).

### 3.2.6 Interpretação das Alterações Encontradas

Todas as alterações encontradas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foram pesquisadas no banco de dados do BIC (NHGRI 2014). As alterações *nonsense* (que geram códon de parada prematuro) e *frameshift* (que ocasionam mudança no quadro de leitura e formação de códon de parada prematuro) foram classificadas como patogênicas.

A interpretação e determinação da significância patogênica das mutações do tipo *missense* descritas pelo banco de dados do BIC, IARC-LOVD (<http://brca.iarc.fr/LOVD>) e pelo banco de dados do *International Agency for Research on Cancer-IARC* (PETITJEAN et al. 2007), seguiram a classificação dos bancos de dados consultados.

As alterações *missense* não descritas ou descritas, mas com significado clínico desconhecido no banco de dados foram investigadas em três algoritmos complementares para a predição de sua patogenicidade.

As alterações *missense* classificadas como classe 3 no banco de dados IARC\_LOVD (<http://brca.iarc.fr/LOVD/home.php>). As variantes classificadas como classe 1 e 2 no IARC\_LOVD foram consideradas como *wide type* e as variantes classificadas como classe 4 e 5 foram consideradas como patogênicas. No caso de inconsistência entre as bases de dados, a classificação da IARC-lovd prevaleceu. Os algoritmos e os critérios utilizados estão descritos a seguir:

- POLYPHEN-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>)
- SIFT ([http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_BLink\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_BLink_submit.html))
- Align-GVGD (<http://agvgd.iarc.fr/alignments.php>)



Os valores do SIFT são de 0 a 1, *scores*  $\leq 0,05$  foram considerados como “afeta a função protéica”, enquanto *scores*  $> 0,05$  foram consideradas como “tolerante”, seguindo as recomendações do programa (NG e HENIKOFF 2001).

Os valores do POLYPHEN-2 são de 0 a 3.37, *scores*  $> 2.0$  foram considerados como “provavelmente prejudicial”, enquanto *scores* de 1.50- 1.99 indicaram que a variante poderia ser “possivelmente prejudicial” e os *scores* de 0 a 1.49 como “benignos”, seguindo as recomendações do programa (RAMENSKY et al. 2002).

O programa Align-GVGD combina as características biofísicas dos aminoácidos e a realização de múltiplos alinhamentos entre espécies e estabelece um *score* GV e GD (*Grantham Variation* (GV) and *Grantham Deviation* (GD) que prediz o impacto da mudança do aminoácido na proteína e, portanto, o grau de patogenicidade (deletérica ou neutra) das substituições *missense*. Este programa permite-nos avaliar o grau de conservação do aminoácido analisado como regiões funcionalmente importantes que se conservam evolutivamente. Assim, de acordo com o *score* pode-se classificar de C0 a C65, sendo que C0 é menos provável da variante ser patogênica, e C15, C25, C35, C45 e C65 – aumenta a probabilidade de ser patogênica (TAVTIGIAN et al. 2006).

Finalmente, todas as variantes foram classificadas de acordo com o banco de dados do IARC-LOVD (<http://brca.iarc.fr/LOVD>) (VALLÉE et al. 2012).

### 3.2.7 Análise de Segregação e Rastreamento nos Controles Normais

A análise de segregação foi realizada para avaliar se a variante de significado desconhecido cosegrega com a doença. As análises foram realizadas a partir do DNA genômico extraído dos leucócitos de sangue periférico disponível dos familiares afetados e/ou não afetados do probando. Além disso, para ajudar a esclarecer a relevância clínica das VUS foram avaliados aproximadamente 95 indivíduos saudáveis.

### 3.2.8 Análise do Transcrito

Para a nova variante localizada no sítio de *splice*, foi realizado a análise do transcrito utilizando amostras de tecido do tumor congelado do probando e do controle (indivíduo com câncer de mama esporádico não portador da variante c.560+2T>A).

Estas amostras foram homogeneizadas pelo equipamento Precellys 24® (Carlsbad, California, USA), em seguida foi realizada a extração do RNA utilizando o mini kit RNeasy (Qiagen, Venlo, the Netherlands), segundo as normas do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 2µg de RNA total utilizando iniciadores hexâmeros randômicos (Promega) com sistema da transcriptase reversa SuperScript para RT-PCR (Invitrogen GmbH). Os fragmentos RT-PCR foram obtidos de acordo com as recomendações do fabricante, utilizando iniciadores adjacentes ao éxon envolvido, a fim de gerar o fragmento apropriado. Os produtos da RT-PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com gel *sybr safe* (Invitrogen®, SP, Brasil) em luz UV com transluminador (*Alpha Innotech*).

Todos os produtos da RT-PCR foram clonados utilizando o InsT/Aclone™ PCR Product Cloning Kit (Fermentas). Este kit de clonagem utiliza um vetor linearizado, o pTZ57R/T (2886 pb), que possui em ambas as extremidades 3' uma timina extra desfosforilada, prevenindo a recircularização do vetor durante a ligação, aumentando o rendimento da clonagem. A timina extra nas pontas também facilita a clonagem direta de produtos de PCR, visto que DNA polimerases que perderam a atividade exonuclease 3'-5' (*proofreading*), possuem a atividade de desoxinucleotidil-transferase, adicionando adenina nas extremidades 3' do fragmento amplificado. Após a ligação, foi realizada a transformação em bactérias *E. coli*, eletrocompetentes DH10β. Os iniciadores do vetor M13F (*forward*) e M13R (*reverse*) foram utilizados para a PCR para seleção dos clones, a análise inicial foi em gel de agarose. Os clones inicialmente selecionados foram confirmados por sequenciamento direto pelo aparelho *ABI Prism 3130xl* (Applied Biosystems) utilizando os iniciadores do vetor (M13F e M13R) e iniciadores do inserto.

### **3.2.9 Técnica de MLPA**

A análise das alterações no número de cópias (deleção ou amplificação) nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e *CHEK2* (1100delC) foi realizada em todos os pacientes, nos quais as mutações patogênicas não foram detectadas pelo sequenciamento capilar.

Na padronização e validação da técnica de MLPA, foram utilizadas amostras de DNAs controles de indivíduos sem alterações, ou seja controles negativos para os rearranjos genômicos. Para tanto, foram utilizados DNAs disponíveis no Banco de Macromoléculas do Hospital A. C. Camargo. Para metodologia de MLPA (MRC-

Holland<sup>®</sup>) foi utilizado kits que inclui sonda para cada éxon do gene *BRCA1* e *BRCA2*. O kit SALSA MLPA P087-B1 (Anexo 4) pode ser usado para caracterizar deleções e duplicações que se estendem da região antes do éxon 1 ou após o éxon 24 do gene *BRCA1*. A *probe mix* P045-B3 (Anexo 5) contém sondas para todos os éxons do gene *BRCA2* e parte do *CHEK2* (1100delC). A primeira etapa consiste na desnaturação e hibridação da sonda SALSA MLPA. Foram utilizados 100 ng de DNA em um volume final de 5 µl de TE. Esta solução foi aquecida por 5 minutos a 98°C e em seguida resfriada a 25°C. Posteriormente, foram adicionados 1,5 µl de sonda SALSA e 1,5 µl de tampão MLPA para hibridizar por 16 horas a 60°C em um termociclador. A segunda etapa consiste na reação de ligação. A temperatura então é elevada até 54°C, e 32 µl de *mix Ligase-65* são adicionados a cada amostra (*mix Ligase-65*: 3 µl de tampão A de *Ligase-65* + 3 µl de tampão B de *Ligase-65* + 25 µl de água, seguido da adição de 1µl de *Ligase-65*). A terceira etapa consiste na reação de PCR, a qual foi realizada em novos tubos, utilizando um mix composto por 4 µl de tampão SALSA PCR + 26 µl de água e 10 µl da reação de ligação (descrita acima). Na temperatura de 60°C, foi adicionado 10 µl do *mix* da polimerase: 2 µl de SALSA PCR-oligonucleotídeos + 2 µl de tampão de diluição da enzima SALSA + 5,5 µl de água. Por fim, foi adicionado 0,5 µl de SALSA polimerase. As condições de PCR incluem 35 ciclos: 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C, 60 segundos a 72°C e uma etapa final de 20 minutos de incubação a 72°C. Após a amplificação pela PCR, foram misturados às amostras 0,7 µL da reação de PCR, 0,2µL do LIZ *size standard* (*Applied Biosystems*, SP, Brasil), 9 µL formamida Hi-Di (*Applied Biosystems*, SP, Brasil), em seguida, desnaturados a 80°C por 2 minutos e resfriados em gelo e depois foram sequenciados, através do equipamento de eletroforese capilar

*ABI Prism 3130 XL (Applied Biosystems)*, com filtros de fluorescência específicos, seguindo o protocolo desenvolvido por MRC Holland v002, 23.01.2012.

#### **\*Análise de dados e interpretação dos resultados**

Os fragmentos foram analisados pelo software *MRC Coffalyser (MRC-Holland)* disponíveis gratuitamente no site: [www.mrc.holland.com](http://www.mrc.holland.com). Os resultados foram expressos como a razão entre a área do pico de cada região identificada pela respectiva sonda sobre a média das áreas correspondentes, em amostras controles sabidamente negativas para rearranjos gênicos. Razões entre 0,7 e 1,3 foram consideradas normais. Uma deleção foi considerada se a razão de dosagem do paciente em relação ao controle interno for menor que 0,7 e uma duplicação foi considerada se a razão de dosagem for maior ou igual a 1,3 (BUNYAN et al. 2004).

### **3.3 VALIDAÇÕES POR OUTRAS METODOLOGIAS DAS ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS ENCONTRADOS ATRAVÉS DO MLPA**

#### **3.3.1 PCR de Longo Alcance**

Para confirmar a alteração no número de cópias, nós realizamos o PCR de longo alcance. Na padronização e validação desta técnica, foram utilizadas três amostras de DNAs de indivíduos controle sem alterações para rearranjos genômicos dos genes estudados. Na reação de amplificação, foi utilizada a enzima LongAmp Taq 2X Master Mix (*New England Biolabs*), de acordo com as recomendações do fabricante. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 0,8%, e as

bandas de interesse, cortadas e purificadas utilizando o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN), de acordo com o protocolo do fabricante. Os fragmentos foram analisados no sequenciador automático *ABI Prism 3130 XL* (*Applied Biosystems*).

### 3.3.2 Dosagem Gênica por PCR Quantitativa em Tempo Real

Para validação da presença de grandes deleções e ampliações, detectadas pela análise de MLPA, foi realizada a técnica de Duplex qPCR utilizando SYBR Green<sup>®</sup>, método desenvolvido pelo nosso grupo (Torrezan et al. 2012), que é um método alternativo simples e robusto de dosagem gênica, além disso, essa técnica apresenta a grande vantagem de minimizar erros de dosagem ocasionados por variações nas quantidades iniciais de DNA molde (Torrezan et al. 2012). Nesta metodologia foram utilizados iniciadores para o íntron 7 do gene *GAPDH* (12p13) e éxon 3 do gene *HPRT1* (Xq26.1) como genes referência. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e três indivíduos controle sem alterações para rearranjos gênicos foram avaliados para cada fragmento.

Para a realização do método Duplex qPCR, foi utilizado 18ng de DNA em uma reação de 20µL, éxons alvo e referência foram amplificados em duplex contendo 0,15 µmol de cada iniciador e 1X SYBR<sup>®</sup> Green PCR MasterMix (*Applied Biosystems*). A PCR quantitativa foi realizada no equipamento *ABI Prism 7500* (*Applied Biosystems*) com a seguinte ciclagem: 95°C por 10 minutos, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento e extensão a 60°C por um minuto.

Após a coamplificação, os produtos de PCR foram submetidos a uma temperatura de transição de 60°C a 95°C, e foram geradas curvas de *melting* da

queda da fluorescência do SYBR Green. Os picos de *melting* (PM) foram então obtidos a partir da primeira derivada negativa da variação da fluorescência ( $-dF/dT$ ) versus a temperatura, permitindo a discriminação de dois picos: um para o éxon alvo e outro para o éxon referência. A razão entre a altura do PM do éxon alvo e do éxon referência determina a concentração relativa do éxon alvo na amostra, e normalizando a razão do paciente pela razão obtida em amostras controle é possível determinar o número de cópias deste fragmento no paciente.

### 3.3.3 Hibridação Genômica Comparativa Baseada em Arrays

Para a confirmação das alterações encontradas pela análise de MLPA e Duplex qPCR, foram obtidos de um estudo prévio realizado pelo da Dra. Ana Krepischi os resultados (KREPISCHI et al. 2012) da metodologia de hibridização genômica comparativa baseada em microarranjos (aCGH, do inglês *array-based Comparative Genomic Hybridization*) de 2 probandos HBOC negativos para mutações nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* (1100delC) e *TP53* (R337H) pelo sequenciamento direto, os quais apresentaram alterações detectadas pela análise de MLPA e Duplex qPCR. Os perfis de variação no número de cópias genômicas (grandes deleções e ampliações) foram analisados pela técnica de aCGH, realizados na plataforma de 180K para genoma completo (22060/, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). As amostras foram marcadas com Cy3- e Cy5-dCTPs através de *random-priming*. As etapas de purificação, hibridização e lavagem foram realizadas como recomendado pelo fabricante. Os dados foram extraídos utilizando o software Feature Extraction (Agilent Technologies) e as análises foram realizadas no programa Genomic Workbench (Agilent Technologies)

utilizando o algoritmo ADM-2. O *threshold* de sensibilidade usado foi 6,7. Os valores de *threshold* para a definição de alterações no número de cópias genômicas foram: 0,4 para duplicações, 1,1 para ganhos de múltiplas cópias, -0,4 para deleções de uma cópia e -1,1 para perdas em homozigose (KREPISCHI et al. 2012).

### 3.3.4 Detecção de Mutações por Sequenciamento de Nova Geração

Os pacientes que não apresentaram mutações patogênicas e as alterações no número de cópias nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* (1100delC) e *TP53*, através das técnicas de sequenciamento capilar e MLPA, foram rastreados para identificação de novos genes de susceptibilidade para câncer de mama hereditário pelo sequenciamento de nova geração do exoma completo. Para este estudo, utilizamos as plataformas SOLiD<sup>TM</sup>5500xl e Ion Proton<sup>TM</sup> (Tabela 1) (XUAN et al. 2013).

**Tabela 1** – Diferenças das plataformas Ion Proton e SOLiD

| Plataforma   | Amplificação   | Sequenciamento             | Tamanho das reads | Resolução/Tempo por corrida | Tipo de erro | Total da taxa de erro |
|--|----------------|----------------------------|-------------------|-----------------------------|--------------|-----------------------|
| 5500xl SOLiD <sup>TM</sup> system                  | PCR em emulsão | Sequenciamento por ligação | 35-75 pb          | 10–15 Gb (por dia)/16dias   | Substituição | 0,10%                 |
| Ion Proton <sup>TM</sup> sequencer (Proton I chip) | PCR em emulsão | <i>Ion semiconductor</i>   | 200 pb            | 10 Gb/ 4 horas              | Indel        | 1%                    |

Gb: giga bases; pb: pares de bases

### 3.3.5 Plataforma Solid

#### \*Construção da Biblioteca e Sequenciamento do Exoma

O DNA genômico (1µg) do sangue periférico foi utilizado para construção das bibliotecas utilizado o SOLiD<sup>TM</sup> *Fragment Library Barcoding Kit* (*Applied Biosystems*). Para o enriquecimento das porções exônicas foi utilizado o kit de captura direcionada para todo o exoma humano *SureSelect Human All Exon V4 Kit*



50Mb (*Agilent Technologies*), seguindo as especificações do fabricante. Esta abordagem realiza a captura de todos os éxons humanos (1,22% do genoma, correspondentes às regiões codificadoras) através de sondas de RNA biotinizadas que são hibridadas contra DNA genômico após quebra, seleção de tamanho e ligação de adaptadores específicos para o sequenciamento. As moléculas híbridas DNA sonda são selecionadas por incubação com *beads* magnéticas de streptavidina, seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, a sonda de RNA é digerida promovendo liberação das moléculas de DNA alvo, que são amplificadas em poucos ciclos de PCR.

Após o preparo da biblioteca, as amostras enriquecidas foram então submetidas ao sequenciamento de alto desempenho na plataforma SOLiD™ 5500xl *System* (*LifeTechnologies*, Foster City, USA). A tecnologia de sequenciamento do SOLiD utiliza a amplificação em emulsão do DNA ligado a esferas. Após a amplificação e enriquecimento, as esferas com fragmentos de DNA modificados na extremidade 3' são depositadas em uma *FlowChip* de vidro que contém 6 *lanes* individuais. O sequenciamento ocorre por múltiplas de etapas de hibridização e ligação. Iniciadores são hibridados aos adaptadores no DNA molde e octâmeros fluorescentes hibridizam com a região adjacente do iniciador. Através da ação de uma ligase ocorre a ligação destes fragmentos e então é feita a detecção da fluorescência presente no octâmero. A marcação fluorescente do octâmero depende do par de bases inicial, permitindo a interrogação das duas primeiras bases nas quais ele se hibrida. Após a hibridização e detecção, as três bases finais do octâmero são clivadas e ocorrem múltiplos ciclos de ligação, detecção e clivagem. Posteriormente, o produto de extensão é removido e um iniciador complementar à região n-1 do

DNA molde inicia um novo ciclo de ligações. Cinco ciclos de iniciadores são completados para cada fragmento de DNA molde. A principal vantagem desta metodologia é que cada base é determinada em duas ligações independentes, resultando em uma leitura precisa (99,9%) que requer pouca cobertura para atingir um valor confiável de chamada de bases.

Foi utilizada a estratégia de sequenciamento *paired-end*, com uma leitura de 75 pares de bases a partir de uma extremidade e 50 pares de bases da outra extremidade dos fragmentos capturados.

### **3.3.6 Plataforma Ion Proton**

#### **\*Construção da Biblioteca e Sequenciamento do Exoma**

A plataforma Ion Proton da Life Technologies foi utilizada para o sequenciamento do exoma, foi utilizada a estratégia de sequenciamento *single-end*, que permite o sequenciamento de fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases.

A confecção das bibliotecas foi realizada a partir de 1µg DNA genômico de sangue periférico utilizando o kit Ion Shear™ Plus (Life Technologies), de acordo com o protocolo sugerido fabricante. Esse protocolo consiste em uma clivagem enzimática por 15 minutos, seguida de purificação através das Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter). Após a purificação foi corrido um chip de DNA High Sensitivity no Bioanalyzer (Agilent), a fim de obter fragmentos de 135 a 165 bp. Seguindo o protocolo, foi realizada a ligação dos adaptadores disponíveis no kit Ion Xpress™ Barcode Adapters (Life Technologies), o reparo das extremidades, depois é realizado uma purificação com Agencourt® AMPure® XP

Reagent (Beckman Coulter), em seguida foi realizado a etapa do *size selection* utilizando o E- Gel® (Invitrogen™) e depois amplificação dos fragmentos utilizando o Ion Plus Fragment Library kit (Life Technologies) segundo protocolo do fabricante. Uma nova purificação foi realizada com *beads* Agencourt® AMPure® XP Reagent (Beckman Coulter). Outro chip de DNA High Sensitivity (Agilent) foi realizado, com a finalidade de determinar a molaridade dos fragmentos que encontravam na faixa de tamanho entre 200 e 300 pb de cada biblioteca de amostra.

Antes de começar a PCR em emulsão é necessário determinar o fator de diluição que deve ter 26 pM de material em 65 µL da amostra. Uma alíquota de 500 ng de cada biblioteca (selecionada e amplificada) foi utilizada na etapa de enriquecimento do exoma.

O DNA capturado de cada amostra foi processado no *OneTouch 2* (PCR emulsão) e enriquecido no *OneTouch 2 ES Station*, ambos de acordo com os respectivos protocolos. Após, cada amostra foi depositada no Ion PI Chip v2 e sequenciada individualmente no Ion Proton (Life Technologies).

Para amplificar a biblioteca utilizamos o kit *template-positive Ion PI™ Ion Sphere™ Particles*, segundo as especificações do fabricante, e logo após é colocado no aparelho de corrida *the Ion OneTouch™ 2*. Após a etapa de PCR em emulsão, foi realizada o enriquecimento da amostra, separando antes uma alíquota de 1 µL e para verificar se o enriquecimento foi eficiente é realizado uma quantificação antes e depois do enriquecimento. Para isso, usamos 2 µL do material antes do enriquecimento, e 10 µL depois do enriquecimento. Essa quantificação é realizada no Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen™), com o Ion Sphere™ Quality Control Kit (Life Technologies), que permite a leitura de das fluorescências emitidas pelos

fluoróforos Cy5 e FAM, que são usados para a quantificação no Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen™). A fluorescência FAM, marca o adaptador P1, que está acoplado às *Ion Spheres* (ISPs - esferas onde os fragmentos estão acoplados), enquanto que o Cy5 marca o adaptador A, que se encontra na extremidade 3' dos fragmentos.

Depois do enriquecimento da amostra, é realizada a adição dos reagentes para a reação de sequenciamento paralelo massivo. Para isso, utilizamos o Ion PI™ Sequencing 200 Kit v2 (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante, que permite o sequenciamento de fragmentos de aproximadamente 200 pb. O sequenciamento é realizado no chip: Ion PI™ Chip v2, que pode gerar 10 Gb de sequências.

O sequenciamento nessa plataforma ocorre de maneira cíclica, sendo baseado na alteração de pH da solução onde ocorre a reação de sequenciamento. Quando há a incorporação de uma base, uma molécula de hidrogênio é liberada, alterando assim, o pH da solução, o que permite a identificação de um sinal dessa pequena alteração pelo software do equipamento.

### **3.3.7 Análise dos Resultados do Solid e Ion Proton**

Os dados gerados pelo sequenciamento no SOLiD 5500™ foram alinhados através do programa SOLiD™ *BioScope 1.2™ Software (Life Technologies)* ao mapeamento do genoma humano de referência (UCSC hg19) e também ao arquivo BAM gerado pela empresa *Agilent* contendo todas as coordenadas genômicas das regiões alvos do kit *SureSelect (SureSelect Human All Exon V4 Kit 50Mb)*. O programa *BioScope* apresenta parâmetros definidos para mapeamento de sequências

curtas geradas pelo equipamento SOLiD e realiza o mapeamento na sequência genômica em color base. Este programa apresenta ferramentas para a detecção de tipos específicos de alterações como os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single nucleotide polymorphism*), variações no número de cópias (CNVs, do inglês *Copy number variations*), translocações, pequenas deleções, inserções e outras.

As sequências geradas no Ion Proton foram avaliadas utilizando o próprio *software* de análise do equipamento, que realiza o mapeamento das sequências no genoma humano de referência (UCSC hg19) e a detecção de SNVs e INDELS.

A etapa de alinhamento das sequências geradas é realizada pelo bioinformata da nossa instituição Renan Valieris com a colaboração do Dr. Sandro de Souza e Dr. Jorge Estefano S. de Souza.

Para a chamada de SNVs e INDELS será utilizado o *software* GATK que durante seu fluxo de trabalho realiza o realinhamento dos dados ao redor dos INDELS e SNPs conhecidos, faz a recalibragem do valor das qualidades das sequências e por fim faz a chamada das variações, inserções e deleções. A anotação funcional e avaliação das variações é realizada através de um *script in house* que se baliza no RefSeq Genes para determinar a anotação.

Para análise das sequências geradas no SOLiD e no Ion Proton, foram selecionadas as alterações com os seguintes critérios: a) os quais apresentassem uma cobertura mínima de 10 leituras nas sequências cobrindo a base alterada, b) frequência da base alterada em no mínimo 20% das sequências.

Todas as mutações encontradas com o sequenciamento no SOLiD e Ion Proton serão confirmadas por sequenciamento pelo método de Sanger.

## 4 RESULTADOS

Neste estudo foram incluídos 128 indivíduos não relacionados. Destes, 76 (59%) preenchem critério para síndromes de câncer de mama e ovário hereditários, 20 (16%) para síndromes de câncer de mama e colorretal hereditários e 32 (25%) preenchem critério para ambos (Tabela 2). Do total de pacientes, 127 são do sexo feminino e 01 do sexo masculino.

A média de idade do diagnóstico do tumor primário neste estudo foi de 47,6 anos. Quando a idade foi estratificada pelo critério de inclusão, os pacientes HBOC apresentaram uma média de idade de 43. Os pacientes HBCC mostraram uma média de idade de 60 anos, e quando os pacientes preenchem ambos os critérios a média de idade foi de 44,3 (Tabela 2).

Pacientes portadores das mutações patogênicas apresentaram uma média de idade do diagnóstico menor (40,7 anos) em relação aos pacientes que não apresentavam mutações patogênicas.

**Tabela 2** - Características moleculares e a média de idade pelo critério de inclusão dos 128 probandos.

| <b>Critério</b> | <b>Nº de Famílias</b> | <b>Nº de portadores de com mutações BRCA1/2</b> | <b>Idade média do diagnóstico</b> |
|-----------------|-----------------------|---|-----------------------------------|
| HBOC            | 76                    | 19  | 43                                |
| HBCC            | 20                    | 1   | 60,6                              |
| HBOC+HBCC       | 32                    | 6   | 44,3                              |
| <b>Total</b>    | <b>128</b>            | <b>26</b>                                       |                                   |

HBOC: Câncer de Mama e Ovário Hereditários; HBCC: Câncer de Mama e Colón Hereditários;  
HBOC + HBCC: Câncer de Mama e Ovário Hereditários e Câncer de Mama e Colón Hereditários.

#### **4.1 RASTREAMENTO DOS GENES *BRCA1* E *BRCA2* POR SEQUENCIAMENTO DIRETO**

O rastreamento das mutações germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* por sequenciamento completo dos genes foi realizado em 128 amostras de indivíduos com critérios de câncer de mama hereditário.

As análises dos 128 pacientes completamente rastreados para estes genes identificaram 26 (20,3%) mutações em ponto (Tabela 03), entre elas: 19 foram encontradas em *BRCA1* (2 *missense*, 2 *splice*, 6 *nonsense* e 9 *frameshift*) e 7 mutações em *BRCA2* (4 *nonsense* e 3 *frameshift*), demonstrando uma frequência maior no gene *BRCA1*.

A distribuição de todas as mutações pelo critério de inclusão mostrou que dos 108 pacientes com HBOC, 26 são portadores de mutações pontuais, no entanto, dos 20 pacientes com HBCC somente um paciente é portador de mutação pontual.

#### **4.2 ALTERAÇÕES NO GENE *BRCA1* NÃO DESCRITAS**

Das 26 mutações patogênicas, sete novas variantes foram descritas pela primeira vez neste estudo, sendo cinco em *BRCA1* e duas em *BRCA2*. Seis destas alterações são únicas (Tabela 3).

No gene *BRCA1*, a paciente SM-80 foi diagnosticada com câncer de mama aos 42 anos e câncer de ovário aos 48 anos, preencheu os critérios HBOC e apresentou uma mutação do tipo *nonsense* (K443X) no éxon 11. A paciente SM-89 preencheu ambos os critérios (HBOC e HBCC) teve câncer de mama aos 40 anos, é

portadora da mutação *nonsense* no exon 13 (Y1429X). A paciente SM-102 preencheu os critérios HBCC foi diagnosticada com câncer colorretal aos 59 anos e câncer de mama aos 63 anos, é portadora da mutação *frameshift* no exon 23 (5582insT). A paciente SM-81 apresentou a mutação 5582insT, preencheu o critério HBOC e teve câncer de Falópio aos 55 anos. Os heredogramas das pacientes portadoras de mutações patogênicas nos genes *BRCA1/2* estão em Anexos (2.1 e 2.2).

**Tabela 3 -** Mutações patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

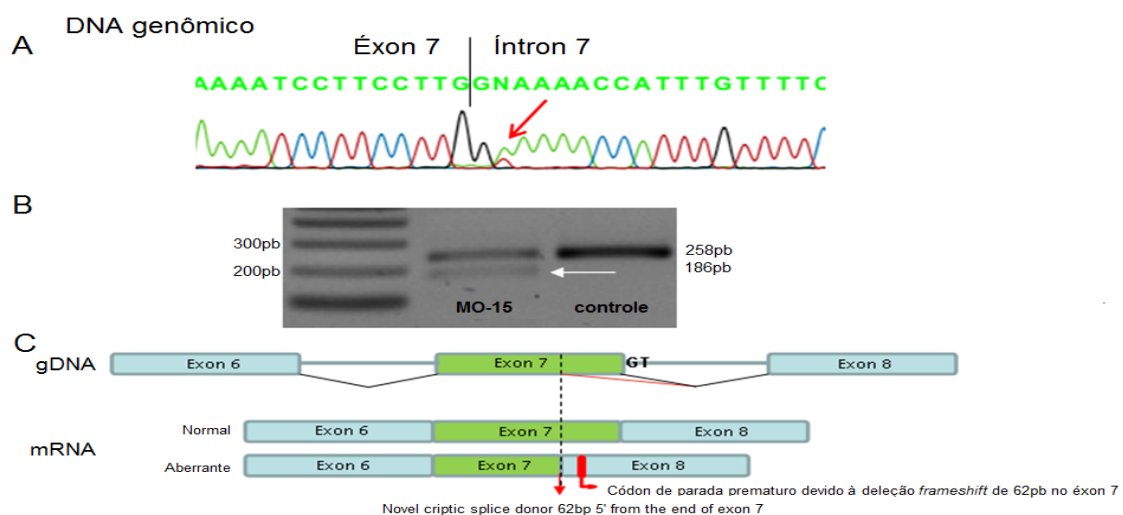
|              | Probando | Idade | Tumor            | Critério Clínico | Alteração        | Referência |
|--------------|----------|-------|------------------|------------------|------------------|------------|
|              | SM-01    | 39    | Mama             | HBOC             | c.5203delTT      | BIC        |
|              | SM-17    | 49/51 | Ovário/Mama      | HBOC             | p.L1086X         | BIC        |
|              | SM-25    | 69    | Mama             | HBOC             | c.120A>G; p.M1V  | BIC        |
|              | SM-69    | 33    | Mama             | HBOC             | p.A1708E         | BIC        |
|              | SM-74    | 50    | Hemangioblastoma | HBOC/HBCC        | c.2080delA       | BIC        |
|              | MO-07    | 34    | Mama             | HBOC             | c.5382insC       | BIC        |
|              | MO-09    | 42    | Mama             | HBOC             | c.5382insC       | BIC        |
|              | MO-45    | 48    | Mama             | HBOC             | c.5382insC       | BIC        |
| <b>BRCA1</b> | MO-13    | 32/44 | Mama/Pele        | HBOC             | c.4831del5       | BIC        |
|              | MO-26    | 37    | Mama             | HBOC             | c.1499insA       | BIC        |
|              | MO-31    | 38/63 | Mama/Endométrio  | HBOC             | p.W1815X         | BIC        |
|              | MO-37    | -     | Mama             | HBOC             | p.E1214X         | BIC        |
|              | MO-38    | 42/44 | Mama/Mama        | HBOC             | c.307T>A; p.L63X | BIC        |
|              | SM-50    | 36/47 | Mama/Mama        | HBOC/HBCC        | c.4794+1G>A      | BIC        |
|              | SM-80    | 42/48 | Mama/Ovário      | HBOC             | p.K443X          | Nova       |
|              | SM-81    | 55    | Tuba de Falópio  | HBOC             | c.5582insT       | Nova       |
|              | SM-102   | 59/63 | Colorretal/Mama  | HBCC             | c.5582insT       | Nova       |
|              | SM-89    | 40    | Mama             | HBOC/HBCC        | p.Y1429X         | Nova       |
|              | MO-15    | 43/56 | Mama/Ovário      | HBOC/HBCC        | c.560+2T>A       | Nova       |
|              | SM-08    | 33    | Mama             | HBOC             | c.6174delT       | BIC        |
|              | SM-46    | 32    | Mama             | HBOC             | p.K3161X         | BIC        |
|              | SM-61    | 51    | Mama             | HBOC             | p.K3161X         | BIC        |
| <b>BRCA2</b> | SM-104   | 32    | Mama             | HBOC             | c.3034del4       | BIC        |
|              | MO-02    | 53/63 | Mama/Mama        | HBOC             | p.R3128X         | BIC        |
|              | SM-53    | 30/49 | Mama/Tireoide    | HBOC/HBCC        | c.6242del4       | Nova       |
|              | SM-84    | 35    | Mama             | HBOC/HBCC        | p.L2732X         | Nova       |

Mutação fundadora de origem judaica Ashkenazi (em vermelho)



Além destas novas variantes detectadas em *BRCA1*, foi detectada na paciente MO-15 diagnosticada com câncer de mama bilateral aos 43 e 56 anos e câncer de ovário aos 58 anos, uma variante no sítio de *splice* (IVS7 + 2T>C), no íntron 7 do gene *BRCA1*. O resultado da análise do transcrito (mRNA) por RT-PCR usando *primers* localizados nos éxons 6 e 8, revelou um fragmento de 258 pb no controle negativo e na paciente identificou 2 fragmentos: um de 258pb e outro fragmento aberrante de 186 pb (Figura 1B).

O resultado do sequenciamento da análise do transcrito identificou a perda de 62 pb do éxon 7. A Figura 1C, mostra a representação esquemática do *stop codon* prematuro criado após a perda de 62bp do éxon 7. Estes resultados confirmaram a patogenicidade deste evento.



**Figura 1** - Caracterização da variante c.560 2+T>A no sítio de *splice* na paciente MO-15. **A.** Sequenciamento do DNA genômico do gene *BRCA1* no éxon 7 em amostra de sangue periférico. **B.** Gel de agarose mostrando produto da RT-PCR obtidos do cDNA do tumor do probando (MO-15) e da amostra controle (tumor esporádico não portador da variante c.560+2T>A) utilizando *primer forward* no éxon 6 e *primer reverse* no éxon 8 do *BRCA1* gene. No probando, foi observado dois fragmentos: um fragmento de 258pb e outro fragmento aberrante de 186pb. **C.** Representação esquemática mostrando o códon de parada prematuro criado após a perda de 62pb no éxon7 devido à variante (c.560+2T>A) no sítio de *splice*.

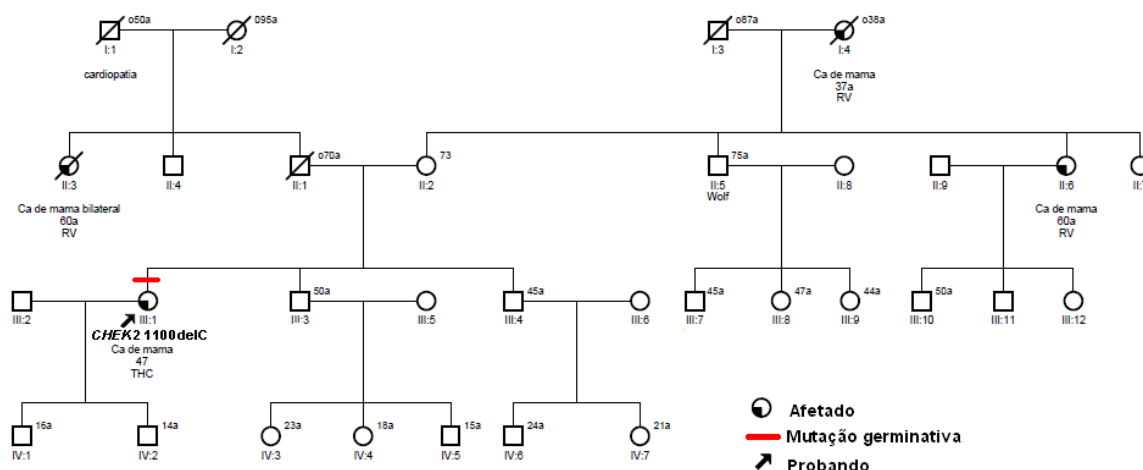
### **4.3 ALTERAÇÕES NO GENE *BRCA2* NÃO DESCRITAS**

No gene *BRCA2*, a paciente SM-84 preencheu ambos os critérios (HBOC e HBCC) e apresentou uma nova mutação *nonsense* no éxon 18 (L2732X). Esta paciente teve câncer de mama bilateral aos 45 e 52 anos, e tem uma irmã com história de câncer de mama aos 35 anos que também é portadora da mesma mutação. A paciente SM-53 preencheu ambos os critérios, possui uma história de câncer de mama aos 30 anos e câncer de tireóide aos 49 anos, e apresentou uma mutação *frameshift* (6241del4).

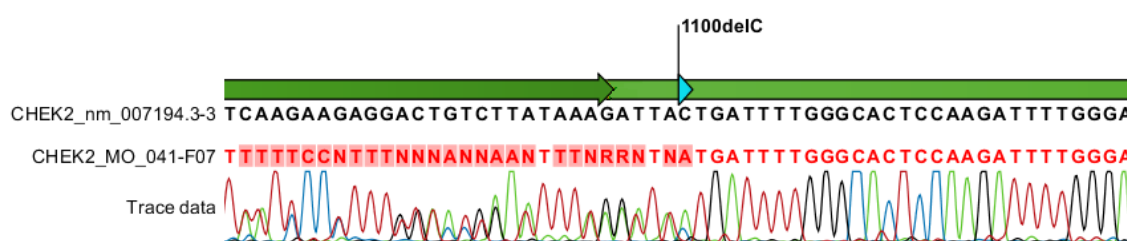
### **4.4 RASTREAMENTO DO GENE *CHEK2* POR SEQUENCIAMENTO DIRETO**

Após o término da análise dos genes *BRCA* em todos os probandos, foi realizado o sequenciamento do gene *CHEK2* no éxon 10 para a pesquisa da mutação 1100delC que é uma alteração que predispõe ao câncer de mama e cólon hereditário (Easton et al. 2004).

Todos os 128 pacientes foram avaliados para essa alteração e apenas um probando (MO-41) apresentou esta variante (Figura 3). Esta paciente (MO-41) foi diagnosticada aos 47 anos com câncer de mama lobular invasivo, triplo negativo. Sua avó teve câncer de mama aos 38 e duas tias foram afetadas com câncer de mama, ambas aos 60 anos (Figura 2). De acordo, com a histórico familiar, elas têm descendência européia.



**Figura 2** - Heredograma da paciente MO-041, portadora da mutação 1100delC. Paciente índice identificado por uma seta e círculo vermelho. Os números correspondem à idade de acometimento do câncer e idade do indivíduo.



**Figura 3** - Eletroferograma do gene *CHEK2* no éxon 10 identificou a mutação 1100delC na paciente MO-041.

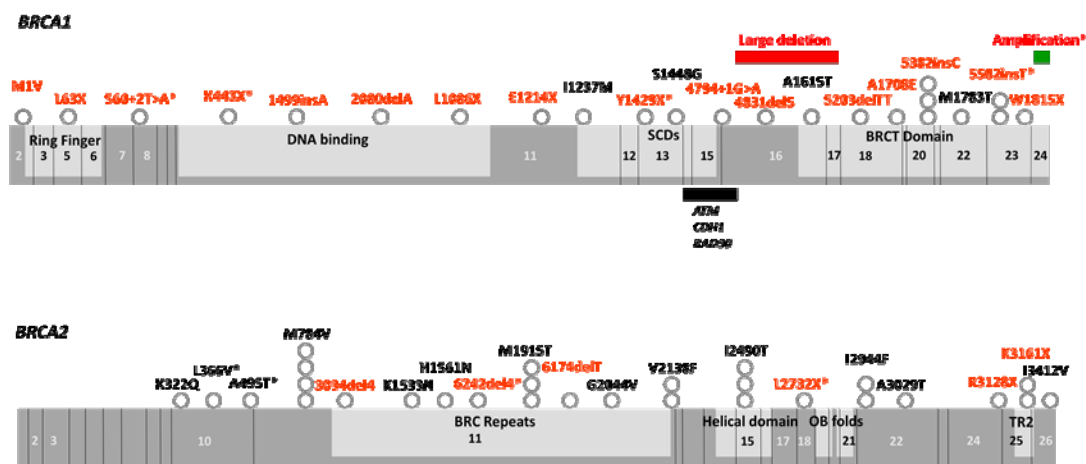
#### 4.5 VARIANTES DE SIGNIFICADO CLÍNICO DESCONHECIDO

As diferentes VUS identificadas em nosso estudo foram comparadas com dados depositados no banco de dados BIC e posteriormente foram utilizados programas de predição de patogenicidade, para avaliar o impacto na função da proteína.

No total, 18 VUS foram detectadas (4 no *BRCA1* e 14 no *BRCA2*), sendo que duas foram descritas pela primeira vez no BIC (Tabela 4). A análise *in silico* das

VUS pelos três algoritmos de predição de patogenicidade das proteínas (POLYPHEN-2, SIFT e Align-GVGD) está representada na Tabela 3. Sete variantes foram consideradas como provavelmente patogênicas em pelo menos um algoritmo, três em dois algoritmos e uma variante (p.M1783T) foi patogênica em 3 algoritmos (Tabela 4).

As distribuições das mutações patogênicas do nosso estudo e as variantes de significado desconhecido dos genes *BRCA1* e *BRCA2* com seus domínios funcionais encontram-se representadas na Figura 4.



**Figura 4** - Representação esquemática dos domínios funcionais das proteínas BRCA1 e BRCA2 com todas as mutações patogênicas e VUS identificadas. Em vermelho: todas as mutações patogênicas, e com asterisco (\*) em vermelho: variante potencialmente patogênica. Em preto: estão identificadas todas as VUS, com asterisco (\*) em preto: VUS descritas pela primeira no BIC. A frequência de cada alteração está representada pelos pontos cinza. A barra vermelha e a verde representa os rearranjos genômicos detectados. A barra preta representa o domínio de ligação da ATM, CDH1 e RAD50.

**Tabela 4** - Distribuição das variantes de significado desconhecido.

| VUS      | Nº de probandos afetados | Coocorrência com mutação patogênica | Gene         | BIC          | Análise <i>in silico</i> |          |           | IARC-LOVD database |
|----------|--------------------------|-------------------------------------|--------------|--------------|--------------------------|----------|-----------|--------------------|
|          |                          |                                     |              |              | Polyphen-2               | SIFT     | Align GVD |                    |
| p.I1237M | 1                        | Não                                 | <i>BRCA1</i> | Desconhecida | Benigna                  | Tolerada | C0        | -                  |
| p.S1448G | 1                        | Não                                 | <i>BRCA1</i> | Desconhecida | Benigna                  | Afeta    | C0        | -                  |
| p.A1615T | 1                        | Não                                 | <i>BRCA1</i> | Desconhecida | Possivelmente            | Afeta    | C0        | -                  |
| p.M1783T | 1                        | Não                                 | <i>BRCA1</i> | Desconhecida | Provavelmente            | Afeta    | C55       | -                  |
| p.K322Q  | 1                        | Não                                 | <i>BRCA2</i> | Desconhecida | Benigna                  | Afeta    | C0        | -                  |
| p.L366V  | 1                        | Não                                 | <i>BRCA2</i> | Nova         | Benigna                  | Tolerada | C0        | -                  |
| p.A495T  | 1                        | Não                                 | <i>BRCA2</i> | Nova         | Benigna                  | Tolerada | C0        | -                  |
| p.M784V  | 4                        | Não                                 | <i>BRCA2</i> | Desconhecida | Benigna                  | Tolerada | C0        | Classe 3           |
| p.K1533N | 1                        | Não                                 | <i>BRCA2</i> | Desconhecida | Benigna                  | Tolerada | C0        | -                  |
| p.H1561N | 2                        | Sim                                 | <i>BRCA2</i> | Desconhecida | Benigna                  | Tolerada | C0        | -                  |
| p.M1915T | 3                        | Não                                 | <i>BRCA2</i> | Desconhecida | Benigna                  | Tolerada | C0        | -                  |
| p.G2044V | 1                        | Sim                                 | <i>BRCA2</i> | Desconhecida | Benigna                  | Tolerada | C0        | -                  |
| p.V2138F | 2                        | Sim                                 | <i>BRCA2</i> | Desconhecida | Benigna                  | Tolerada | C0        | -                  |
| p.I2490T | 3                        | Sim                                 | <i>BRCA2</i> | Desconhecida | Benigna                  | Tolerada | C45       | -                  |
| p.I2944F | 2                        | Sim                                 | <i>BRCA2</i> | Desconhecida | Provavelmente            | Afeta    | C0        | -                  |
| p.A3029T | 1                        | Não                                 | <i>BRCA2</i> | Desconhecida | Benigna                  | Tolerada | C0        | -                  |
| p.P3039L | 1                        | Não                                 | <i>BRCA2</i> | Desconhecida | Possivelmente            | Tolerada | C0        | -                  |
| p.I3412V | 2                        | Sim                                 | <i>BRCA2</i> | Desconhecida | Benigna                  | Tolerada | C0        | -                  |

Align-GVGD: C0-menos provável interferir na função da proteína; C15, C25, C35, C45, C55 e C65-mais provável interferir na função da proteína.

Polyphen 2: variante benigna, possivelmente afeta e provavelmente afeta a proteína. SIFT: variante tolerada (benigna) ou afeta função da proteína.

LOVD-IARC: Classe 1 (não patogênica ou sem significância clínica), Classe 2 (provavelmente não patogênica ou de pouca significância clínica), Classe 3 (incerto), Classe 4 (provavelmente patogênica), Classe 5 (patogênica).

## 4.6 ANÁLISE DE SEGREGAÇÃO E AVALIAÇÃO NOS GRUPOS CONTROLES

As análises de segregação foram realizadas para variante M784V localizada no éxon 11 do gene *BRCA2*, classificada como classe 3 pelo IARC-LOVD e encontrada em 4 probandos (SM-39, SM-24, SM-20 e SM-71). Para esta análise foram avaliadas famílias afetadas com câncer de 2 probandos (Figuras 6 e 8). Além disso, essa mesma variante foi avaliada em 95 indivíduos saudáveis. Neste estudo, a variante M784V foi detectada em duas famílias (Figuras 5 e 7), mas somente em uma família a alteração segregou com a doença (Tabela 5). No grupo controle de

indivíduos saudáveis, um indivíduo apresentou esta alteração. Esses resultados sugerem que a alteração é provavelmente não patogênica.

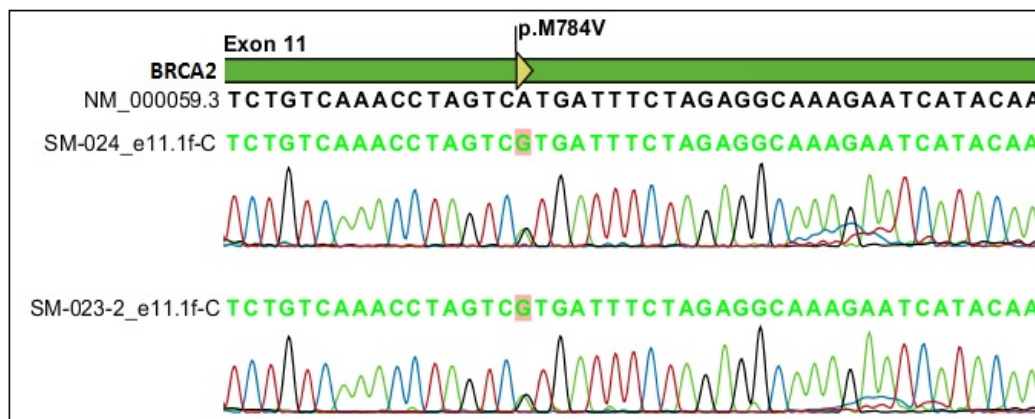
**Tabela 5** - Análise de segregação e avaliação no grupo controle das 5 VUS selecionadas.

| VUS   | Nº de famílias portadoras | Análise de segregação (nº de famílias) | ID    | Familiar afetado | Familiar não-afetado | Co-segregação das VUS na família        | Presença no grupo controle | Classificação                |
|-------|---------------------------|--|-------|------------------|----------------------|---|----------------------------|------------------------------|
| M784V | 1                         | 2                                      | SM-39 | 0(1)*            | NA                   | NS em irmã com CM (46 anos)             | 1(95)                      | Provavelmente não patogênica |
|       |                           |  | SM-24 | 1(1)*            | NA                   | S em irmã com CM bilateral (54/58 anos) |                            |                              |

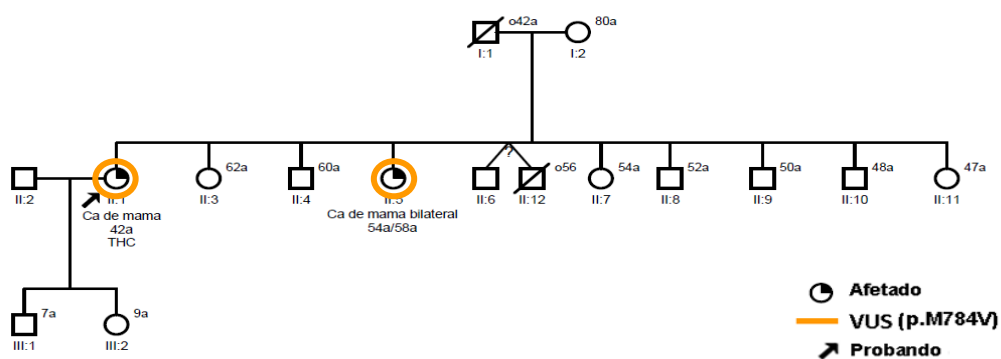
NS: não segrega; S: segrega; CM: câncer de mama.

NA = não avaliado.

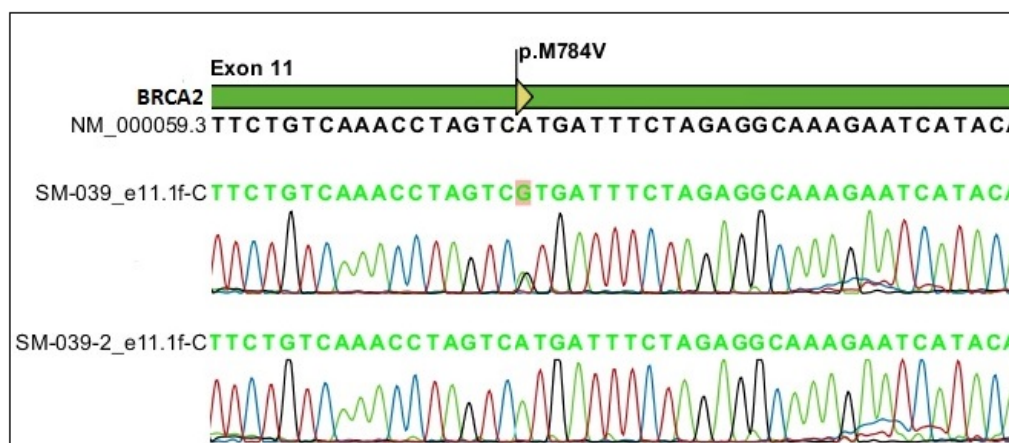
\*Número sem parênteses significa familiares portadores da alteração avaliada, número entre parênteses corresponde ao número de famílias avaliadas.



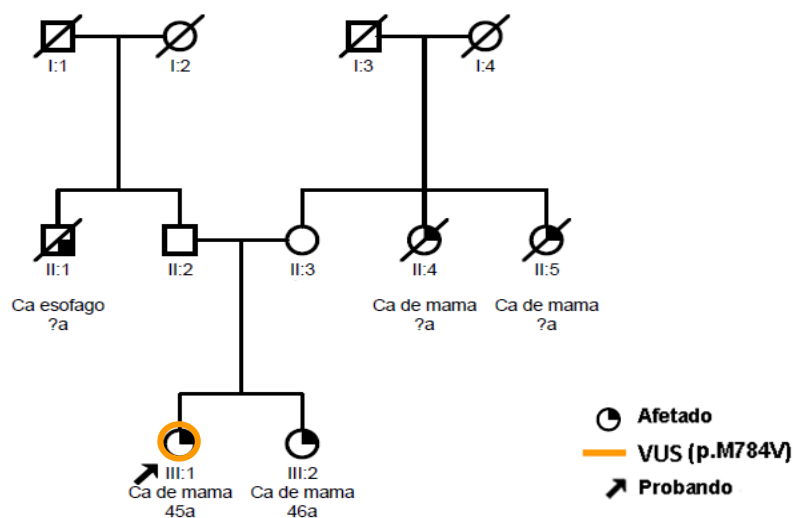
**Figura 5** - Eletroferograma do gene *BRCA2* no éxon 11 identificou uma VUS (c.2578A>G; p.M784V) na paciente SM-24 e sua irmã SM-23-2.



**Figura 6** - Heredograma da paciente SM-24, portadora da variante de significado incerto (c.2578A>G; p.M784V). Paciente índice identificado por uma seta e círculo laranja, a irmã do probando apresenta VUS. Os números correspondem à idade de acometimento do câncer e idade do indivíduo.



**Figura 7** - Eletroferograma do gene *BRCA2* no éxon 11 identificou uma VUS (c.2578A>G; p.M784V) na paciente SM-39 e sua irmã SM-39-2 não apresenta esta variante.



**Figura 8** - Heredograma da paciente SM-039, portadora da variante de significado incerto (c.2578A>G; p.M784V). Paciente índice identificado por uma seta e círculo laranja, a irmã do probando negativa para VUS. Os números correspondem à idade de acometimento do câncer e idade do indivíduo.

#### 4.7 ANÁLISE DE MLPA

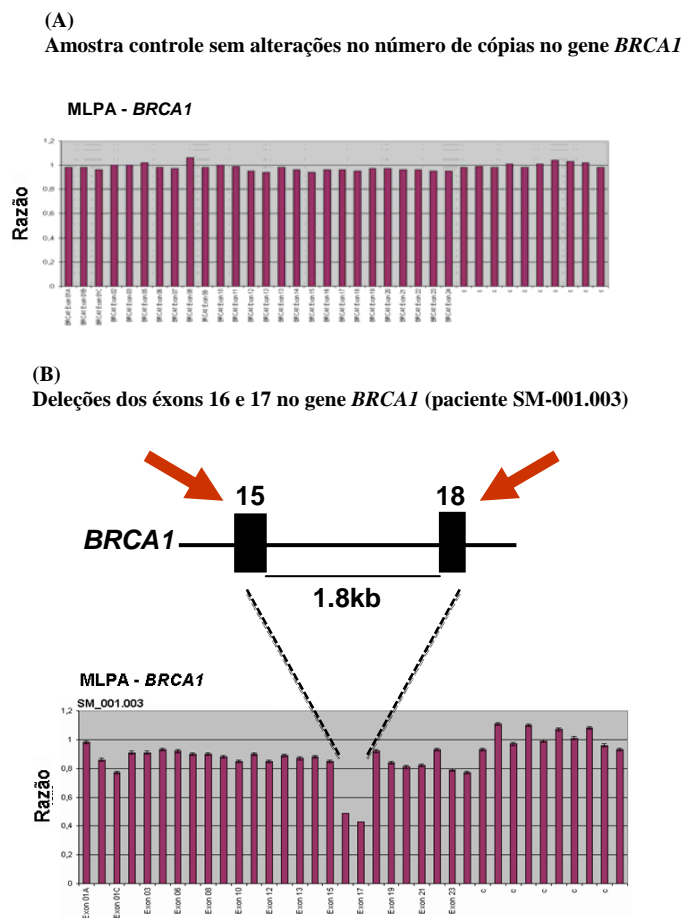
Dos 128 probandos, 101 pacientes não portadores de mutações nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *CHEK2* (1100delC) foram selecionados para a análise das alterações no número de cópias. No entanto, apenas uma amostra não apresentou quantidade de DNA suficiente para a análise dos rearranjos genômicos. Assim, 100 amostras foram rastreadas pela técnica de MLPA que identificou 2 alterações no número de cópias no gene *BRCA1*. Também foi identificado pela técnica de MLPA a deleção do éxon 3 no gene *BRCA2* (Figura 10B). Para confirmar a deleção foi realizado a técnica de PCR de longo alcance, seguido de sequenciamento do gene *BRCA2* (éxon 3), o resultado do sequenciamento revelou que não se tratava de alteração no número de cópias e sim de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP



do inglês, *single-nucleotide polymorphism*) (Figura 11). A presença deste do SNP rs115376548 pode influenciar o sinal da sonda no MLPA ([www.mlpa.com\\_protocolo/BRCA2](http://www.mlpa.com_protocolo/BRCA2)), sendo este responsável pelo resultado falso positivo detectado pela técnica de MLPA.

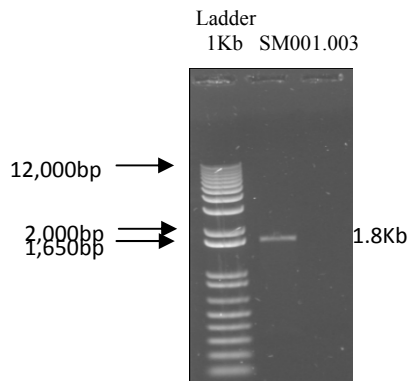
A primeira alteração no número de cópias detectada pela análise de MLPA revelou as deleções dos éxons 16 e 17 no gene *BRCA1* (Figura 9B). Para confirmar esta alteração, foi realizado a PCR de longo alcance com *primers* localizados nos íntrons 15 e 17 o qual resultou um amplicon de aproximadamente 1.8Kb (Figura 9C) na amostra da paciente, ao invés de 7.9Kb esperado para um indivíduo normal.

A segunda alteração no número de cópias foi a amplificação do éxon 24 no *BRCA1* pela técnica de MLPA (Figura 9E). Esta alteração foi confirmada pelas técnicas de *array*-CGH e Duplex qPCR (Figura 9F e 9G).

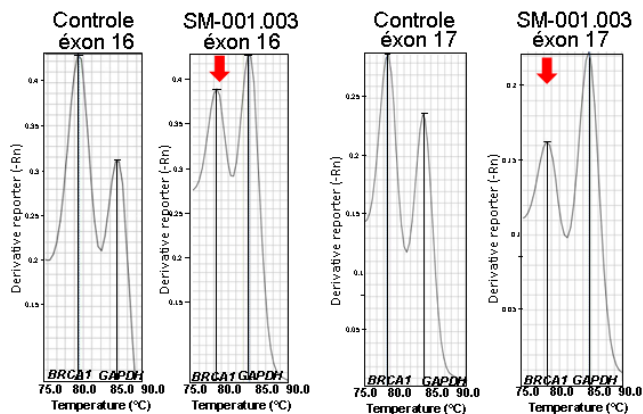


**Figura 9** - Descrição das alterações no número de cópias. (A) Resultado da análise de MLPA gerado pelo *software coffalyser* para o kit SALSA MLPA P087-B1 do gene *BRCA1* de uma amostra normal, sem a presença de deleções ou amplificações. (B) Deleções dos éxons 16 e 17 no *BRCA1* (paciente SM001.003). (C) Para confirmar esta deleção foi realizado a PCR de longo alcance com *primers* localizados nos íntrons 15 and 17, a qual resultou em um amplicon de aproximadamente 1.8kb na amostra do paciente, ao invés de um fragmento 7,9kb esperado para um indivíduo normal. (D) A técnica Duplex qPCR também confirmou esta alteração. (E) A segunda alteração no número de cópias consistiu na amplificação do éxon 24. Esta alteração foi confirmada pelas técnicas de array-CGH (F) e Duplex qPCR (G).

**(C)**  
PCR de longo alcance

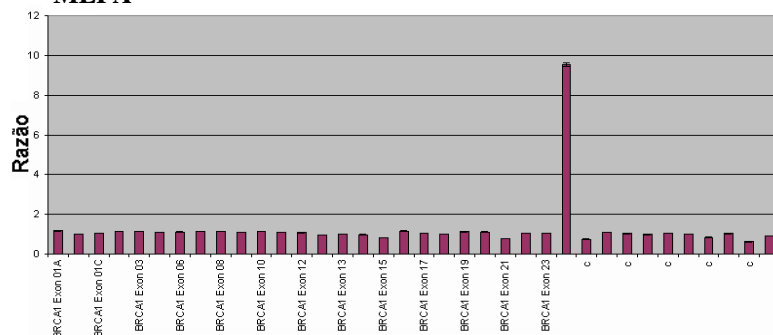


**(D)**  
Duplex qPCR

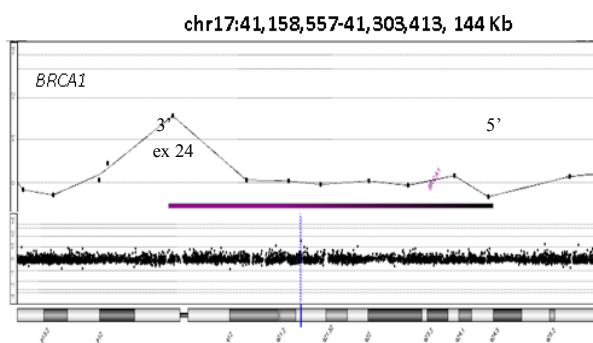


**(E)**  
Amplificação do éxon 24 no gene *BRCA1* (paciente MO-28)

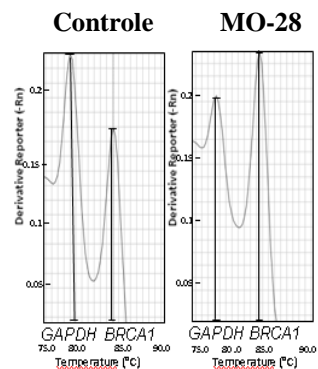
MLPA



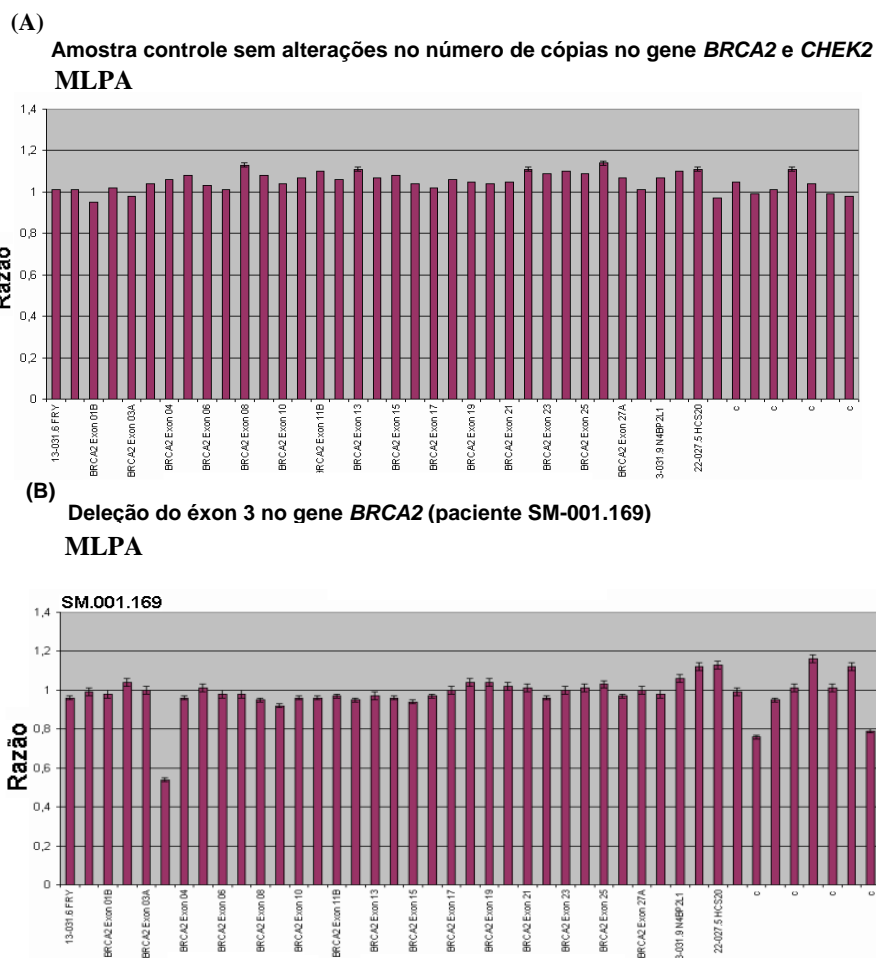
**(F)**  
Array-CGH



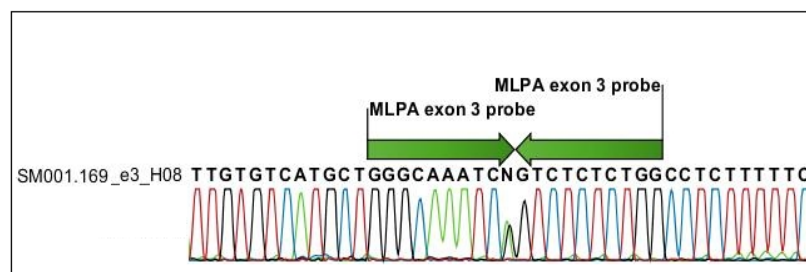
**(G)**  
Duplex qPCR



Resultado falso positivo identificado no gene *BRCA2* pela técnica de MLPA.



**Figura 10** - Descrição das alterações no número de cópias. (A) Resultado da análise de MLPA gerado pelo *software coffalyser* para o kit SALSA MLPA P045-B3 do gene *BRCA2* de uma amostra normal sem a presença de deleções ou ampliações. (B) Resultado da deleção do éxon 3 falso positivo identificado no *BRCA2* da paciente SM-001.169.



**Figura 11** - Resultado do eletroferograma do SNP identificado no *BRCA2*. Eletroferograma do gene *BRCA2* no éxon 3 da paciente SM001.169, identificou um SNP que influenciou a sonda no MLPA, e que resultou no resultado falso positivo na análise de MLPA.

#### 4.8 RASTREAMENTO DO GENE *TP53* POR SEQUENCIAMENTO DIRETO PARA SELEÇÃO DOS PACIENTES NEGATIVOS

Antes das amostras serem submetidas ao sequenciamento do exoma para encontrar novos genes de susceptibilidade, elas foram rastreadas para a mutação específica R337H no gene *TP53*. Por isso, todos os 99 pacientes negativos para mutação patogênica nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *CHEK2* (1100delC), foram rastreados para a alteração germinativa do gene *TP53* no códon 337 do éxon 10 (c.1010G>A; p. R337H). No total, esta mutação foi encontrada em três (3%) dos 99 pacientes com câncer de mama hereditário, os heredogramas dos pacientes estão descritos abaixo.

A paciente SM-31 portadora da mutação p.R337H (Figura 12), possui uma história de câncer de mama aos 49 anos, sua irmã desenvolveu câncer colorretal aos 65 anos e outra irmã com câncer de mama aos 70 anos (Anexo 2.3).



**Figura 12** - Eletroferograma do gene *TP53* no éxon 10 identificou a mutação p.R337H na paciente SM-031.

Paciente SM-36 portadora da mutação p.R337H, foi diagnosticada com câncer de mama aos 49 anos, sua irmã desenvolveu câncer de mama aos 40 anos e sua mãe com câncer de mama aos 72 anos. Além disso, uma tia materna foi diagnosticada com câncer colorretal aos 56 anos, um tio com câncer de próstata aos 80 anos e outro tio com câncer de laringe. E uma prima desenvolveu câncer de mama aos 40 anos e outro primo linfoma (Anexo 2.3).

Paciente SM-82 portadora da mutação p.R337H, desenvolveu câncer de mama aos 29 anos. A paciente possui histórico familiar de câncer, sua tia paterna desenvolveu câncer de mama aos 40 anos, e dois tios paternos apresentaram câncer de próstata e a avó paterna desenvolveu câncer gástrico (Anexo 2.3).

Todos estes resultados foram organizados em um artigo que está em revisão na revista *BMC Medical Genetic* / MS: 4367729601163499 (Anexo 9).

#### **4.9 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

As pacientes que não apresentaram mutações patogênicas e as alterações no número de cópias nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* (1100delC) e *TP53* (para este gene foi rastreado todos os éxons codificantes: éxons 2 ao 11) foram selecionados para identificação de novos genes de susceptibilidade para câncer de mama hereditário através do sequenciamento de nova geração do exoma utilizando as plataformas SOLID™5500XL e Ion Proton.

Portanto, para este estudo foram incluídas 16 mulheres não relacionadas e uma irmã de uma probando (Tabela 6), todos negativos para mutações patogênicas nos genes *BRCA1/2*, *CHEK2* (1100delC) e *TP53*. Destas pacientes, cinco amostras

foram provenientes do estudo atual (SM001.021; SM001.040; SM001.049; SM001.068 e SM001.088) e 11 amostras foram a partir de um estudo anterior (CARRARO et al. 2013). Também foram incluídos 5 probandos (CARRARO et al. 2013) portadores de mutações nos genes *BRCA1* (Figura 13).

**Tabela 6** - Dados clínicos e histopatológicos das pacientes.

| Amostra   | Gênero   | Idade<br>(Diagnóstico) | Tipo do câncer                      | Tipo Histológico | ER  | PR  | HER2 | <i>BRCA1/BRCA2</i><br>status |
|-----------|----------|------------------------|-------------------------------------|------------------|-----|-----|------|------------------------------|
| MJ1007S   | Feminino | 25                     | Câncer de mama                      | IDC              | neg | neg | neg  | WT                           |
| MJ1011S   | Feminino | 33                     | Câncer de mama                      | ILC              | pos | pos | neg  | WT                           |
| MJ2001S   | Feminino | 28                     | Câncer de mama                      | IDC              | pos | pos | pos  | WT                           |
| MJ2003S   | Feminino | 26                     | Câncer de mama                      | IDC              | neg | neg | neg  | WT                           |
| MJ2004S   | Feminino | 34                     | Câncer de mama                      | IDC              | pos | pos | neg  | VUS                          |
| MJ2007S * | Feminino | 29                     | Câncer de mama                      | IDC              | pos | pos | neg  | VUS                          |
| MJ2012S * | Feminino | 29                     | Câncer de mama                      | IDC              | neg | neg | neg  | VUS                          |
| MJ2013S   | Feminino | 29                     | Câncer de mama                      | IDC              | pos | pos | neg  | WT                           |
| MJ2014S   | Feminino | 35                     | Câncer de mama                      | MED              | neg | neg | neg  | WT                           |
| MJ2015S   | Feminino | 34                     | Câncer de mama                      | IDC              | pos | pos | neg  | VUS                          |
| MJ2016S   | Feminino | 35                     | Câncer de mama                      | IDC              | pos | pos | neg  | WT                           |
| MJ2037S   | Feminino | 28                     | Câncer de mama                      | IDC              | neg | neg | neg  | VUS                          |
| SM001.021 | Feminino | 29                     | Câncer de ovário bilateral          | IDC              | NA  | NA  | NA   | WT                           |
| SM001.040 | Feminino | 51                     | Câncer de mama                      | DCIS             | NA  | NA  | NA   | WT                           |
| SM001.049 | Feminino | 29/34                  | Melanoma/<br>Câncer de mama         | DCIS             | neg | pos | neg  | WT                           |
| SM001.068 | Feminino | 36/48                  | Câncer de mama/<br>Câncer de ovário | DCIS             | NA  | NA  | NA   | WT                           |
| SM001.088 | Feminino | 35                     | Câncer de mama                      | DCIS             | NA  | NA  | NA   | WT                           |
| MJ1014S   | Feminino | 29                     | Câncer de mama                      | ILC              | pos | pos | neg  | MUT                          |
| MJ2021S   | Feminino | 27                     | Câncer de mama                      | MET              | neg | neg | neg  | MUT                          |
| MJ2026S   | Feminino | 31                     | Câncer de mama                      | MED              | neg | neg | neg  | MUT                          |
| MJ2034S   | Feminino | 25                     | Câncer de mama                      | IDC              | neg | neg | neg  | MUT                          |
| MJ4010S   | Feminino | 35                     | Câncer de mama                      | IDC              | neg | neg | neg  | MUT                          |

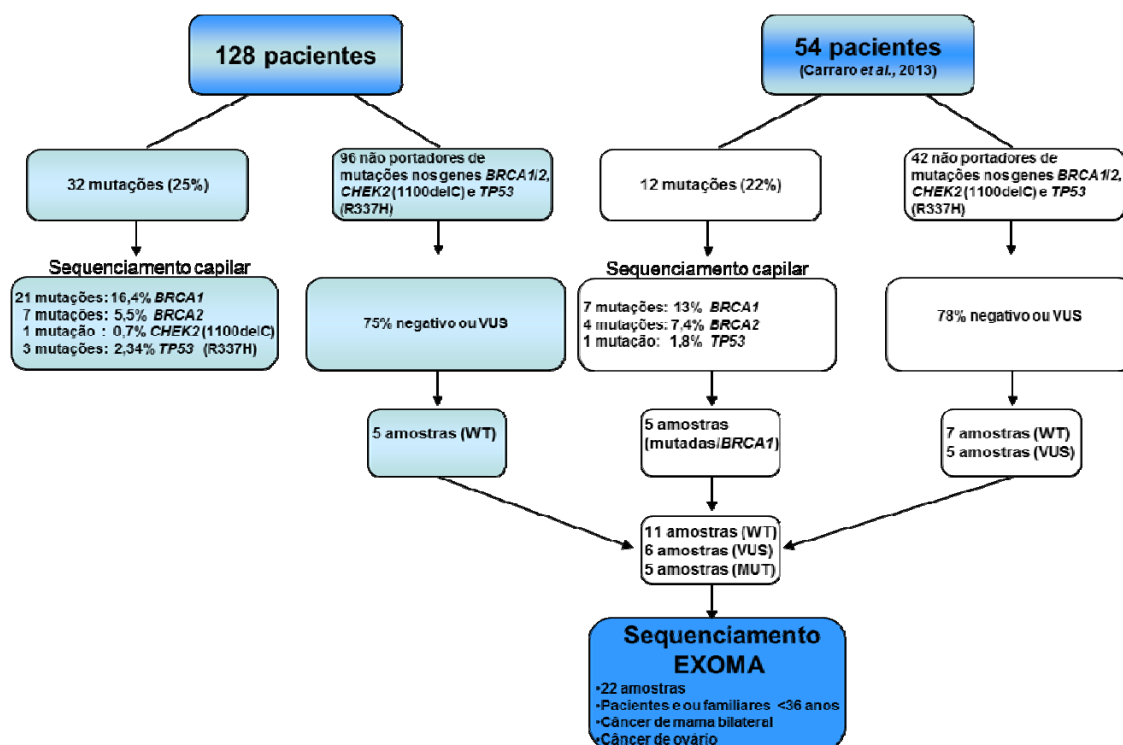
\* MJ2007S e MJ2012S são irmãs.

NA: não avaliado; CLI: carcinoma lobular invasivo; ILC: carcinoma lobular invasivo; IDC: carcinoma ductal invasivo; DCIS: carcinoma ductal *in situ*; MED: carcinoma medular; MET: carcinoma metastático; WT: *wide type*; VUS: variante de significado incerto; MUT: mutação patogênica.

As pacientes foram selecionadas de acordo com os critérios bem estridentes de história familiar de câncer de mama, paciente e/ou familiares diagnosticados com câncer de mama em idade precoce (<36 anos).

Inicialmente, foi utilizada a plataforma SOLID™5500XL a fim de sequenciarmos as regiões exônicas. No entanto, algumas amostras não geraram

dados suficientes para análise de bioinformática. E para aumentar a taxa de cobertura das regiões alvo destas amostras, optamos em sequenciar na plataforma Ion Proton, uma tecnologia que está disponível no Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE) – A.C.Camargo Cancer Center, e que fornece dados de sequenciamentos mais rápidos, além disso, o resultado da porcentagem de cobertura da região alvo na plataforma Ion Proton é maior do que nas amostras sequenciadas pela plataforma SOLID.



**Figura 13** - Fluxograma representando os 2 grupos referente ao sequenciamento do exoma das amostras em estudo



Os resultados dos sequenciamentos dos exomas de 17 amostras negativas para mutações nas regiões codificantes dos genes *BRCA1/2*, *CHEK2* (1100delC) e *TP53* foram obtidos. Também foram realizados os sequenciamentos de cinco pacientes portadoras de mutações nos genes *BRCA1*, nos quais os dados gerados foram utilizados para facilitar a filtragem das variantes. Os resultados das alterações genéticas encontradas nestas pacientes foram filtrados e os dados gerados de todas as amostras foram submetidos à análise de bioinformática.

Em média, 72.643.595 *reads* (*reads* = leituras) foram geradas para cada paciente, dos quais 82% foram mapeadas nas regiões de interesse (Tabela 7). A média de cobertura obtida para as regiões alvos foi de 89,78%. Pelo menos, 74,86% das regiões alvos capturadas foram cobertas por 10 ou mais *reads* para todas as amostras o que está de acordo com a literatura.

As alterações germinativas foram identificadas pelo programa GATK de acordo com os seguintes critérios: 1) Cobertura das regiões alvos no mínimo 10x (10 *reads*); 2) Frequência do alelo presente em pelo menos 20% do total de *reads*; 3) Seleção de novas variantes (ausentes no banco dados dbSNP); e finalmente 4) Apresentar impacto na sequência da proteína.

No total foram detectadas 18.557 SNVs (variações de nucleotídeos) e 170 INDELS (inserções e deleções), uma média de 1.092 SNVs (mínimo 284 e máximo 2.051) e 15 INDELS (mínimo 8 e máximo 20) foram detectadas para cada paciente (Tabela 09). E para seleção das variantes mais robustas e com maior chance de estarem relacionadas com o aumento de risco no desenvolvimento de câncer de mama, nós utilizamos um filtro controle (que são as 5 pacientes portadoras de mutações no gene *BRCA1*) este critério foi utilizado para descartar as variantes

comuns encontradas nos controles e nas amostras em estudo, isso resultou em 3.130 SNVs e 77 INDELS: uma média de 184,2 SNVs e 7 INDELS para cada paciente.

Como esperado, a maioria das SNVs encontradas foram do tipo missense, sendo: 2.964 *missense* ou variações não sinônimas (NSY, do inglês *non-synonymous variation*), 107 *nonsense*, 56 sítios de *splice* nas extremidades 3' ou 5' e 3 *miss of stop codon*; e 77 INDELS: 74 *frameshift* e 3 sítios de *splice* na extremidade 3' (Tabela 9).

Os resultados das INDELS nas amostras processadas no Ion Proton foram excluídos nesta etapa do estudo, uma vez que o número de INDELS foi extremamente alto, quando comparados com dados obtidos na plataforma SOLiD, sinalizando artefatos de alinhamento.

**Tabela 7 - Resultados da cobertura do sequenciamento das regiões exônicas**

| Amostra     | Status BRCA1/BRCA2 | Plataforma | Kit de captura | Total de Fragmentos | Reads on targets | Total de reads mapeadas (%) | % Reads on targets | % Reads off targets | % Targets covered | % Targets coverage >10x | % Targets coverage >20x |
|-------------|--------------------|------------|----------------|---------------------|------------------|-----------------------------|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------------|-------------------------|
| MJ2001S     | WT                 | SOLID      | Agilent        | 22.608.845          | 21.478.980       | 86,40                       | 62,24              | 37,76               | 79,34             | 44,02                   | 26,76                   |
| MJ2001S     | WT                 | Proton     | Life           | 100.437.369         | 55.683.649       | 96,49                       | 57,46              | 42,54               | 98,10             | 88,34                   | 76,43                   |
| MJ2004S     | VUS                | SOLID      | Agilent        | 66.642.174          | 68.991.869       | 59,25                       | 99,30              | 0,70                | 89,81             | 74,93                   | 64,77                   |
| MJ2013S     | WT                 | SOLID      | Agilent        | 76.278.654          | 44.918.683       | 59,00                       | 99,32              | 0,68                | 90,19             | 76,85                   | 67,51                   |
| MJ2015S     | VUS                | SOLID      | Agilent        | 42.867.924          | 26.430.667       | 61,77                       | 99,29              | 0,71                | 88,54             | 70,52                   | 56,56                   |
| MJ2016S     | WT                 | SOLID      | Agilent        | 47.162.147          | 28.316.458       | 60,15                       | 99,29              | 0,71                | 88,82             | 71,52                   | 58,76                   |
| MJ2037S     | VUS                | SOLID      | Agilent        | 233.210.657         | 158.497.176      | 68,01                       | 99,62              | 0,38                | 92,41             | 84,49                   | 80,03                   |
| SM001.021   | WT                 | SOLID      | Agilent        | 27.828.535          | 18.888.071       | 86,71                       | 65,48              | 34,52               | 81,91             | 56,19                   | 38,40                   |
| SM001.021   | WT                 | Proton     | Life           | 80.762.109          | 50.647.640       | 99,02                       | 63,33              | 36,67               | 98,46             | 94,59                   | 91,71                   |
| SM001.040   | VUS                | Proton     | Life           | 76.278.881          | 43.449.000       | 98,54                       | 57,80              | 42,20               | 98,45             | 94,28                   | 91,30                   |
| SM001.049   | WT                 | SOLID      | Agilent        | 35.382.516          | 24.891.676       | 87,86                       | 66,88              | 33,12               | 82,47             | 59,77                   | 44,09                   |
| SM001.049   | WT                 | Proton     | Life           | 117.677.088         | 56.086.743       | 97,11                       | 49,08              | 50,92               | 98,27             | 89,89                   | 80,60                   |
| SM001.068   | WT                 | SOLID      | Agilent        | 25.058.282          | 17.480.288       | 88,14                       | 66,11              | 33,89               | 81,51             | 54,81                   | 36,58                   |
| SM001.068   | WT                 | Proton     | Life           | 86.103.064          | 55.702.353       | 98,86                       | 65,44              | 34,56               | 98,42             | 95,00                   | 92,87                   |
| SM001.088   | WT                 | SOLID      | Agilent        | 43.460.502          | 29.074.293       | 88,6                        | 63,77              | 36,23               | 85,98             | 66,11                   | 51,26                   |
| SM001.088   | WT                 | Proton     | Life           | 70.628.633          | 47.244.323       | 98,97                       | 67,59              | 32,41               | 98,23             | 94,20                   | 91,08                   |
| MJ2007S     | VUS #              | SOLID      | Agilent        | 54.050.453          | 29.981.900       | 55,59                       | 99,33              | 0,67                | 88,37             | 70,52                   | 57,88                   |
| MJ2012S     | VUS #              | SOLID      | Agilent        | 55.205.611          | 32.826.544       | 59,57                       | 99,29              | 0,71                | 90,40             | 75,43                   | 62,73                   |
| MJ2014S     | WT                 | SOLID      | Agilent        | 86.169.309          | 64.255.635       | 78,05                       | 85,55              | 14,45               | 95,09             | 85,96                   | 79,07                   |
| MJ2003S     | WT                 | SOLID      | Agilent        | 123.138.848         | 85.493.240       | 76,75                       | 76,55              | 23,45               | 94,62             | 84,17                   | 77,33                   |
| MJ1007S     | WT                 | SOLID      | Agilent        | 29.884.585          | 16.854.403       | 56,44                       | 99,70              | 0,30                | 80,89             | 56,34                   | 38,86                   |
| MJ1011S     | WT                 | SOLID      | Agilent        | 67.265.396          | 41.569.796       | 61,90                       | 99,39              | 0,61                | 90,83             | 78,17                   | 69,23                   |
| MJ1014S     | MUT                | SOLID      | Agilent        | 90.690.934          | 54.055.491       | 59,71                       | 99,30              | 0,70                | 91,28             | 80,28                   | 72,43                   |
| MJ2021S     | MUT                | SOLID      | Agilent        | 35.367.334          | 18.778.450       | 53,13                       | 99,72              | 0,28                | 79,21             | 54,11                   | 36,84                   |
| MJ2026S     | MUT                | SOLID      | Agilent        | 81.757.700          | 62.233.792       | 76,17                       | 99,69              | 0,31                | 87,05             | 75,75                   | 67,22                   |
| MJ2034S     | MUT                | SOLID      | Agilent        | 151.834.749         | 106.241.670      | 77,41                       | 76,82              | 23,18               | 94,64             | 84,57                   | 78,42                   |
| MJ4010S     | MUT                | SOLID      | Agilent        | 33.624.773          | 20.647.504       | 61,45                       | 99,72              | 0,28                | 80,73             | 60,45                   | 45,52                   |
| Média total |                    |            |                | 72.643.595          | 47.434.085       | 75,97                       | 82,11              | 17,89               | 89,78             | 74,86                   | 64,23                   |

WT: Wild type; VUS: variantes de significado incerto; MUT: mutação patogênica;# : MJ2007S e MJ2012S (irmãs); % Reads on targets: porcentagem de reads na região alvo; % Reads off targets: porcentagem reads fora da região alvo; % Targets covered: porcentagem da região alvo coberta; % Targets coverage > 10x: porcentagem da cobertura da região alvo maior que 10 reads; % Targets coverage > 20x: porcentagem da cobertura da região alvo maior que 20 reads.

**Tabela 8 - Resultados das alterações (SNVs e INDELS) encontradas nos probandos**

|                      | MJ1007S      | MJ1011S      | MJ2001S    | MJ2003S    | MJ2004S      | MJ2007S      | MJ2012S      | MJ2013S      | MJ2014S    | MJ2015S      | MJ2016S      | MJ2037S      | SM001.021  | SM001.040  | SM001.049  | SM001.068  | SM001.088  | MJ1014S      | MJ2021S    | MJ2026S      | MJ2034S    | MJ4010S      | média | mínimo | máximo |
|----------------------|--------------|--------------|------------|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------------|--------------|--------------|--------------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------|------------|--------------|------------|--------------|-------|--------|--------|
| <b>Total: SNVs</b>   | <b>1.479</b> | <b>1.594</b> | <b>347</b> | <b>682</b> | <b>1.741</b> | <b>1.591</b> | <b>1.629</b> | <b>1.744</b> | <b>843</b> | <b>1.694</b> | <b>1.629</b> | <b>2.051</b> | <b>299</b> | <b>298</b> | <b>326</b> | <b>284</b> | <b>326</b> | <b>1.873</b> | <b>972</b> | <b>2.756</b> | <b>617</b> | <b>1.140</b> | 1.092 | 284    | 2.051  |
| SYN                  | 343          | 378          | 138        | 211        | 428          | 381          | 390          | 434          | 212        | 406          | 400          | 536          | 101        | 101        | 122        | 111        | 129        | 461          | 219        | 618          | 189        | 275          | 283,6 | 101    | 536    |
| NSY                  | 1057         | 1112         | 199        | 430        | 1199         | 1111         | 1138         | 1184         | 577        | 1177         | 1122         | 1367         | 193        | 184        | 192        | 163        | 190        | 1282         | 673        | 1962         | 388        | 802          | 740,9 | 163    | 1.367  |
| STP                  | 53           | 45           | 7          | 11         | 46           | 49           | 47           | 46           | 18         | 52           | 54           | 53           | 3          | 6          | 6          | 6          | 4          | 54           | 58         | 94           | 11         | 38           | 29,8  | 3      | 54     |
| MST                  | 1            | 2            |            |            | 3            | 5            | 4            | 3            | 1          | 3            |              | 6            |            | 1          |            |            |            | 5            | 2          | 3            |            | 2            | 2,9   | 1      | 6      |
| Splice               | 25           | 57           | 3          | 30         | 65           | 45           | 50           | 77           | 35         | 56           | 53           | 89           | 2          | 6          | 6          | 4          | 3          | 71           | 20         | 79           | 29         | 23           |       |        |        |
| <b>Total: INDELS</b> | <b>12</b>    | <b>8</b>     | <b>ND</b>  | <b>11</b>  | <b>20</b>    | <b>18</b>    | <b>15</b>    | <b>15</b>    | <b>19</b>  | <b>19</b>    | <b>18</b>    | <b>15</b>    | <b>ND</b>  | <b>ND</b>  | <b>ND</b>  | <b>ND</b>  | <b>ND</b>  | <b>16</b>    | <b>5</b>   | <b>30</b>    | <b>20</b>  | <b>10</b>    | média | mínimo | máximo |
| Splice               |              |              | ND         |            |              | 1            |              | 1            |            |              |              | 1            | ND         | ND         | ND         | ND         | ND         |              |            | 1            | 1          |              | 1     | 1      | 1      |
| éxons                | 12           | 8            | ND         | 11         | 20           | 17           | 15           | 14           | 19         | 19           | 18           | 14           | ND         | ND         | ND         | ND         | ND         | 16           | 5          | 29           | 19         | 10           | 15    | 8      | 20     |

\*ND: não foram determinadas as INDELS processadas no Ion Proton

**Tabela 9 - Resultados das alterações (SNVs e INDELS) encontradas com filtro controle**

|  | MJ1007S    | MJ1011S    | MJ2001S    | MJ2003S    | MJ2004S    | MJ2007S    | MJ2012S    | MJ2013S    | MJ2014S    | MJ2015S    | MJ2016S    | MJ2037S    | SM001.021  | SM001.040  | SM001.049  | SM001.068  | SM001.088  | MJ1014S | MJ2021S | MJ2026S | MJ2034S | MJ4010S | Total |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|
| <b>Total: SNVs (com filtro controle)</b>   | <b>341</b> | <b>186</b> | <b>142</b> | <b>118</b> | <b>209</b> | <b>245</b> | <b>223</b> | <b>227</b> | <b>150</b> | <b>190</b> | <b>204</b> | <b>268</b> | <b>133</b> | <b>144</b> | <b>127</b> | <b>107</b> | <b>116</b> | -       | -       | -       | -       | -       | 3130  |
| NSY  | 316        | 178        | 140        | 114        | 199        | 230        | 214        | 213        | 146        | 176        | 189        | 250        | 129        | 133        | 122        | 102        | 113        |         |         |         |         |         | 2964  |
| STP  | 19         | 5          | 2          | 2          | 6          | 11         | 6          | 4          | 2          | 9          | 13         | 10         | 3          | 6          | 3          | 3          | 3          |         |         |         |         |         | 107   |
| MST  |            |            |            |            |            |            |            | 1          |            | 1          |            |            |            | 1          |            |            |            |         |         |         |         |         | 3     |
| Splice                                     | 6          | 3          |            | 2          | 4          | 4          | 3          | 9          | 2          | 4          | 2          | 8          | 1          | 4          | 2          | 2          |            |         |         |         |         |         | 56    |
| <b>Total: INDELS (com filtro controle)</b> | <b>9</b>   | <b>4</b>   | <b>ND</b>  | <b>4</b>   | <b>8</b>   | <b>9</b>   | <b>5</b>   | <b>6</b>   | <b>9</b>   | <b>7</b>   | <b>8</b>   | <b>8</b>   | <b>ND</b>  | <b>ND</b>  | <b>ND</b>  | <b>ND</b>  | <b>ND</b>  | -       | -       | -       | -       | -       | 77    |
| Splice                                     |            |            | ND         |            |            | 1          |            | 1          |            |            |            | 1          | ND         | ND         | ND         | ND         | ND         |         |         |         |         |         | 3     |
| éxons                                      | 9          | 4          | ND         | 4          | 8          | 8          | 5          | 5          | 9          | 7          | 8          | 7          | ND         | ND         | ND         | ND         | ND         |         |         |         |         |         | 74    |

\*ND: não foram determinadas as INDELS processadas no Ion Proton

Uma vez que nós tínhamos dentro da casuística 2 irmãs (MJ 2007 e MJ 2012) afetadas, nós fomos olhar as alterações comuns entre elas e que não estavam presentes nas amostras controles e depois selecionar entre as possíveis variantes genéticas aquela com maior chance de estar associada ao risco de desenvolver câncer de mama. Essa análise resultou na identificação de 59 variantes promissoras (Tabela 10), sendo que, uma delas encontrada no gene *ERBB2* parece ser um potencial candidato para gene de susceptibilidade ao câncer de mama.

**Tabela 10 - Distribuição das 59 alterações comuns encontradas nas irmãs.**

| Gene      | Chr <sup>a</sup> | Position Gen | Classificação da variante | Tipo da variante | cDNA       | Proteína   | Função  | Polyphen 2 |
|-----------|------------------|--------------|---------------------------|------------------|------------|------------|---|------------|
| ACV11C    | 2                | 158406883    | Missense                  | SNV              | c.566G>A   | p.R189K    | Apoptosis; cell differentiation; regulation of apoptosis; ATP binding   | Neutra     |
| ADAMTS17  | 15               | 100802617    | Missense                  | SNV              | c.813G>T   | p.Q271H    | Metalloendopeptidase activity; zinc ion binding   | Neutra     |
| ALAS1     | 3                | 52248149     | Missense                  | SNV              | c.1876A>G  | p.K626E    | Heme biosynthetic process; pyridoxal phosphate binding; transferase activity  | Neutra     |
| ANKRD30A  | 10               | 37486387     | Missense                  | SNV              | c.2527A>G  | p.N843D    | DNA binding; sequence-specific DNA binding transcription factor activity  | Deletéria  |
| ANKRD30A  | 10               | 37430688     | Missense                  | SNV              | c.695C>T   | p.A232V    | DNA binding; Sequence-specific DNA binding transcription factor activity  | Neutra     |
| AP4E1     | 15               | 51289916     | Missense                  | SNV              | c.2740A>C  | p.I914L    | Intracellular protein transport; vesicle-mediated transport   | Neutra     |
| AU19      | 7                | 32609992     | Missense                  | SNV              | c.1276G>A  | p.V426I    |   | Neutra     |
| BBS7      | 4                | 122749810    | Missense                  | SNV              | c.1750G>A  | p.A584T    | Regulation of transcription, DNA-dependent; transcription, DNA-dependent  | Neutra     |
| BRC1A1    | 17               | 41222968     | Missense                  | SNV              | c.4963T>C  | p.S1655P   | Double-strand break repair via homologous recombination; ubiquitin-protein ligase activity; zinc ion binding                  | Deletéria  |
| C14orf135 | 14               | 60581596     | Missense                  | SNV              | c.166C>T   | p.R56W     |   | Neutra     |
| C9orf131  | 9                | 35043494     | Missense                  | SNV              | c.868C>A   | p.P290T    |   | Neutra     |
| CASC5     | 15               | 40897315     | Missense                  | SNV              | c.43A>G    | p.I15V     | Protein binding; attachment of spindle microtubules to kinetochore; cell division   | Neutra     |
| CCDC67    | 11               | 93118668     | Missense                  | SNV              | c.894A>T   | p.L298F    |   | Deletéria  |
| CD4       | 12               | 6923332      | Missense                  | SNV              | c.239C>A   | p.A40D     | Cell adhesion; glycoprotein binding; MHC class II protein binding; protein homodimerization activity                          | Neutra     |
| CEP350    | 1                | 180003186    | Frameshift                | INDEL            | c.3914del3 | p.R1310Sf5 |   | NA         |
| DCAF12L2  | X                | 125298644    | Missense                  | SNV              | c.1264G>C  | p.G422R    |   | Neutra     |
| DNAAF9    | 10               | 75003606     | Missense                  | SNV              | c.658A>G   | p.I220V    | Heat shock protein binding; unfolded protein binding  | Deletéria  |
| DYDC1     | 10               | 82111739     | Missense                  | SNV              | c.167A>G   | p.K56R     |   | Neutra     |
| DYM       | 18               | 46798645     | Missense                  | SNV              | c.1154A>C  | p.H385P    |   | Deletéria  |
| ERBB2     | 17               | 37865694     | Missense                  | SNV              | c.563G>A   | p.R188H    | Cell proliferation; protein heterodimerization activity; epidermal growth factor receptor activity                            | Neutra     |
| FAM120B   | 6                | 170527625    | Missense                  | SNV              | c.1147G>G  | p.P383A    | Cell differentiation; regulation of transcription, DNA-dependent; transcription, DNA-dependent; protein binding               | Deletéria  |
| GIGYF2    | 2                | 233655492    | Missense                  | SNV              | c.797G>A   | p.R266Q    | Protein binding; cell death   | Deletéria  |
| GPR160    | 3                | 169802505    | Missense                  | SNV              | c.745C>T   | p.L249F    | G-protein coupled receptor activity   | Neutra     |
| HEATR7B2  | 5                | 41064591     | Frameshift                | INDEL            | c.444del8  | p.K148fs   |   | NA         |
| INOB8     | 15               | 41276474     | Missense                  | SNV              | c.3998C>G  | p.A1333G   | Cell division; cellular response to ionizing radiation; chromatin remodeling; double-strand break repair                      | Deletéria  |
| KIAA1432  | 9                | 5763447      | Missense                  | SNV              | c.2183C>G  | p.A728G    |   | Neutra     |
| KIF27     | 9                | 85495313     | Missense                  | SNV              | c.2542G>G  | p.M849V    | ATP binding; microtubule motor activity   | Deletéria  |
| KIF3A     | 5                | 132051953    | Missense                  | SNV              | c.938A>G   | p.N313S    | ATP binding; plus-end-directed microtubule motor activity; protein binding; organelle organization                            | Deletéria  |
| LRR2      | 3                | 46580553     | Missense                  | SNV              | c.472C>T   | p.H158Y    |   | Neutra     |
| LRR2      | 3                | 46580553     | Missense                  | SNV              | c.472C>T   | p.H158Y    |   | Neutra     |
| MET       | 7                | 116380062    | Missense                  | SNV              | c.1451A>G  | p.H484R    | Cell proliferation; ATP binding; hepatocyte growth factor receptor activity; protein binding                                  | Deletéria  |
| MUC5B     | 11               | 1271422      | Missense                  | SNV              | c.14731G>T | p.A9115I   | Cell adhesion; extracellular matrix structural constituent; protein binding   | NA         |
| NAE1      | 16               | 66842455     | Missense                  | SNV              | c.1299T>G  | p.D433E    | Apoptosis; cell cycle; catalytic activity [protein heterodimerization activity  | Neutra     |
| NAV1      | 1                | 201763616    | Missense                  | SNV              | c.3428G>A  | p.R1343C   | Cell differentiation; nervous system development; nucleotide binding  | Deletéria  |
| NCKIPSD   | 3                | 48716158     | Missense                  | SNV              | c.1894C>T  | p.R620C    | Cytoskeleton organization; cytoskeletal protein binding; SH3 domain binding   | Deletéria  |
| NES       | 1                | 156639411    | Missense                  | SNV              | c.4859G>T  | p.M1523I   | Intermediate filament binding; structural molecule activity; negative regulation of apoptosis                                 | Deletéria  |
| OTX2      | 14               | 57268889     | Missense                  | SNV              | c.434G>A   | p.S145N    | Positive regulation of embryonic development; regulation of fibroblast growth factor receptor signaling pathway               | Neutra     |
| PARN      | 16               | 14540931     | Missense                  | SNV              | c.1678G>T  | p.A560S    | Protein binding; metal ion binding; mRNA 3'-UTR binding; nucleotide binding; poly(A)-specific ribonuclease activity           | Neutra     |
| PCNT      | 21               | 47754656     | Missense                  | SNV              | c.613G>C   | p.A205P    | Calmodulin binding; G2/M transition of mitotic cell cycle   | Neutra     |
| PNMA3     | X                | 152226640    | Missense                  | SNV              | c.1228C>T  | p.R410C    | Apoptosis; nucleic acid binding; zinc ion binding   | Neutra     |
| POLA1     | X                | 24861673     | Missense                  | SNV              | c.3908T>C  | p.M1303I   | Cell proliferation; DNA replication checkpoint; chromatin binding; double-strand break repair via nonhomologous end joining   | Neutra     |
| POT1C     | 18               | 34542928     | Missense                  | SNV              | c.2182G>A  | p.R79K     |   | Neutra     |
| PPIRC     | 1                | 198661482    | Missense                  | SNV              | c.74G>C    | p.S25T     | Negative regulation of cytokine-mediated signaling pathway; negative regulation of protein kinase activity                    | Neutra     |
| PPIRD     | 9                | 8501026      | Missense                  | SNV              | c.1856C>T  | p.T619I    | Protein binding; transmembrane receptor protein tyrosine phosphatase activity   | Neutra     |
| RFTN1     | 3                | 16419492     | Missense                  | SNV              | c.559G>A   | p.A187T    |   | Neutra     |
| RSN1L1    | 7                | 77397997     | Missense                  | SNV              | c.1502C>T  | p.T501M    |   | NA         |
| SLC22A16  | 16               | 110778047    | Frameshift                | INDEL            | c.227delC  | p.A76fs    | Carnitine transporter activity; acid secretion [cell differentiation  | NA         |
| SLC22A9   | 1                | 205808427    | Missense                  | SNV              | c.775G>T   | p.A259S    | Chloride channel activity; secondary active sulfate transmembrane transporter activity  | Deletéria  |
| SLC5A4    | 22               | 32643447     | Frameshift                | INDEL            | c.428delC  | p.V143fs   | Symporter activity; carbohydrate transport; sodium ion transport  | NA         |
| SNTG1     | 8                | 51442753     | Missense                  | SNV              | c.493A>G   | p.T165A    | Actin binding; protein C-terminus binding; cell communication   | Deletéria  |
| SPRED1    | 15               | 38643483     | Nonsense                  | SNV              | c.95T>A    | p.L318*    | Inactivation of MAPK activity; DNA binding; zinc ion binding  | NA         |
| SSX1      | X                | 48118043     | Missense                  | SNV              | c.257A>G   | p.N86S     | Negative regulation of apoptosis; positive regulation of intermediate filament depolymerization; structural molecule activity | Deletéria  |
| TCEG1     | 5                | 145849258    | Missense                  | SNV              | c.1350T>A  | p.N450K    | protein binding; transcription coactivator activity; regulation of transcription, DNA-dependent                               | Deletéria  |
| TEX1      | X                | 69748976     | Missense                  | SNV              | c.2792A>G  | p.H931R    | Protein binding   | Deletéria  |
| TRIM2     | 4                | 154255972    | Missense                  | SNV              | c.2089G>G  | p.D637Y    | Zinc ion binding  | Deletéria  |
| UBE2J1    | 6                | 90042906     | Missense                  | SNV              | c.577G>C   | p.G193R    | ATP binding; ubiquitin-protein ligase activity  | Neutra     |
| ZDBF2     | 2                | 207176196    | Missense                  | SNV              | c.6944G>A  | p.R2315Q   | Nucleic acid binding; zinc ion binding  | Neutra     |
| ZNF30     | 19               | 35434672     | Missense                  | SNV              | c.802G>T   | p.A268S    | Regulation of transcription, DNA-dependent; DNA binding; zinc ion binding   | NA         |
| ZNF563    | 19               | 12429554     | Missense                  | SNV              | c.1285G>A  | p.A429T    | Regulation of transcription, DNA-dependent; DNA binding; zinc ion binding   | Deletéria  |
| ZNF705B   | 8                | 7807627      | Missense                  | SNV              | c.212T>A   | p.V71E     |   | NA         |

\*NA: não avaliado; Posição Gen: posição genômica; Chr: nº do cromossomo

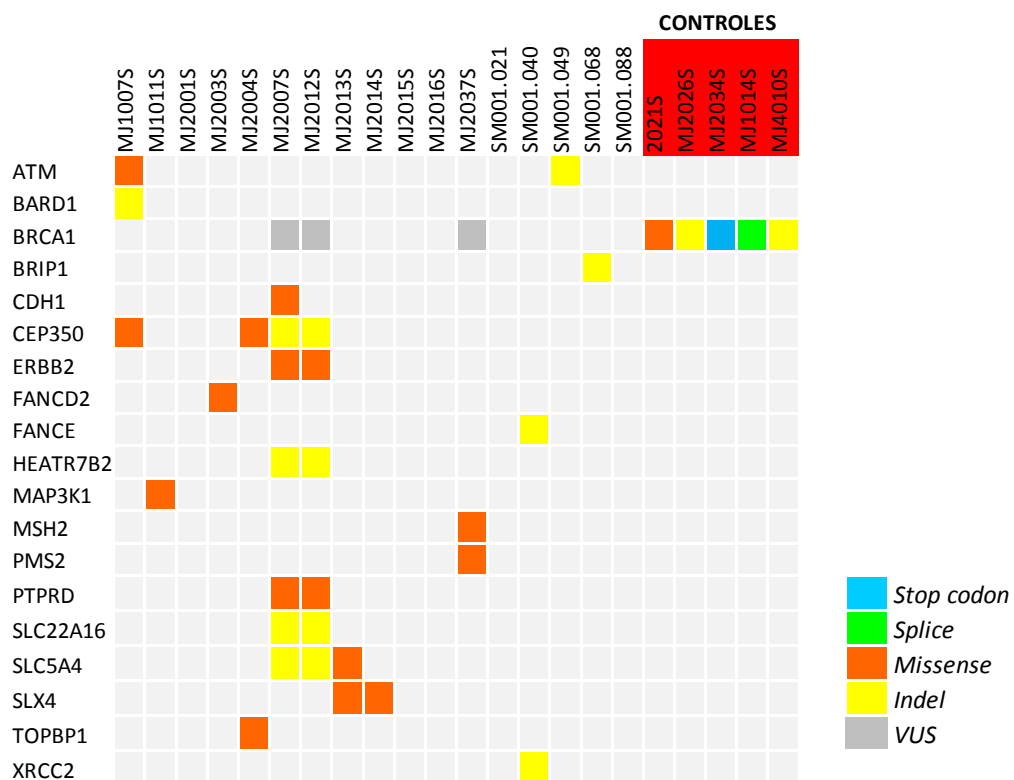
A lista das 3207 variantes (3130 SNVs e 77 INDELs) identificadas em nosso estudo foi comparada com outras duas listas, a fim de identificar outras variantes potenciais. A primeira e segunda lista refere-se aos genes potencialmente associados

ao desenvolvimento de tumores de mama. A primeira lista contém 88 genes da via do *BRC1* e além de outros genes identificados recentemente como potencial genes de susceptibilidade, através do sequenciamento do exoma (WALSH e KING 2007; THOMPSON et al. 2012; GRACIA-AZNAREZ et al. 2013; APOSTOLOU e FOSTIRA 2013 (Anexo 6) e a segunda lista foi publicada na revista *Science* deste ano (2014), esta lista contém 31 genes relacionados ao câncer de mama hereditário (KEAN 2014) (Anexo 6).

Por outro lado, a terceira lista (Anexo 7) possui 479 genes mutados em câncer que foram selecionados a partir de levantamentos bibliográficos (STEPHENS et al. 2012) e de painéis gênicos comerciais (Ion AmpliSeq *TM Comprehensive Cancer Panel, life technologies*).

A partir destas três listas foram selecionadas as variantes (SNVs e INDELS) identificadas somente no grupo das pacientes e não nos controles utilizados como filtro das variantes (Figuras 14 e 15). Esta avaliação resultou em 19 genes encontrados na primeira e segunda lista e 97 genes identificados na terceira lista.

Assim, as comparações das variantes com estas listas de genes encontrados nas 15 pacientes não aparentadas (Anexo 8) revelaram alterações germinativas em genes envolvidos na via de reparo do DNA de dupla fita, eles são: *ATM*, *BARD1*, *FANCD2*, *FANCE*, *MSH2*, *MAP3K1* e *TOPBP1* (Figura 14) que possivelmente podem estar associados com a predisposição genética para o desenvolvimento do câncer de mama.



**Figura 14** - Distribuição dos genes potencialmente associados ao câncer de mama hereditário.

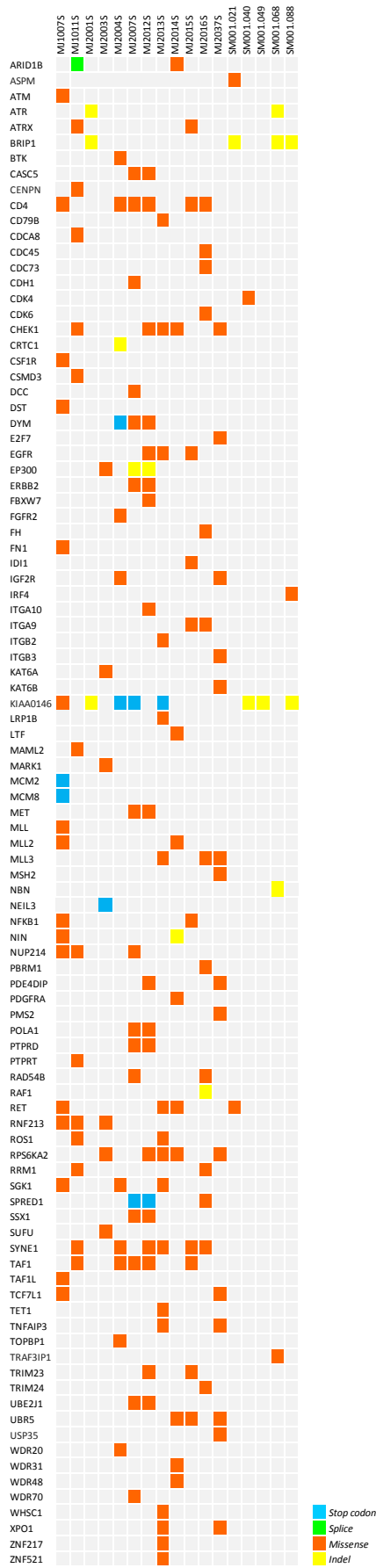


Figura 15 - Distribuição dos genes relacionados ao câncer.



Em relação, à comparação com a terceira lista dos genes associados ao câncer (Figura 15), nós selecionamos alguns genes potenciais, dos quais destacamos *ERBB2*, *ARID1B*, *ATRX*, *CRTC1* e *RAF1* genes envolvidos na proliferação celular, ativação da transcrição, reparo do DNA e entre outras.

Algumas alterações identificadas pelo sequenciamento do exoma, por exemplo nos genes: *ATM*, *ATRX*, *BARD1*, *ERBB2*, *FANCD2*, *MET* e *TOPBP1* foram validadas pelo sequenciamento Sanger (Figura 16). Os genes candidatos mais robustos (*ARID1B*, *ATM*, *ATR*, *ATRX*, *BARD1*, *CRTC1*, *ERBB2*, *FANCD2*, *FANCE*, *MAP3K1*, *MET*, *PMS2*, *RAF1* e *TOPBP1*) serão selecionados e incluídos em um painel de genes candidatos à predisposição ao câncer de mama hereditário, através da abordagem de sequenciamento alvo (*target seq*). A continuação da fase de validação será realizada em outro trabalho, iniciando nas amostras usadas neste estudo, e passando para as demais amostras negativas da primeira parte deste trabalho. Vislumbramos identificar nesta fase de validação um forte candidato a ser um novo gene de susceptibilidade ao câncer de mama.

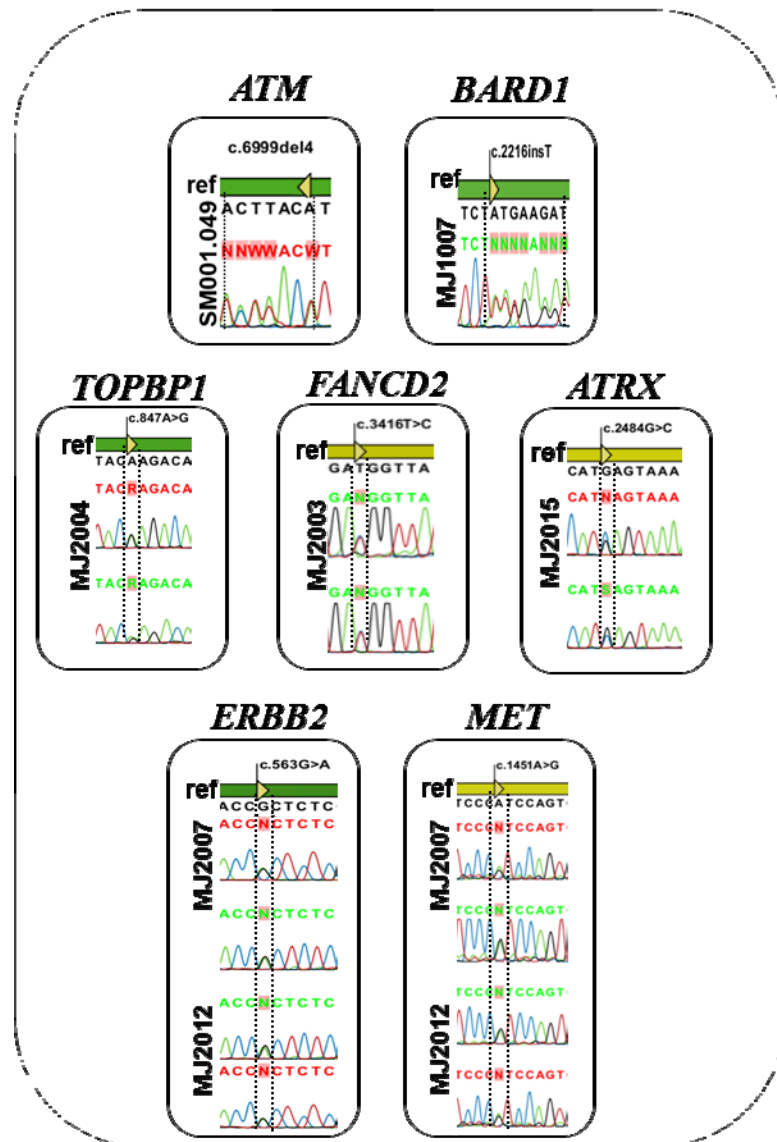


Figura 16 – Eletroferogramas dos genes validados pelo sequenciamento Sanger.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo verificar a prevalência de mutações germinativas em pacientes com história familiar de câncer de mama, ovário e colorretal em famílias brasileiras. A maioria das alterações encontradas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são pequenas inserções, deleções e mutações pontuais que estão distribuídas em toda região codificadora destes genes.

Os genes *BRCA1* são responsáveis por aproximadamente 10% do câncer de mama hereditário na Finlândia e Holanda (KUUSISTO et al. 2011) e 25% na França e Suécia. A detecção da mutação *BRCA2* são geralmente cerca de 10%, com exceção da Itália, onde mutações germinativas foram encontradas em 25% das 49 famílias analisadas (SANTAROSA et al. 1999). A frequência de mutações pontuais dos genes *BRCA1* e *BRCA2* em nosso estudo foram de 20,3% (26/128), os quais 14,8% (19/128) foram atribuídos ao gene *BRCA1* e 5,5% (7/128) ao gene *BRCA2*, demonstrando que o *BRCA1* foi o mais prevalentemente mutado em nossa casuística, representando 73% das mutações pontuais. A frequência destes genes em nosso estudo foi maior do que em estudos realizados na Suécia (8,9%), Alemanha (14,1%) (LOMAN et al. 2001; MEINDL et al. 2002) e estudos brasileiros anteriores (GOMES et al. 2007; DUFLOTH et al. 2005). No entanto, a frequência foi baixa quando comparamos com um estudo (43,8%) realizado nos Estados Unidos da América (NANDA et al. 2005).

A população brasileira apresenta alta miscigenação e não podemos excluir a possibilidade de estudar uma casuística não representativa da população brasileira.

Assim, dado que nós podemos ter nesta população estudada uma parcela significativa de descendência portuguesa, nós buscamos um rearranjo recentemente relatado em famílias em Portugal, caracterizado como uma mutação fundadora (PEIXOTO et al. 2010). Esta alteração é caracterizada pela presença de uma inserção *Alu* no éxon3 do gene *BRCA2* em famílias portuguesas e de acordo com PEIXOTO et al. (2010) representa 58% das alterações detectadas na população portuguesa. Os *primers* utilizados nesse estudo são possíveis de detectar esse rearranjo, no entanto, não foi detectado este rearranjo nas 128 famílias incluídas em nosso estudo.

No estudo presente, foi identificado 3,1% (4/128) das mutações comumente presentes na população judaica Ashkenazi, as quais também foram identificadas em estudos realizados por LOURENÇO et al. (2004), GOMES et al. (2007) e EWALD et al. (2011), no qual neste estudo especificamente foi identificado 5% da mutação fundadora c.5266dup, em mulheres com câncer de mama hereditário procedente do Rio de Janeiro e Porto Alegre.

A frequência de mutação em ponto (p.R337H) no gene *TP53* em nosso estudo foi de 3% (3/99). Esta mutação foi relatada como efeito fundador na população do sul do Brasil (GARRITANO et al. 2010) e também tem sido detectada com alta frequência em famílias brasileiras em risco à predisposição ao câncer (ACHATZ et al. 2007). No entanto, CARRARO et al. (2013) em um estudo envolvendo 54 mulheres jovens com diagnóstico de câncer de mama não identificaram a mutação do gene *TP53* (R377H).

A variante *CHEK2* 1100delC foi descrita pela primeira vez em famílias com síndrome de Li-Fraumeni em pacientes que não eram portadores de mutações no gene *TP53* (BELL et al. 1999). Mais tarde, MEIJERS-HEIJBOER et al. (2002)

enquanto pesquisavam novos genes relacionados ao câncer de mama, identificaram a variante *CHEK2* 1100delC como um alelo de baixa penetrância que confere susceptibilidade ao câncer de mama com uma prevalência de 4,2% entre as famílias com câncer de mama sem mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* comparado com 1,1% entre os indivíduos saudáveis. Foi demonstrado que a variante *CHEK2* 1100delC está associada a um risco duas vezes maior para o desenvolvimento do câncer de mama. As variantes *CHEK2* podem aumentar o risco do desenvolvimento de vários tipos de cânceres, incluindo câncer colorretal (CYBULSKI et al. 2004) embora haja uma hipótese consistente que *CHEK2* é um gene de suscetibilidade ao câncer em diversos órgãos e que atua em sinergia com outros genes ou fatores que causam o câncer. Mulheres que apresentam uma mutação truncada em *CHEK2* e história familiar de câncer de mama têm um risco cumulativo de desenvolver câncer de mama maior que 25% (CYBULSKI et al. 2011).

O fato de nós encontrarmos em nosso estudo a variante *CHEK2* 1100delC em uma paciente com critérios clínicos para HBOC é um dado importante, pois a variante *CHEK2* vem sendo classificada em uma categoria de genes que confere um risco moderado de câncer, observando-se que mutações neste gene são de frequência intermediária e com penetrância moderada (MEIJERS-HEIJBOER et al. 2002; VAHTERISTO et al. 2002; CYBULSKI et al. 2004; WEISCHER et al. 2008; HOLLESTELLE et al. 2010; MANOUKIAN et al. 2011). A paciente que apresentou a variante *CHEK2* (1100delC) é de origem polonesa e alemã. Na Polônia, três mutações fundadoras no gene *CHEK2* estão presentes em 5,5% da população sendo elas: 1100delC, IVS2 + 1G>A e I157T (CYBULSKI et al. 2004). Desta forma, frente

a este resultado consideramos que o rastreamento da mutação em *CHEK2* deveria ser realizado em mulheres brasileiras com história familiar de câncer de mama.

As variantes *missense* de significado clínico desconhecido são muito comuns e apresentam muita dificuldade de interpretação, o que representa um problema de grande importância clínica, pois dificulta o aconselhamento genético. A maioria das VUS são polimorfismos de nucleotídeo únicos, no entanto, nós não podemos descartar por completo a possibilidade da variante ser patogênica, e os estudos de segregação e a análise funcional são bastante complexos (WEISCHER et al. 2008) e devem ser realizados de forma complementar. A falta destes resultados dificultam a definição da significância clínica destas VUS e vários esforços estão sendo feitos neste sentido.

E para ajudar a classificar as variantes como patogênica ou não patogênica, em relação, à doença de interesse é importante verificar vários pontos, tais como: a frequência destas variantes nos pacientes e nos indivíduos saudáveis, a coocorrência da variante com uma mutação patogênica conhecida em um ou mais indivíduos testados, a cosegregação da variante com a doença em familiares e além disso, verificar também as análises *in silico* e estudos funcionais (GOLDGAR et al. 2004). Todos estes resultados auxiliam no direcionamento das estratégias de prevenção e rastreamento a serem adotadas para os pacientes e seus familiares.

Existem alguns programas *in silico* que ajudam prever o efeito de uma mutação *missense* ou no sítio de *splice*, estes programas permitem avaliar a probabilidade da patogenicidade ou neutralidade das VUS, baseados no grau de conservação, posição e natureza do aminoácido ou nucleotídeo alterado (GOLDGAR et al. 2004; CHENEVIX-TRENCH et al. 2006; EASTON et al. 2007; DOMCHEK e WEBER 2008). Estes algoritmos são amplamente utilizados na literatura e tem um

potencial em rastrear o dano no nsSNPs (*non-synonymous single-nucleotide polymorphisms*) em genes que podem estar associados com o risco da doença, como o câncer de mama, próstata, colorretal e endométrio. No entanto, apesar da análise dos programas de predição de patogenicidade serem úteis, não podem substituir as análises de segregação e estudos funcionais (GOLDGAR et al. 2004).

Uma das grandes dificuldades das análises de segregação é que não é factível avaliar grande número de familiares, e na maioria dos casos é muito restrito o número de familiares afetados com a doença e o número de familiares afetados vivos nem sempre é suficiente para conseguir tirar conclusões a partir dos dados de cossegregação.

Das 18 VUS encontradas no estudo presente, a variante M784V foi selecionada para a análise de segregação (Tabela 4), mas a perda da cossegregação em uma irmã afetada com câncer de mama e também a presença desta variante em um dos 95 indivíduos saudáveis sem a presença da doença, mostrou que esta variante tem uma alta probabilidade de ter pouca ou nenhuma relevância clínica.

A alteração no sítio de *splice* (IVS7 + 2T>C) foi detectada no probando MO-15, e nenhum dos 95 indivíduos saudáveis apresentou esta variante. As alterações que afetam sítios doadores ou receptores de *splicing* foram reportadas como clinicamente relevantes, uma vez que afetam o processo de *splicing* do mRNA, e consequentemente modificam a estrutura da proteína. Adicionalmente, o resultado do sequenciamento da análise do transcrito identificou a perda de 62 pb do éxon 7. Estes dados confirmaram a patogenicidade deste evento, e portanto, esta nova alteração foi considerada como patogênica.

A maioria (25/26) das mutações patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foram encontradas em pacientes com critérios clínicos para HBOC, no entanto, seis famílias também preenchiam os critérios clínicos para HBCC. Em uma família (SM102) com critérios clínicos somente para HBCC foi encontrada a mutação patogênica 5582insT. O probando apresentou aos 59 anos CRC e câncer de mama aos 63 anos sem qualquer história de câncer na família, exceto um sobrinho com pólipos aos 30 anos. NASEEM et al. (2006) argumentaram que existem dúvidas sobre a existência de HBCC e agregação do câncer e que poderia ocorrer ao acaso. Embora, o probando SM037 tenha sido identificado com uma mutação no gene *BRCA1* e o início do câncer colorretal ocorreu antes do câncer de mama em idade precoce ao diagnóstico quando comparado com a população em geral (aproximadamente 65 anos), até o momento, não existem evidências que as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* estejam associadas com o início do câncer colorretal e mais investigações são necessárias para esclarecer esta possível relação.

A não detecção de mutação na linhagem germinativa nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *CHEK2* (1100delC) por sequenciamento capilar não exclui a possibilidade de um dos alelos estarem alterados, por apresentarem as alterações no número de cópias, sendo assim, 100 pacientes não portadores de mutações nestes genes foram selecionados para o rastreamento das alterações no número de cópias através da metodologia de MLPA, e foram identificados neste estudo 2 alterações.

A primeira alteração no número de cópias foi encontrada em uma paciente (SM.001.003) diagnosticada com câncer de mama e óvário aos 36 anos. A análise de MLPA revelou as deleções dos éxons 16 e 17 do gene *BRCA1* nesta paciente. Esta alteração foi confirmada pela técnica de PCR de longo alcance utilizando *primers*



localizados nos íntrons 15 e 17, o qual resultou em um fragmento de aproximadamente 1.8Kb. Também foi realizada a técnica de aCGH, no entanto, a plataforma utilizada não apresentava sondas localizadas nos éxons 16 e 17 do gene *BRCA1*, e por isso as deleções destes éxons não foram detectadas. Esta alteração é uma deleção *in frame* já foi descrita na literatura (CARVALHO et al. 2009; RODRÍGUEZ et al. 2010), e está localizada na região do domínio BRCT da proteína BRCA1, afetando a ligação de outras fosfoproteínas que são fundamentais para a ativação do complexo de reparo do DNA, e a perda desses éxons comprometem a função da proteína (CARVALHO et al. 2009), podendo levar à predisposição ao câncer.

A segunda alteração no número de cópias identificada pela técnica de MLPA foi à amplificação do éxon 24 no *BRCA1*, da qual foi relatada pela primeira vez neste estudo. Esta amplificação foi confirmada pelas técnicas de duplex qPCR e aCGH que também identificaram a amplificação do éxon 24 neste gene.

Além disso, foi identificada pela técnica de MLPA, a alteração no número de cópias (deleção do éxon 3) no gene *BRCA2* e esta alteração não foi confirmada pela técnica de duplex qPCR o que resultou em um resultado falso positivo. O resultado da validação através da técnica de PCR de longo alcance seguido de sequenciamento capilar identificou um SNP na junção dos dois *primers* do ensaio de MLPA, o que levou a detecção errônea do método em determinar uma deleção do éxon 3. Por isso, é muito importante confirmar os rearranjos genômicos encontrados pela técnica de MLPA através de outras metodologias, tais como: PCR de longo alcance, PCR quantitativo, aCGH, entre outras, evitando desta forma resultados inconsistentes.

No kit de MLPA para gene *BRCA2* (P045-B3 *BRCA2/CHEK2*) a sonda (08898-L09587) que se localiza no éxon 3 é específica para o rearranjo nt504del5068insCCAT, o qual foi descrito pela primeira vez por NORDLING et al. (1998) em uma família sueca com história familiar de câncer de mama e ovário. Para interpretar o efeito patogênico de várias variantes do éxon 3, foi sugerido realizar a quantificação do transcrito e a análise de cossegração (MULLER et al. 2011).

A prevalência dos rearranjos genômicos nos genes *BRCA* varia significativamente em diferentes populações. A maior prevalência (40%) dos rearranjos genômicos foi encontrada na população no norte da Itália (MONTAGNA et al. 2003). Também foi detectada na população holandesa uma alta frequência (27%) dos rearranjos no gene *BRCA1* (HOGERVORST et al. 2003).

No entanto, na maioria dos outros países a frequência dos rearranjos genômicos no gene *BRCA1* é muito baixa, sendo 2,7% na África do Sul, 4,6% na Polônia, 3,8% na Dinamarca, (SLUITER et al. 2011; RATAJSKA et al. 2008; THOMASSEN et al. 2006) o que está de acordo com o estudo presente.

RUDNICKA et al. (2013) identificaram três rearranjos genômicos (deleções dos éxons 13 ao 19, deleção do éxon 17 e deleção do éxon 22) no gene *BRCA1* em mulheres polonesas com histórico familiar de HBOC, no entanto, não foram detectados rearranjos genômicos no gene *BRCA2*. O que indica que a incidência do rearranjo no *BRCA2* é significativamente mais baixa do que no gene *BRCA1*.

Os rearranjos genômicos no gene *BRCA2* são raros (MOISAN et al. 2006; RATAJSKA et al. 2008), em nossos estudos, não foram identificados rearranjos neste gene.

Alguns países europeus, tais como: Itália (AGATA et al. 2005), França (TOURNIER et al. 2004; CASILLI et al. 2006), Espanha (GUTIÉRREZ-ENRÍQUEZ et al. 2007; DEL VALLE et al. 2009) e Suécia (NORDLING et al. 1998) foram detectados casos de LGR em *BRCA2*. Interessantemente, é que na população portuguesa o rearranjo genômico do gene *BRCA2* (c.156\_157insAlu) no éxon 3 é muito frequente (MACHADO et al. 2007; PEIXOTO et al. 2009). Alguns pesquisadores sugerem que os rearranjos no gene *BRCA2* sejam mais frequentes em famílias que apresentam câncer de mama com pelo menos um caso de câncer de mama masculino na família (NORDLING et al. 1998; WOODWARD et al. 2005).

Com o advento das novas tecnologias do sequenciamento de nova geração (NGS), tornou-se viável sequenciar o genoma completo em grupos de indivíduos relativamente grandes (XUAN et al. 2013). O projeto genoma 1000, como por exemplo, estão desenvolvendo um catálogo mais detalhado das variantes genéticas com frequência abaixo de 1% em várias populações humanas (KAISER 2008; CONSORTIUM 2010).

A identificação das variantes genéticas que apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento do câncer tem sido um grande desafio. Os estudos da GWAS (*Genome Wide Association Study*), têm focado nas variantes comuns onde a frequência do alelo é menor que 5%. No entanto, o resultado obtido foi de apenas um modesto sucesso para a explicação da herdabilidade na maioria das doenças complexas (XUAN et al. 2013).

Depois do sequenciamento do exoma, a chamada das bases é um processo de identificação das sequências de nucleótidos das amostras de DNA a partir dos sinais de intensidade de fluorescência produzida pelos sequenciadores. Este procedimento é

fundamental para a interpretação dos dados de NGS, uma vez que os erros de alinhamentos introduzidos nas sequências podem influenciar sobre as análises. As diferentes tecnologias entre as plataformas NGS combinadas com o uso de diferentes algoritmos para a chamada das bases levam a erros característicos que irão depender da plataforma utilizada (XUAN et al. 2013). Por exemplo, na plataforma 454, os erros de inserções e deleções estão concentrados nas regiões de homopolímeros (HUSE et al. 2007), dando confiabilidade nas deleções e inserções detectadas fora destas regiões específicas. Na plataforma Illumina, a média da taxa de erro bruto é de 1% (KINDE et al. 2011). As taxas de erros aumentam em direção ao final das *reads*. Os erros de substituições são mais frequentes do que os erros de indels e determinados erros de substituições como a transversão A>C são mais prevalentes (MINOCHE et al. 2011). A plataforma SOLiD, gera dados bastantes confiáveis em relação à SNPs e INDELS, sendo que a taxa de erro aumenta de 2 a 8% em direção ao final 3' (SASSON e MICHAEL 2010), e foi demonstrado que o sistema SOLiD apresenta a menor taxa de erro. No entanto, o erro mais comum encontrado é de substituição (XUAN et al. 2013). Em relação à plataforma Ion Proton recentemente lançada, ainda há poucos dados publicados e está passando por melhorias quanto as análises e chamadas das variantes.

BOLAND et al. (2013) em um estudo comparando duas diferentes plataformas Ion Proton e Illumina não observaram diferenças significativas, e a plataforma Ion Proton produziu dados de alta qualidade de cobertura para a chamada dos SNPs. No entanto, os pesquisadores destacaram um problema para detecção precisa de INDELS nas duas plataformas. No estudo presente, foi observada a mesma

situação, sendo desta forma muito difícil a análise das INDELS, e há necessidade de ajustes nos algoritmos de bioinformática para a chamada deste tipo de variantes.

A dificuldade na determinação do genótipo e detecção de pequenas INDELS permanece um desafio, especialmente em regiões de homopolímeros que podem resultar em artefatos na sequência. Além disso, os avanços tecnológicos são necessários para melhorar a técnica de sequenciamento, assim como os algoritmos de bioinformática utilizados para análises dos dados de NGS (BOLAND et al. 2013).

Em nosso estudo, nós utilizamos sequenciamento completo do exoma para identificar novos genes de susceptibilidade ao câncer de mama em pacientes negativos para as mutações em estudo. Devido à grande complexidade na determinação de novos genes de susceptibilidade já relatada na literatura (HILBERS et al. 2012; JANATOVA et al. 2013; THOMPSON et al. 2012; RATAJSKA et al. 2012), nós introduzimos na nossa análise alguns controles com o intuito de filtrar as variantes, que provavelmente não estão associadas ao risco do câncer de mama.

Portanto, no estudo presente, nós realizamos o sequenciamento do exoma de cinco pacientes portadoras de mutações nos genes *BRCA1*, que foram utilizadas como filtro controles. Este filtro foi utilizado para descartar as variantes comuns encontradas tanto nos controles, quanto nas amostras em estudo. Após sequenciamento do exoma, os dados gerados pelo sequenciamento foram alinhados ao genoma humano de referência e para a chamada das variantes foi utilizado o programa GATK que faz a chamada das INDELS (inserções e deleções) e SNVs (variações de nucleotídeos). Após isto, foram utilizados critérios onde ficaram apenas as variantes presentes nas regiões codificadoras e em sítio de *splice*, além das

variantes novas, ou seja, ausentes no dbSNP e que apresentassem uma cobertura de no mínimo 10 *reads*, e frequência da base alterada em no mínimo 20% das *reads*.

A princípio, nós buscamos as variantes nos 22 mil genes avaliados e estas variantes foram as SNVs e as INDELs. No total, foram identificados 18.557 SNVs e 170 INDELs para cada paciente e após a utilização de filtros controles para a seleção de variantes mais robustas, nós identificamos 3130 SNVs e 77 INDELs, uma média de 184,2 SNVs e 7 INDELs para cada paciente.

Primeiramente, observamos os resultados da análise dos dados das alterações comuns encontradas nas duas irmãs (MJ2007 e MJ2012) diagnosticadas com câncer de mama e que não estavam presentes nas amostras controles (pacientes portadoras de mutações nos genes *BRCA1*), resultando na identificação de 59 variantes promissoras, sendo uma delas sugerida como potencial candidato para gene de susceptibilidade ao câncer de mama.

Diante das 3207 variantes identificadas em nosso estudo, e em busca de uma seleção de variantes mais robustas e com maior chance de estarem relacionadas com o aumento de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, nós comparamos estas variantes identificadas com outras três listas. A primeira e segunda lista referem-se a genes potencialmente associados com o desenvolvimento de tumores de mama, sendo que, a primeira possui 88 genes da via do *BRCA* e outros genes identificados recentemente como potencial genes de susceptibilidade, a segunda lista foi publicada na *Science* (2014) e contém 31 genes relacionados ao câncer de mama hereditário, e a terceira lista contém 479 genes mutados em câncer. Dos 119 genes da primeira e segunda lista, 19 genes foram observados em 12 pacientes que podem estar associados com a predisposição genética para o desenvolvimento do câncer de

mama. Dos 479 genes analisados da terceira lista, 97 genes foram identificados em 17 pacientes. Algumas variantes encontradas nas três listas, por exemplo nos genes: *ATM*, *ATRX*, *BARD1*, *ERBB2*, *FANCD2*, *MET* e *TOPBP1*, foram validadas por sequenciamento capilar. Os genes candidatos mais robustos (*ARID1B*, *ATM*, *ATR*, *ATRX*, *BARD1*, *CRTC1*, *ERBB2*, *FANCD2*, *FANCE*, *MAP3K1*, *MET*, *PMS2*, *RAF1* e *TOPBP1*) serão selecionados e incluídos em um painel de genes candidatos à predisposição ao câncer de mama hereditário.

Vários estudos têm identificado através do sequenciamento do exoma a presença de genes de baixa e moderada penetrância em pacientes não portadores de mutações nos genes *BRCA* (PARK et al. 2012; THOMPSON et al. 2012; GRACIA-AZNAREZ et al. 2013). No estudo presente, nós observamos a presença alterações na linhagem germinativa em genes como *ATM*, *BARD1*, *FANCD2*, *FANCE* e *TOPBP1* (Figura 14) os quais são genes de baixa e moderada penetrância envolvidos na via de reparo do DNA de dupla fita.

Recentemente, foi observado que em pacientes portadores de mutações raras como os genes *PALB2*, *BRIP1*, *CHEK2*, *ATM* e *RAD50* apresentam um risco aumentado para desenvolvimento do câncer de mama (MAHDI et al. 2013).

Interessantemente, nós identificamos através do sequenciamento do exoma uma alteração *frameshift* (c. 6999del4) no gene *ATM* encontrada na paciente SM001.049, e esta alteração foi validada por sequenciamento sanger. As mutações germinativas bialélicas no gene *ATM* causa *ataxia-telangiectasia* (AT), e a frequência de indivíduos heterozigotos portadores de mutações no gene *ATM* na população é de aproximadamente de 0,5 -1% (SWIFT et al. 1986; RENWICK et al. 2006) e confere um risco em desenvolver câncer de mama.

ATM é uma proteína quinase que tem múltiplas funções, incluindo a sinalização celular em resposta ao dano no DNA e atua em conjunto com o complexo MRN (MRE11-RAD50-NBN) no local da quebra de fita dupla (AHMED e RAHMAN 2006).

Além disso, outro gene interessante identificado em nosso estudo pelo sequenciamento do exoma e validado através do sequenciamento capilar foi uma alteração *frameshift* (c.2216insT; p.Y739fs) no gene *BARD1* detectada na paciente MJ1007 diagnosticada com câncer de mama aos 25 anos. Alguns estudos têm identificado mutações no gene *BARD1* em famílias de alto risco para câncer de mama, ovário e endométrio (GHIMENTI et al. 2002; RATAJSKA et al. 2012). As mutações no gene *BARD1* podem conferir à suscetibilidade ao câncer, mas estudos mais amplos são essenciais para confirmar estes dados (APOSTOLOU e FOSTIRA 2013). A proteína BARD1 (*BRCA1-associated RING domain*) interage com a proteína BRCA1 no reparo de quebra de dupla fita (WU et al. 1996; BRZOVIC et al. 2001).

PALB2 (parceiro e localizador do BRCA2) interage com a proteína BRCA2 a fim de recrutá-la aos locais de dano de dupla fita do DNA (XIA et al. 2006; SY et al. 2009). JANATOVA et al. (2013) observaram uma alta frequência de 5,5% (13/235) de mutações no gene *PALB2* em um grupo de pacientes com câncer de mama hereditário, demonstrando o papel importante deste gene na suscetibilidade ao câncer de mama (ERKKO et al. 2007; RAHMAN et al. 2007).

Recentemente, três mutações *missense* no gene *BRIP1* foram identificadas em mulheres judias de alto risco e não portadoras de mutações nos genes *BRCA1/2*. O



que sugere, que as mutações no gene *BRIP1* podem contribuir para a susceptibilidade ao câncer de mama em famílias judias de alto risco (CATUCCI et al. 2012).

O grupo GWAS (*Genome Wide Association Study*) têm identificado SNPs de baixa penetrância e novos genes de susceptibilidade ao câncer de mama, tais como os genes *LSP1*, *TOX3*, *FGFR2*, *TGFB1* e *MAP3K1* (AHMED et al. 2007).

Em nosso estudo, observamos a presença genes raros, como por exemplo o gene *TOPBP1*, onde nós identificamos uma alteração *missense* (c.847A>G; p.K283E) na paciente MJ2004 diagnosticada com câncer de mama aos 34 anos e esta alteração foi validada por sequenciamento capilar. A proteína TOPBP1 (*Topoisomerase IIB binding protein 1*) têm sido implicada em vários processos que mantêm a integridade genômica, reparo no DNA e controle do *checkpoint* (SOKKA et al. 2010), além da ativação de ATR que influencia na sinalização no dano do DNA e indiretamente influencia na ativação da proteína BRCA1 (YOO et al. 2007).

MAP3K1 (*Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1*) é uma proteína que funciona na via de sinalização MAP e é responsável pela regulação da transcrição de importantes genes, incluindo *c-Myc*, *c-Elk1*, *c-Jun* e *c-Fos* (VINIK et al. 1995; EASTON et al. 2007). A associação entre SNPs do gene *MAP3K1* e a susceptibilidade ao câncer de mama têm sido amplamente avaliada (EASTON et al. 2007; GARCIA-CLOSAS et al. 2008). Um estudo de meta análise, sugere que os SNPs rs889312-C e rs16886165-G podem ser fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, especialmente em europeus e asiáticos (ZHENG et al. 2014).

Outro gene, que nós identificamos através do sequenciamento do exoma e validamos por sequenciamento capilar foi o gene *FANCD2*, cuja alteração *missense*

(c.3416T>C; p.M1139T) foi encontrada na paciente MJ2003 diagnosticada com câncer de mama aos 26 anos. *FANCD2* é um dos genes conhecidos por causar a anemia de Fanconi que é uma doença autossômica recessiva (MEETEI et al. 2003; BAGBY 2003).

Em resposta à radiação ionizante, *FANCD2* é fosforilada pela ATM na serina 222, que ativa proteínas envolvidas nos pontos de checagem da fase S do ciclo celular (D'ANDREA e GROMPE 2003). A proteína *FANCD2* ativada é translocada para cromatina e co-localiza com outras proteínas de reparo do DNA, tais como *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *NBS1* e *RAD51* (D'ANDREA e GROMPE 2003). Esta translocação têm sido identificada como sendo dependente da proteína *BRCA1*, sugerindo que *FANCD2* e *BRCA1* interagem neste processo (MEETEI et al. 2003).

Alguns estudos relataram um aumento de 2% no risco para desenvolvimento do câncer de mama em mulheres heterozigotas para alterações em *FANCI* e *FANCD2*, que não apresentavam alterações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (SEAL et al. 2003; RAHMAN et al. 2007).

As mutações nos genes *FANCD2* e *FANCI* comprometem a função das proteínas desses genes e levam à interrupção da via responsável pelo reparo de DNA por recombinação. Consequentemente, não há regulação do ciclo celular das células epiteliais das glândulas mamárias, evento que pode desencadear o câncer de mama (TANIGUCH e D'ANDREA, 2002; D'ANDREA, 2010). Os ensaios utilizando camundongos *knockout* para *FANCD2* e *FANCI*, sugerem que mutações nesses genes desempenham um importante papel no desenvolvimento do câncer de mama (SEAL et al. 2003; LEWIS et al. 2005; PARMAR et al. 2009).

Recentemente, THOMPSON et al. (2012) em um estudo com famílias de alto risco para o câncer de mama e não portadoras de mutações nos genes *BRCA*, identificaram raras mutações nos genes *FANCC* e *BLM* através do sequenciamento do exoma.

Outro estudo, utilizando sequenciamento do exoma identificou mutações no gene *XRCC2* que é um parálogo do *RAD51* e tem função importante na recombinação homóloga. Foi sugerido que as mutações neste gene podem ser responsáveis pela predisposição ao câncer de mama (TAMBINI et al.2010; HILBERS et al. 2012). Particularmente, a mutação *missense* p.R188H no gene *XRCC2* foi associada com pior prognóstico (PARK et al. 2012).

De acordo com outros estudos, nossos dados revelaram uma alta complexidade no cenário das variantes genéticas, e é um grande desafio decifrá-las.

A confirmação destas variantes (SNVs e INDELS) encontradas pelo sequenciamento do exoma é extremamente importante. As análises dos dados das 17 pacientes do estudo presente, revelaram alterações germinativas em genes importantes envolvidos na via de reparo do DNA de dupla fita, que possivelmente podem estar associados com o aumento do risco no desenvolvimento do câncer de mama.

## 7 CONCLUSÕES

- A prevalência de mutações pontuais patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foi de 20,3% em famílias com critérios clínicos para HBOC e HBCC, demonstrando que mutações pontuais no gene *BRCA1* são mais frequentes do que no gene *BRCA2* na população estudada.
- A frequência da mutação germinativa no gene *TP53* no códon 337 do éxon 10 (c.1010G>A; p. R337H) em nosso estudo foi de 3% (3/99) e da variante *CHEK2* (1100delC) foi de 0,7% (1/128) em pacientes com câncer de mama hereditário deste estudo.
- No total, 18 VUS foram detectadas (4 no *BRCA1* e 14 no *BRCA2*), sendo que duas foram descritas pela primeira vez no banco de dados do BIC. Sete variantes foram consideradas como provavelmente patogênicas em pelo menos um algoritmo, três em dois algoritmos e uma variante (p.M1783T) foi patogênica em 3 algoritmos.
- Nós identificamos 2 alterações do número de cópias (2%) no gene *BRCA1* em pacientes HBOC.

- Nós validamos as 2 alterações do número de cópias encontrados pela técnica de MLPA, através das técnicas de aCGH, PCR de longo alcance e Duplex PCR quantitativa.
- Avaliação do exoma completo detectou uma média de 184,2 SNVs e 7 INDELS para cada paciente negativo para mutações nos genes *BRCA1/2*, *TP53* e *CHEK2* (1100delC), sendo estas variantes com potencial de serem patogênicas. Entre os genes mais promissores, nós destacamos 5 genes (*ATM*, *BARD1*, *FANCD2*, *FANCE* e *TOPBP1*) envolvidos na via do *BRCA1* e 9 genes (*ERBB2*, *ARID1B*, *ATRX*, *NIN*, *MET*, *RAF1*, *CRTC1*, *MCM2* e *MCM8*) mutados em câncer e que possivelmente podem estar associados com a predisposição genética para o câncer de mama.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1000 Genomes Project Consortium, Abecasis GR, Altshuler D, et al. A map of human genome variation from population-scale sequencing. **Nature** 2010; 467:1061-73.

Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett** 2007; 8:96-102.

Achatz MI, Hainaut P and Ashton-Prolla P. Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? **Lancet Oncol** 2009; 10:920-5.

Agata S, Dalla Palma M, Callegaro M, et al. Large genomic deletions inactivate the BRCA2 gene in breast cancer families. **J Med Genet** 2005; 42:e64.

Ahmed M, Rahman N. ATM and breast cancer susceptibility. **Oncogene** 2006; 25:5906-11.

Antoniou AC, Pharoah PDP, McMullan G, et al. Evidence for further Breast Cancer Susceptibility Genes in addition to BRCA1 and BRCA2 in a population-based study. **Genet Epidemiol** 2001; 21:1-18.

Apostolou P, Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. **Biomed Res Int** 2013; 2013:1-11.

Arcand SL, Maugard CM, Ghadirian P, et al. Germline TP53 mutations in BRCA1 and BRCA2 mutation-negative French Canadian breast cancer families. **Breast Cancer Res Treat** 2008; 108:399-408.

Asan, Xu Y, Jiang H, et al. Comprehensive comparison of three commercial human whole-exome capture platforms. **Genome Biol** 2011; 12:95.

Assumpção JG, Seidinger AL, Mastellaro MJ, et al. Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in Southern Brazil. **BMC Cancer** 2008; 8:357.

Bagby GC Jr. Genetic basis of Fanconi anemia. **Curr Opin Hematol** 2003; 10:68-76.

Bainbridge MN, Wang M, Burgess DL, et al. Whole exome capture in solution with 3 Gbp of data. **Genome Biol** 2010; 11:62.

Batzer MA, Deininger PL. Alu repeats and human genomic diversity. **Nat Rev Genet** 2002; 3:370-9.

Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, et al. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. **Science** 1999; 286:2528-31.

Bianchi F, Raponi M, Piva F, et al. An intronic mutation in MLH1 associated with familial colon and breast cancer. **Fam Cancer** 2011; 10:27-35.

Bochar DA, Wang L, Beniya H, et al. BRCA1 Is Associated with a human SWI/SNF related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. **Cell** 2000; 102:257-65.

Boland JF, Chung CC, Roberson D, et al. The new sequencer on the block: comparison of Life Technology's Proton sequencer to an Illumina HiSeq for whole-exome sequencing. **Hum Genet** 2013; 132:1153-63.

Brzovic PS, Rajagopal P, Hoyt DW, et al. Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. **Nat Struct Biol** 2001; 8:833-7.

Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, et al. Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Br J Cancer** 2004; 13:1155-9.

Caestecker KW, Van de Walle GR. The role of BRCA1 in DNA double strand repair: past and present. **Exp Cell Res** 2013; 319:575-87.

Carraro DM, Koike MAF, Garcia BCL, et al. Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. **PLoS One** 2013; 8:e57581.

Carvalho M, Pino MA, Karchin R, et al. Analysis of a set of missense, frameshift, and in-frame deletion variants of BRCA1. **Mutat Res** 2009; 660:1-11.

Casilli F, Tournier I, Sinilnikova OM, et al. The contribution of germline rearrangements to the spectrum of BRCA2 mutations. **J Med Genet** 2006; 43:e49.

Catucci I, Milgrom R, Kushnir A, et al. Germline mutations in BRIP1 and PALB2 in Jewish high cancer risk families. **Fam Cancer** 2012; 11:483-91.

Cortez D, Wang Y, Qin J, Elledge SJ. Requirement of ATM-dependent phosphorylation of BRCA1 in the DNA damage response to double-strand breaks. **Science** 1999; 286:1162-6.

Chen JJ, Silver D, Cantor S, et al. BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. **Cancer Res** 1999; 59:1752-6.

Chenevix-Trench G, Healey S, Lakhani S, et al. Genetic and histopathologic evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA sequence variants of unknown clinical significance. **Cancer Res** 2006; 66:2019-27.



Christensen DE, Brzovic PS, Klevit RE. E2 BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono or specific polyubiquitin chain linkages. **Nat Struct Mol Biol** 2007; 14:941-8.

Cybulski C, Górski B, Huzarski T, et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. **Am J Hum Genet** 2004; 75:1131-5.

Cybulski C, Wokolorczyk D, Jakubowska A, et al. Risk of breast cancer in women with a chek2 mutation with and without a family history of breast cancer. **J Clin Oncol** 2011; 29:1-5.

D'Andrea AD, Grompe M. The Fanconi anaemia/BRCA pathway. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:23-34.

D'Andrea AD. Susceptibility pathways in Fanconi's anemia and breast cancer. **N Engl J Med** 2010; 362(20):1909-19.

Del Valle J, Feliubadalo L, Nadal M, et al. Identification and comprehensive characterization of large genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 122:733-743.

Den Dunnen JT, Antonarakis E. Nomenclature for description of human sequence variations. **Hum Mutat** 2001; 109:121-4.

Domchek S, Weber BL. Genetic variants of uncertain significance: flies in the ointment. **J Clin Oncol** 2008; 26:16-17.

Donenberg T, Lunn J, Curling D, et al. A high prevalence of BRCA1 mutations among breast cancer patients from the Bahamas. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 125:591-6.

Dufloth RM, Carvalho S, Heinrich JK, et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. **Sao Paulo Med J** 2005; 123:192-7.

Easton DF. “*CHEK2* \*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies”. **Am J Hum Genet** 2004; 74:1175-82.

Easton DF, Deffenbaugh AM, Pruss D, et al. A systematic genetic assessment of 1,433 sequence variants of unknown clinical significance in the BRCA1 and BRCA2 breast cancer predisposition genes. **Am J Hum Genet** 2007; 81:873-83.

Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. **Nature** 2007; 447:1087-93.

Einbeigi Z, Bergman A, Kindblom LG, et al. A founder mutation of the *BRCA1* gene in Western Sweden associated with a high incidence of breast and ovarian cancer. **Eur J Cancer** 2001; 37:1904-9.

Eisinger F, Sobol H, Serin D, Whorton JC. Hereditary breast cancer, circa 1750. **Lancet** 1998; 351:1366.

Elsakov P, Kurtinaitis J, Petraitis S, et al. The contribution of founder mutations in BRCA1 to breast and ovarian cancer in Lithuania. **Clin Genet** 2010; 78:373-6.

Engert S, Wappenschmidt B, Betz B, et al. MLPA screening in the BRCA1 gene from 1,506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17, and occurrence in single early-onset cases. **Hum Mutat** 2008; 29:948-58.

Erkko H, Xia B, Nikkila J, et al. A recurrent mutation in PALB2 in Finnish cancer families. **Nature** 2007; 446:316-9.

Ewald IP, Izetti PR, Vargas FR et al. Prevalence of the BRCA1 founder mutation c.5266dup in Brazilian individuals at-risk for the hereditary breast and ovarian cancer syndrome. **Hered Cancer Clin Pract** 2011; 9:12.

Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:937-48.

Ford D, Easton DF, Bishop DT, et al. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. **Lancet** 1994; 343:692-5.

Foulkes WD. Inherited susceptibility to common cancers. **N Engl J Med** 2008; 359: 2143-53.

Garber JE, Goldstein AM, Kantor AF, et al. Follow-up study of twenty-four families with LiFraumeni syndrome. **Cancer Res** 1991; 51:6094-97.

Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. **J Clin Oncol** 2005; 23:276-92.

Garcia-Closas M, Hall P, Nevanlinna H, et al. Heterogeneity of breast cancer associations with five susceptibility loci by clinical and pathological characteristics. **PLoS Genet** 2008; 4:e1000054.

Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. **Hum Mutat** 2010; 31:143-50.

Ghadirian P, Robidoux A, Zhang P, et al. The contribution of founder mutations to early-onset breast cancer in French-Canadian women. **Clin Genet** 2009; 76:421-6.

Ghimenti C, Sensi E, Presciuttini S, et al. Germline mutations of the *BRCA1*-associated ring domain (BARD1) gene in breast and breast/ovarian families negative for *BRCA1* and *BRCA2* alterations. **Genes Chromosomes Cancer** 2002; 33:235-42.

Gille JJ, Hogervorst FB, Pals G, et al. Genomic deletions of MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. **Br J Cancer** 2002; 7:892-7.

Goldgar DE, Easton DF, Deffenbaugh AM, et al. Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to *BRCA1* and *BRCA2*. **Am J Hum Genet** 2004; 75:535-44.

Gomes MC, Costa MM, Borojevic R, et al. Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in breast cancer patients from Brazil. **Breast Cancer Res Treat** 2007; 103:349-53.

Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. **J Clin Oncol** 2009; 27:1250-6.

Górski B, Byrski T, Huzarski T, et al. Founder mutations in the *BRCA1* gene in Polish families with breast-ovarian cancer. **Am J Hum Genet** 2000; 66:1963-8.

Gowen LC, Johnson BL, Latour AM, et al. *Brca1* deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. **Nat Genet** 1996; 12:191-4.

Gracia-Aznarez FJ, Fernandez V, Pita G, et al. Whole exome sequencing suggests much of non-*BRCA1/BRCA2* familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles. **PLoS One** 2013; 8:e55681.

Gutiérrez-Enríquez S, de la Hoya M, Martínez-Bouzas C, et al. Screening for large rearrangements of the BRCA2 gene in Spanish families with breast/ovarian cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2007; 103:103-10.

Hall JM, Lee MK, Newman B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science** 1990; 250:1684-9.

Hansen TV, Jonson L, Albrechtsen A, et al. Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 115:315-23.

Harboe TL, Eiberg H, Kern P, et al. A high frequent BRCA1 founder mutation identified in the Greenlandic population. **Fam Cancer** 2009; 8:413-19.

Hashizume R, Fukuda I, Maeda H, et al. The RING heterodimer BRCA1-BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. **J Biol Chem** 2001; 276:14537-40.

Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. **Nature** 1998; 391:184-7.

Hemminki K, Eng C. Clinical genetic counselling for familial cancers requires reliable data on familial cancer risks and general action plans. **J Med Genet** 2004; 41:801-7.

Herman S, Varga D, Deissler HL, et al. Medium-sized deletion in the BRCA1 gene: Limitations of Sanger sequencing and MLPA analyses. **Genet Mol Biol** 2012; 35:53-6.

Hilbers FS, Wijnen JT, Hoogerbrugge N, et al. Rare variants in XRCC2 as breast cancer susceptibility alleles. **J Med Genet** 2012; 49:618-20.

Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, et al. Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. **Cancer Res** 2003; 63:1449-53.

Hollestelle A, Wasielewski M, Martens JW, Schutte M. Discovering moderate-risk breast cancer susceptibility genes. **Curr Opin Genet Dev** 2010; 20:268-76.

Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, et al. Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. **Science** 2002; 297:606-9.

Huen MSY, Sy SMH, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. **Nature** 2010; 464:138-48.

Huse SM, Huber JA, Morrison HG, et al. Accuracy and quality of massively parallel DNA pyrosequencing. **Genome Biol** 2007; 8:R143.

Iau PTC, Macmillan RD, Blamey RW. Germline mutations associated with breast cancer susceptibility. **Eur J Cancer** 2001; 37:300-21.

Janatova M, Kleibl Z, Stribrna J, et al. The PALB2 gene is strong candidate for clinical testing in BRCA1 and BRCA2 negative hereditary breast cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2013; 22:2323-32.

Jensen UB, Sunde L, Timshel S, et al. Mismatch repair defective breast cancer in the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 113:87-91.

Kaiser J. DNA sequencing: a plan to capture human diversity in 1000 genomes, **Science** 2008; 319:395.

Karami F, Mehdipour PA. A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. **Biomed Res Int** 2013; 1:1-21.

Kean S. Breast cancer: the 'other' breast cancer genes. **Science** 2014; 343:1457-9.

Khanna KK, Jackson SP. DNA double strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. **Nat Genet** 2001; 27:247-54.

Kinde I, Wu J, Papadopoulos N, et al. Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. **Proc Natl Acad Sci USA** 2011; 108:9530-35.

King MC. "The race" to clone BRCA1. **Science** 2014; 343:1462-5.

King, MC, Marks JH, Mandell JB. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. **Science** 2003; 302:643-6.

Kolomietz E, Meyn MS, Pandita A, Squire JA. The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. **Genes Chromosomes Cancer** 2002; 35:97-112.

Kozak FK, Hall JG, Baird PA. Familial breast cancer in males: a case report and review of the literature. **Cancer** 1986; 58:2736-9.

Krepischi AC, Achatz MI, Santos EM, et al. Germline DNA copy number variation in familial and early-onset breast cancer. **Breast Cancer Res** 2012; 14:R24.

Krush AJ. Contributions of Pierre Paul Broca to cancer genetics. **Transactions Nebraska Acad Sci** 1979; 8:125-9.

Kuusisto KM, Bebel A, Vihinen M, et al. Screening for BRCA1, BRCA2, CHEK2, PALB2, BRIP1, RAD50, and CDH1 mutations in high-risk Finnish BRCA1/2-founder mutation-negative breast and/or ovarian cancer individuals. **Breast Cancer Res** 2011; 13:R20.

Lahti-Domenici J, Rapakko K, Paakkonen K, et al. Exclusion of large deletions and other rearrangements in BRCA1 and BRCA2 in Finnish breast and ovarian cancer families. **Cancer Genet Cytogenet** 2001; 129:120-3.

Lee DS, Yoon SY, Looi LM, et al. Comparable frequency of *BRCA1*, *BRCA2* and *TP53* germline mutations in a multi-ethnic Asian cohort suggests *TP53* screening should be offered together with BRCA1/2 screening to early-onset breast cancer patients. **Breast Cancer Res** 2012; 14:R66.

Lee JS, Collins KM, Brown AL, et al. hCds1 mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. **Nature** 2000; 404:201-4.

Lee H, Trainer AH, Friedman LS, et al. Mitotic checkpoint inactivation fosters transformation in cells lacking the breast cancer susceptibility gene, *Brca2*. **Mol Cell** 1999; 4:1-10.

Lehman TA, Haffty BG, Carbone CJ, et al. Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. **Cancer Res** 2000; 60:1062-9.

Lewis AG, Flanagan J, March A, et al. Mutation analysis of FANCD2, BRIP1/BACH, LMO4 and SFN I familial breast cancer. **Breast Cancer Res** 2005; 7(6):1005-16.

Liaw D, Marsh DJ, Li J, et al. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. **Nat Genet** 1997; 16: 64-7.

Lipton L, Thomas HJ, Eeles RA, et al. Apparent Mendelian inheritance of breast and colorectal cancer: chance, genetic heterogeneity or a new gene? **Fam Cancer** 2001; 1:189-95.



Loizidou M, Marcou Y, Anastasiadou V, Newbold R, Hadjisavvas A, Kyriacou K. Contribution of BRCA1 and BRCA2 germline mutations to the incidence of early-onset breast cancer in Cyprus. **Clin Genet** 2007; 71: 165-70.

Loman N, Johannsson O, Kristoffersson U, et al. Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population based series of early-onset breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2001; 93:1215-23.

Lou Z, Chini CC, Minter-Dykhouse K, Chen J. Mediator of DNA damage checkpoint protein 1 regulates *BRCA1* localization and phosphorylation in DNA damage checkpoint control. **J Biol Chem** 2003; 278:13599-602.

Lourenço JJ, Vargas FR, Bines J, et al. *BRCA1* mutations in Brazilian patients. **Gen Mol Biol** 2004; 27:500-4.

Lynch HT, Krush AJ, Lemon HM, et al. Tumor variation in families with breast cancer. **JAMA** 1972; 222:1631-5.

Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an update review. **Gastroenterology** 1993; 104:1535-49.

Lynch HT, Smyrk T, Lynch J. An update of HNPCC (Lynch syndrome). **Cancer Genet Cytogenet** 1997; 93:84-99.

Lynch HT, Silva E, Snyder C, Lynch JF. Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes. **Breast J** 2008; 14:3-13.

Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medico legal ramifications. **Clin Genet** 2009; 76:1-18.

Machado PM, Brandão RD, Cavaco BM, et al. Screening for a BRCA2 rearrangement in high-risk breast/ovarian cancer families: evidence for a founder effect and analysis of the associated phenotypes. **J Clin Oncol** 2007; 25:2027-34.

Mahdi KM, Nassiri MR, Nasiri K. Hereditary genes and SNPs associated with breast cancer. **Asian Pac J Cancer Prev** 2013; 14:3403-9.

Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science** 1990; 250:1233-8.

Manoukian S, Peissel B, Frigerio S, et al. Two new *CHEK2* germ-line variants detected in breast cancer/sarcoma families negative for *BRCA1*, *BRCA2*, and *TP53* gene mutations. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 150:315-24.

Marth GT, Yu F, Indap AR, et al. The functional spectrum of low-frequency coding variation. **Genome Biol** 2011; 12:84.

Mazoyer S. Genomic rearrangements in the *BRCA1* and *BRCA2* genes. **Hum Mutat** 2005; 25:415-22.

Mcallister KA. Spontaneous and irradiation-induced tumor susceptibility in BRCA2 germline mutant mice and cooperative effects with a p53 germline mutation. **Toxicol Pathol** 2006; 34:187-98.

Meetei AR, de Winter JP, Medhurst AL, et al. A novel ubiquitin ligase is deficient in Fanconi anemia. **Nat Genet** 2003; 35:165-170.

Meijers-Heijboer H, Van den Ouweland A, Klijn J, et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2 1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. **Nat Genet** 2002; 31:55-9.

Meijers–Heijboer H, Wijnen J, Vasen H, et al. The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. **Am J Hum Genet** 2003; 72:1308-14.

Meindl A, German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population. **Int J Cancer** 2002; 97:472-80.

Metcalfé KA, Poll A, Royer R, et al. Screening for founder mutations in BRCA1 and BRCA2 in unselected Jewish women. **J Clin Oncol** 2010; 28:387-91.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science** 1994; 7:66-71.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **INCA e Ministério da Saúde apresentam estimativas de câncer para 2014**. Disponível em: <URL:[http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca\\_ministerio\\_saude\\_apresentam\\_estimativas\\_cancer\\_2014](http://www.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/inca_ministerio_saude_apresentam_estimativas_cancer_2014)> [2014 jan 12]

Minoche AE, Dohm JC, Himmelbauer H, et al. Evaluation of genomic high throughput sequencing data generated on Illumina HiSeq and genome analyzer systems. **Genome Biol** 2011; 12:R112.

Moisan AM, Fortin J, Dumont M, et al. No evidence of BRCA1/2 genomic rearrangements in high-risk French-Canadian breast/ovarian cancer families. **Genet Test** 2006; 10:104-15.

Montagna M, Dalla PM, Menin C, et al. Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. **Hum Mol Genet** 2003; 12:1055-61.

Moslehi R, Chu W, Karlan B, et al. BRCA1 and BRCA2 mutation analysis of 208 Ashkenazi Jewish women with ovarian cancer. **Am J Hum Genet** 2000; 66:1259-72.

Moynahan ME, Pierce AJ, Jasin M. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. **Mol Cell** 2001; 7:263-72.

Muller D, Rouleau E, Schultz I, et al. An entire exon 3 germ-line rearrangement in the BRCA2 gene: pathogenic relevance of exon 3 deletion in breast cancer predisposition. **BMC Med Genet** 2011;12:121.

[NHGRI] National Human Genome Research Institute. **Breast cancer information core**. Available from: <URL:<http://research.nhgri.nih.gov/bic>> [2014 fev 2].

[NCCN] National Comprehensive Cancer Network. **Genetic/familial high risk assessment: breast and ovarian**. Available form: <URL:[http://demystifyingmedicine.od.nih.gov/DM10/0413-BreastCancer/NCCN%20br%20genetics\\_screening.pdf](http://demystifyingmedicine.od.nih.gov/DM10/0413-BreastCancer/NCCN%20br%20genetics_screening.pdf)> [2014 jan 12].

Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. **Oncogene** 2004; 23:6445-70.

Nanda R, Schumm LP, Cummings S, et al. Genetic testing in Hereditary breast cancer syndromes in Brazilian families 22 an ethnically diverse cohort of high-risk women: a comparative analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in American families of European and African ancestry. **JAMA** 2005; 294:1925-33.

Narod SA, Feunteun J, Lynch HT, et al. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. **Lancet** 1991; 338:82-83.

Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:665-76.

Narod SA, Offit K. Prevention and management of hereditary breast cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:1656-63.

Narod S, Lynch H. CHEK2 mutation and hereditary breast cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:6-7.

Narod SA, Salmena L. BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer. **Discov Med** 2011; 12:445-53.

Naseem H, Boylan J, Speake D, et al. Inherited association of breast and colorectal cancer: limited role of CHEK2 compared with high-penetrance genes. **Clin Genet** 2006; 70:388-95.

Nelson HD, Pappas M, Zakher B, et al. Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA related cancer in women: a systematic review to update the U.S. preventive services task force recommendation. **Ann Intern Med** 2013; 160:255-66.

Ng SB, Turner EH, Robertson PD, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. **Nature** 2009; 461:272-6.

Nordling M, Karlsson P, Wahlström J, et al. A large deletion disrupts the exon 3 transcription activation domain of the BRCA2 gene in a breast/ovarian cancer family. **Cancer Res** 1998; 58:1372-5.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. **Thompson & Thompson: genética médica**. Trad. de P A Motta. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. Informação genética e avaliação de risco; p.330-3.

Ottman R, Pike MC, King MC, et al. Practical guide for estimating risk for familial breast cancer. **Lancet** 1983; 2:556-8.

Palanca S, de Juan I, Perez-Simó G, et al. The deletion of exons 3-5 of BRCA1 is the first founder rearrangement identified in breast and/or ovarian cancer Spanish families. **Fam Cancer** 2013; 12:119-23.

Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, et al. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. **Cancer Lett** 2008; 261:21-5.

Park DJ, Lesueur F, Nguyen-Dumont T, et al. Rare mutations in XRCC2 increase the risk of breast cancer. **Am J Hum Genet** 2012; 90:734-9.

Parmar K, D'Andrea A, Niedernhofer LJ. Mouse models of Fanconi anemia. **Mutat Res** 2009; 668: 133-40.

Peelen T, van Vliet M, Petrij-Bosch A, et al. A high proportion of novel mutation in *BRCA1* with a strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families. **Am J Hum Genet** 1997; 60:1041-9.

Peixoto A, Santos C, Rocha P, et al. The c.156\_157insAlu BRCA2 rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious BRCA mutations in northern/central Portugal. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 114:31-8.

Peixoto A, Santos C, Pinheiro M, et al. International distribution and age estimation of the Portuguese BRCA2 c.156\_157insAlu founder mutation. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 127:671-9.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Hum Mutat** 2007; 28:622-9.

Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, et al. BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. **Nat Genet** 1997; 17:341-5.

Petrucelli N, Daly MB, Feldman GL. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. **Genet Med** 2010; 12:245-59.

Phelan CM, Iqbal J, Lynch HT, et al. Incidence of colorectal cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from a follow-up study. **Br J Cancer** 2014; 110:530-4.

Prosser J, Elder PA, Condie A, et al. Mutations in p53 do not account for heritable breast cancer: a study in five affected families. **Br J Cancer** 1991; 63:181-4.

Puget N, Gad S, Perrin-Vidoz L, et al. Distinct BRCA1 rearrangements involving the BRCA1 pseudogene suggest the existence of a recombination hot spot. **Am J Hum Genet** 2002; 70:858-65.

Radice P, De Summa S, Caleca L, Tommasi S. Unclassified variants in BRCA genes: guidelines for interpretation. **Ann Oncol** 2011; 22:18-23.

Rahman N, Seal S, Thompson D, et al. PALB2, which encodes a BRCA2 interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. **Nat Genet** 2007; 39:165-7.

Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. **Nucleic Acids Res** 2002; 30:3894-900.

Ratajska M, Brozek I, Senkus-Konefka E, et al. BRCA1 and BRCA2 point mutations and large rearrangements in breast and ovarian cancer families in Northern Poland. **Oncol Rep** 2008; 19:263-8.

Ratajska M, Antoszewska E, Piskorz A, et al. Cancer predisposing BARD1 mutations in breast-ovarian cancer families. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 131:89-97.

Renwick A, Thompson D, Seal S, et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. **Nat Genet** 2006; 38:873-5.

Robertson L, Hanson H, Seal S, et al. BRCA1 testing should be offered to individuals with triple-negative breast cancer diagnosed below 50 years. **Br J Cancer** 2012; 106:1234-8.

Rocha JCC, Kagohara LT. Oncogenética e farmacogenética. In: Guimarães JRQ, editor. **Manual de oncologia**. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: BBS Editora; 2006. p.57-66.

Rodríguez M, Torres A, Borrás J, et al. Large genomic rearrangements in mutation-negative BRCA families: a population-based study. **Clin Genet** 2010; 78:405-7.

Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nat Rev Cancer** 2011; 12:68-78.

Rudnicka H, Debniak T, Cybulski C, et al. Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Polish high risk breast and ovarian cancer families. **Mol Biol Rep** 2013; 40:6619-23.

Santarosa M, Dolcetti R, Magri MD, et al. *BRCA1* and *BRCA2* genes: role in hereditary breast and ovarian cancer in Italy. **Int J Cancer** 1999; 83:5-9.

Sasson A, Michael TP. Filtering error from SOLiD output. **Bioinformatics** 2010; 26:849-50.

Scully R, Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. **Nature** 2000; 408:429-32.



Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Res** 2002; 30:e57.

Seal S, Barfoot R, Jayatilake H, Smith P et al. Evaluation of FA genes in familial breast cancer predisposition. **Cancer Res** 2003; 63:8596-99.

Sluiter MD, van Rensburg EJ. Large genomic rearrangements of the BRCA1 and BRCA2 genes: review of the literature and report of a novel BRCA1 mutation. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 125:325-49.

Sokka M, Parkkinen S, Pospiech H, et al. Function of TopBP1 in genome stability. **Subcell Biochem** 2010; 50:119-41.

Sokolenko AP, Rozanov ME, Mitiushkina NV, et al. Founder mutations in early-onset, familial and bilateral breast cancer patients from Russia. **Fam Cancer** 2007; 6:281-6.

Son BH, Ahn SH, Kim SW et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in non-familial breast cancer patients with high risks in Korea: the Korean Hereditary Breast Cancer (KOHBRA) Study. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 133:1143-52.

Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. **Nature** 2012; 486:400-4.

Stracker TH, Usui T, Petrini JH. Taking the time to make important decisions the checkpoint effect of kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response **DNA Repair** 2009; 8:1047-54.

Stucki M, Clapperton JA, Mohammad D, et al. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. **Cell** 2005; 123:1213-26.

Stuppia L, Antonucci I, Palka G, Gatta V. Use of the MLPA assay in the molecular diagnosis of gene copy number alterations in human genetic diseases. **Int J Mol Sci** 2012; 13:3245-76.

Swift M, Reitnauer PJ, Morrell D, et al. Breast and other cancers in families with ataxia-telangiectasia. **N Engl J Med** 1987; 316:1289-94.

Sy SM, Huen MS, Chen J. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:7155-60.

Tambini CE, Spink KG, Ross CJ, et al. The importance of XRCC2 in RAD51-related DNA damage repair. **DNA Repair** 2010; 9:517-25.

Taniguchi T, Dandrea AD. Molecular pathogenesis of fanconi anemia. **Int J Hematol** 2002; 75:123-8.

Tancredi M, Sensi E, Cipollini G, et al. Haplotype analysis of BRCA1 gene reveals a new gene rearrangement characterization of a 19.9 kbp deletion. **Eur J Hum Genet** 2004; 12:775-7.

Tarabeux J, Zeitouni B, Moncoutier V, et al. Streamlined ion torrent PGM-based diagnostics: BRCA1 and BRCA2 genes as a model. **Eur J Hum Genet** 2014; 22:535-41.

Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, et al. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. **Nat Genet** 1996; 12: 333-7.

Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L, et al. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. **J Med Genet** 2006; 43:295-305.

Thomassen M, Gerdes AM, Cruger D, et al. Low frequency of large genomic rearrangements of BRCA1 and BRCA2 in Western Denmark. **Cancer Genet Cytogenet** 2006; 168:168-71.

Thompson ER, Doyle MA, Ryland GL, et al. Exome sequencing identifies rare deleterious mutations in DNA repair genes FANCC and BLM as potential breast cancer susceptibility alleles. **PLoS Genet** 2012; 8:e1002894.

Tonin P, Weber B, Offit K, et al. Frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer families. **Nat Med** 1996; 2:1179-83.

Torrezan GT, Silva FC, Krepischi AC, Monteiro SEM, Rossi BM, Carraro DM. A novel SYBR-based duplex qPCR for the detection of gene dosage: detection of an APC large deletion in a familial adenomatous polyposis patient with an unusual phenotype. **BMC Med Genet** 2012; 13:55.

Tournier I, Paillerets BB, Sobol H, et al. Significant contribution of germline BRCA2 rearrangements in male breast cancer families. **Cancer Res** 2004; 64:8143-7.

Uglanitsa N, Oszurek O, Uglanitsa K, et al. The contribution of founder mutations in BRCA1 to breast cancer in Belarus. **Clin Genet** 2010; 78:377-80.

Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H, et al. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. **Am J Hum Genet** 2002; 71:432-8.

Vallée MP, Francy TC, Judkins MK, et al. Classification of missense substitutions in the BRCA genes: a database dedicated to Ex-UVs. **Hum Mutat** 2012; 33:22-8.

Vargas FR. Aconselhamento genético no câncer hereditário, pré-teste e pós teste. In: Louro ID, Llerena Junior JC, Melo MSV, Prolla PA, editores. **Genética molecular do câncer**. São Paulo: MSG Produção Editorial; 2002. p.266-8.

Verhoog LC, van den Ouweland AM, Berns E, et al. Large regional differences in the frequency of distinct BRCA1/BRCA2 mutations in 517 Dutch breast and/or ovarian cancer families. **Eur J Cancer** 2001; 37:2082-90.

Vinik BS, Kay ES, Fiedorek FT Jr, Mapping of the MEK kinase gene (Mekk) to mouse chromosome 13 and human chromosome 5. **Mamm Genome** 1995; 6:782-3.

Walsh T, Casadei S, Coats KH, et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. **JAMA** 2006; 22:1379-88.

Walsh T, King MC. Ten genes for inherited breast cancer. **Cancer Cell** 2007; 11:103-5.

Wang H, Wang M, Wang H, et al. Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. **J Cell Physiol** 2005; 202:492-502.

Warner E, Foulkes W, Goodwin P, et al. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in unselected Ashkenazi Jewish women with breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:1241-47.

Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C, et al. CHEK2 1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patients cases and 27,000 controls. **J Clin Oncol** 2008; 26:542-8.

Wood ME, Kadlubek P, Pham TH, et al. Quality of cancer family history and referral for genetic counseling and testing among oncology practices: a pilot test of quality measures as part of the American Society of Clinical Oncology quality oncology practice initiative. **J Clin Oncol** 2014; 32:824-9.

Woodward AM, Davis TA, Silva AG, Kirk JA, Leary JA, kConFab Investigators. Large genomic rearrangements of both BRCA2 and BRCA1 are a feature of the inherited breast/ovarian cancer phenotype in selected families. **J Med Genet** 2005; 42:e31.

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. **Science** 1994; 30:2088-90.

Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature** 1995; 378:789-92.

Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, et al. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. **Nat Genet** 1996; 14:430-40.

Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, et al. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. **Mol Cell** 2006; 22:719-29.

Xuan J, Yu Y, Qing T, et al. Next generation sequencing in the clinic: promises and challenges. **Cancer Lett** 2013; 340:284-95.

Yoo HY, Kumagai A, Shevchenko A, et al. Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) dependent activation of ATR occurs through phosphorylation of TopBP1 by ATM. **J Biol Chem** 2007; 282:17501-6.

Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. **Cancer Sci** 2004; 95:866-71.

Young SR, Pilarski RT, Donenberg T, et al. The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer. **BMC Cancer** 2009; 9:86.

Yu X, Chini CC, He M, et al. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. **Science** 2003; 302:639-42.

Yu X, Fu S, Lai M. BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP. **Genes Dev** 2006; 20:1721-6.

Zheng Q, Ye J, Wu H, et al. Association between mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 polymorphisms and breast cancer susceptibility: a meta-analysis of 20 case-control studies. **PLoS One** 2014; 9:e90771.

**Anexo 1 A - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Pesquisa-CEP da  
Fundação Antônio Prudente**



**Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 19 de Maio de 2010.

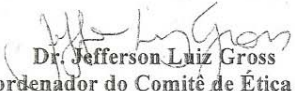
À  
**Dra. Dirce Maria Carraro**

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 870/06-B  
"Predisposição Hereditária ao Câncer Colorretal e ao Câncer de Mama: Manejo de Pacientes de Alto Risco e Suas Famílias Diagnóstico Clínico e Molecular, Aconselhamento de Risco e Implantação de um Sistema de Registro e Gerenciamento de Dados Oncogenéticos".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 11/05/2010, **tomaram conhecimento e aprovaram** a seguinte solicitação:

- Solicitação de dispensa da apreciação do estudo intitulado "Rastreamento dos genes BRCA1 e BRCA2 em Pacientes em risco para Síndrome de Câncer de Mama Hereditário" em razão de este estudo estar inserido em projeto supracitado, previamente aprovado por este comitê.

Atenciosamente,



**Dr. Jefferson Luiz Gross**

**1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

**Anexo 1 B** – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Indivíduos com Câncer de Mama

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução N. 196/96 e resolução CNS 252/97 do Ministério da Saúde)

**PROJETO: Predisposição Hereditária ao Câncer Colorretal e ao Câncer de Mama: Manejo de Pacientes de Alto Risco e Suas Famílias *Diagnóstico Clínico e Molecular, Aconselhamento de Risco e Implantação de um Sistema de Registro e Gerenciamento de Dados Oncogenéticos***

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL**

NOME DO PACIENTE: \_\_\_\_\_

Sexo:  masculino  feminino Data de nascimento: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Documento de identidade n.: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Número: \_\_\_\_\_ Complemento: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_ TEL: \_\_\_\_\_

RESPONSÁVEL: \_\_\_\_\_

Sexo:  masculino  feminino Data de nascimento: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

Documento de identidade n.: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Número: \_\_\_\_\_ Complemento: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

CEP: \_\_\_\_\_ TEL: \_\_\_\_\_

**OBJETIVOS DO ESTUDO**

Você foi convidado a participar deste estudo, pois sua família pode ser portadora de uma síndrome hereditária que aumenta o risco de câncer de mama e de intestino grosso. Este risco aumentado pode ser consequência de alteração nos genes.

Este estudo tem por objetivos:



- Verificar se indivíduos que pertencem a famílias com elevado número de casos de câncer do intestino grosso ou mama sem alterações nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* ou *TP53*.
- Verificar se os tumores dos indivíduos com alterações em um desses genes têm características clínicas diferentes (local, tamanho, tipo de tumor).

O câncer é uma doença genética, ou seja, é causada por alterações nos genes. Mas a maioria dos tumores malignos são esporádicos, ou seja, as alterações genéticas não são passadas de pai para filho (não são hereditárias).

A maioria dos tumores de mama e de intestino grosso é esporádica. Porém, entre 5% a 10% dos casos (ou um em cada 10 tumores), são chamados hereditários, pois são causados por alterações nos genes chamadas mutações que podem ser transmitidas de geração para geração.

Os genes são códigos dentro das células que funcionam como programas que determinam como as células do organismo devem funcionar. Quando ocorrem as alterações chamadas mutações, os genes podem não funcionar direito e enviar sinais errados para o funcionamento das células. Quando as mutações ocorrem em genes que atuam no crescimento das células, isto pode levar ao desenvolvimento de tumores.

Existem diversas doenças hereditárias que aumentam o risco de câncer de mama e intestino grosso, dentre elas está a síndrome mama-ovário; a síndrome mama-cólon; a síndrome de Li-Fraumeni. Para o diagnóstico há um critério clínico (características baseadas na história familiar) e o diagnóstico molecular (feito através de um exame de sangue específico). A síndrome mama-ovário está relacionada a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, e portadores desta síndrome têm risco aumentado para câncer de mama, ovário e próstata. A síndrome mama-cólon, na qual, em algumas famílias é observado um elevado número de casos de câncer de mama e câncer de intestino grosso, pode estar associada a alterações em um gene chamado *CHEK2*. A síndrome de Li-Fraumeni está associada a mutações no gene *TP53*.

## **PROCEDIMENTOS**

Após a assinatura deste consentimento (autorização para o estudo), você realizará uma consulta. A história de câncer da sua família será revisada. Ao terminar esta entrevista, você será encaminhado ao laboratório para a retirada da amostra de sangue. No laboratório serão retirados 20ml de sangue (aproximadamente duas colheres de sopa) através de uma agulha colocada no seu braço. O sangue será colocado em dois tubos, identificado e enviado ao laboratório para análise. No laboratório, o sangue

passará por uma máquina que irá verificar se os genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* ou *TP53* têm alguma alteração. Essas alterações são chamadas mutações.

Quando o resultado estiver pronto, você receberá um contato por telefone para agendar uma consulta de retorno. Nesta consulta será divulgado o resultado, e serão discutidas as implicações do teste sobre o risco de câncer e você receberá orientações sobre o significado do resultado para você e a sua família. Você pode se recusar a receber o resultado. Será oferecido apoio de uma psicóloga caso deseje.

Existem três tipos resultados:

1 – você pode ter a alteração em um dos genes estudados (*BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* ou *TP53*). É o que chamamos de resultado positivo: se você tem a alteração no gene, tem 50% de chance de passar a alteração para os seus filhos. O fato de ter alteração, no entanto, não significa que a pessoa irá ter câncer. Um indivíduo com alteração em um dos genes tem um risco mais elevado de desenvolver câncer do que pessoas sem a alteração. O tipo de câncer e a idade com que pode aparecer dependem do tipo de gene alterado. Algumas pessoas com a alteração genética não têm câncer. Uma pessoa que tem a mutação pode realizar acompanhamento para detectar (achar) o câncer em uma fase inicial, aumentando a chance de cura. Os exames realizados para detectar o câncer também dependem do gene que tiver a mutação.

2 – o exame não identificou alterações nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* ou *TP53*. Isto é chamado de resultado inconclusivo. Isto pode ocorrer em duas situações: você tem alterações em outros genes que não foram os estudadas, ou o teste de laboratório utilizado não conseguiu encontrar a alteração. Os indivíduos com teste inconclusivo devem prosseguir com os exames de seguimento, pois ainda têm risco elevado para desenvolver câncer de acordo com a história familiar.

3 – o exame encontrou uma alteração que não é possível determinar se ela está associada a um risco maior de câncer. Os indivíduos este resultado devem prosseguir com os exames de seguimento, pois ainda têm risco elevado para desenvolver câncer de acordo com a história familiar.

O resultado será divulgado apenas para você. Você pode optar, em qualquer momento do estudo, a não saber do resultado dos exames. A decisão de contar aos seus familiares é sua. Os seus familiares podem se beneficiar com esta informação, pois podem programar com que frequência os exames de prevenção do câncer podem ser realizados. O seu teste não terá custo.

## **BENEFÍCIOS**

A participação estudo pode não trazer benefícios para você ou para os membros de sua família; mas pode ajudar os médicos a compreender como o câncer se desenvolve. Se o teste mostrar que você tem alteração no gene, isto pode auxiliar o médico nas orientações que serão fornecidas sobre os exames preventivos.

## **RISCOS**

Os riscos associados com sua participação nesse estudo são dor ou queimação no local da retirada da amostra de sangue para o exame. Não há previsão de indenização para eventuais danos.

Além disso, o teste pode causar alterações psicológicas. Ao saber sobre o seu risco de câncer devido alterações nos genes você poder sentir aumento na ansiedade, ou raiva, ou medo do futuro. Será oferecido apoio de uma psicóloga caso deseje, sem custo a você.

## **REEMBOLSO AO PACIENTE**

Você não receberá nenhum tipo de remuneração financeira pela sua participação neste estudo. Entretanto, você será reembolsado pelas despesas decorrentes da sua participação, tais como transporte e alimentação, se necessário.

## **ASPECTOS ÉTICOS**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A.C. Camargo e também pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, órgão do Ministério da Saúde.

A confidencialidade das suas informações será mantida. Apenas as pessoas envolvidas diretamente nesse estudo poderão inspecionar as informações se necessário. Cada família e cada indivíduo inserido na família terá um número identificador para manter a privacidade. Esse número será o meio pelo qual você será identificado. Seu nome e informações pessoais não serão incluídos em nenhum estudo de pesquisa que possa fazer uso de seu sangue e/ou de pedaço de tecido, nem serão incluídos divulgação dos resultados em revistas científicas.

O material para este estudo permanecerá armazenado durante 2 anos, que é o período de execução do projeto e não será utilizado para nenhum outro estudo sem o seu sua aprovação.

A sua participação neste estudo é voluntária, portanto, você tem o direito de retirar-se do estudo a qualquer momento. Sua recusa ou desistência não irá prejudicar o seu tratamento ou seguimento tratamento.

A pesquisa pode ser suspensa ou encerrada a qualquer momento pelo Hospital A.C. Camargo, ou pelo responsável do estudo, ou pelo Comitê de Ética em Pesquisa, ou pelos órgãos de fiscalização, caso seja verificada que o estudo possa oferecer prejuízo aos sujeitos de pesquisa. Isto poderá acontecer sem aviso prévio, no entanto o paciente será notificado por contato telefônico a ser realizado por um dos pesquisadores do estudo.

Qualquer dúvida sobre o estudo, você poderá entrar em contato com a enfermeira Erika no telefone 2189 5000 ramal 2304 ou com o pesquisador responsável Ricardo Renzo Brentani, no telefone 2189 5090. Se os pesquisadores não fornecerem as informações ou esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital do Câncer – SP, pelo telefone 2189.5020.

Declaro que fui esclarecido:

- sobre os procedimentos, riscos e benefícios sobre este estudo;
- que tenho liberdade em retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo a continuidade do meu tratamento;
- que não haverá remuneração financeira para este estudo;
- sobre a segurança de que minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial.

Concordo em participar deste estudo.

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

---

Assinatura do paciente ou responsável/representante local

---

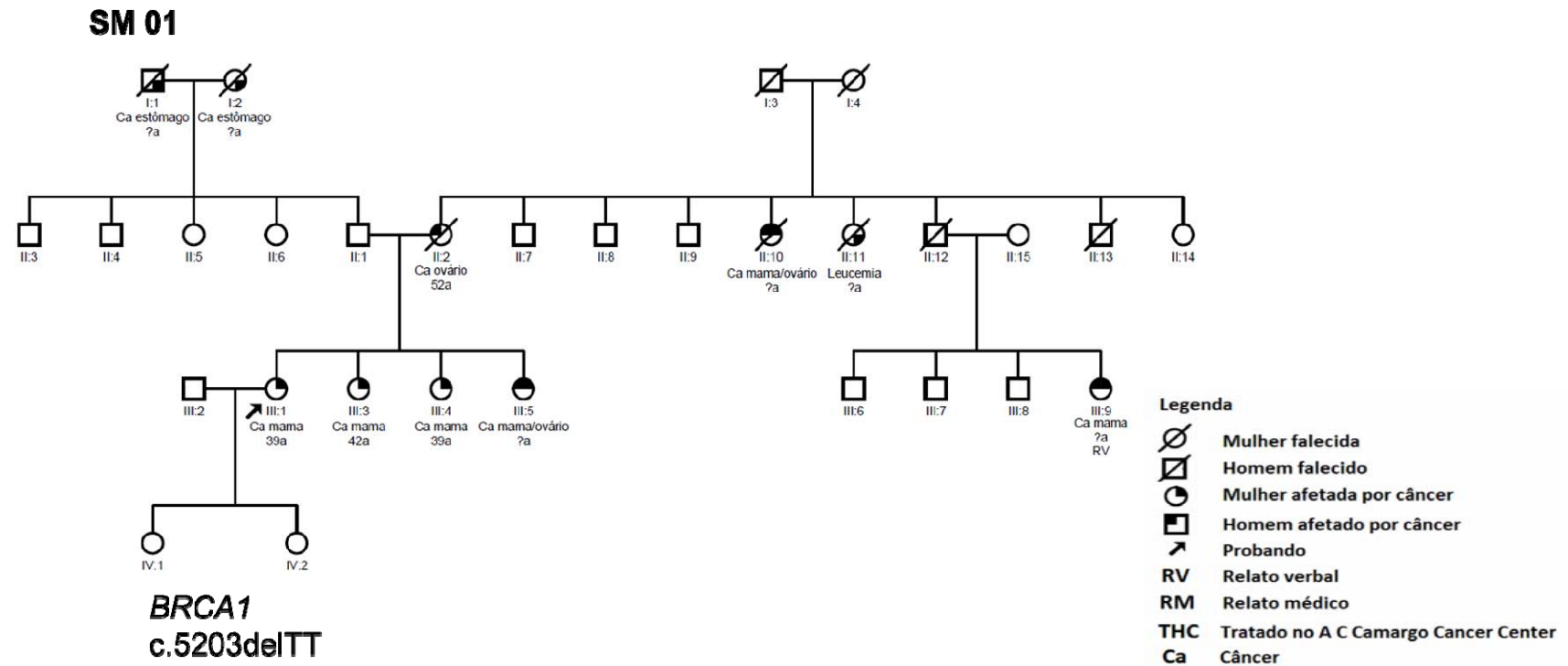
Nome do pesquisador ou representante que explicou este consentimento

---

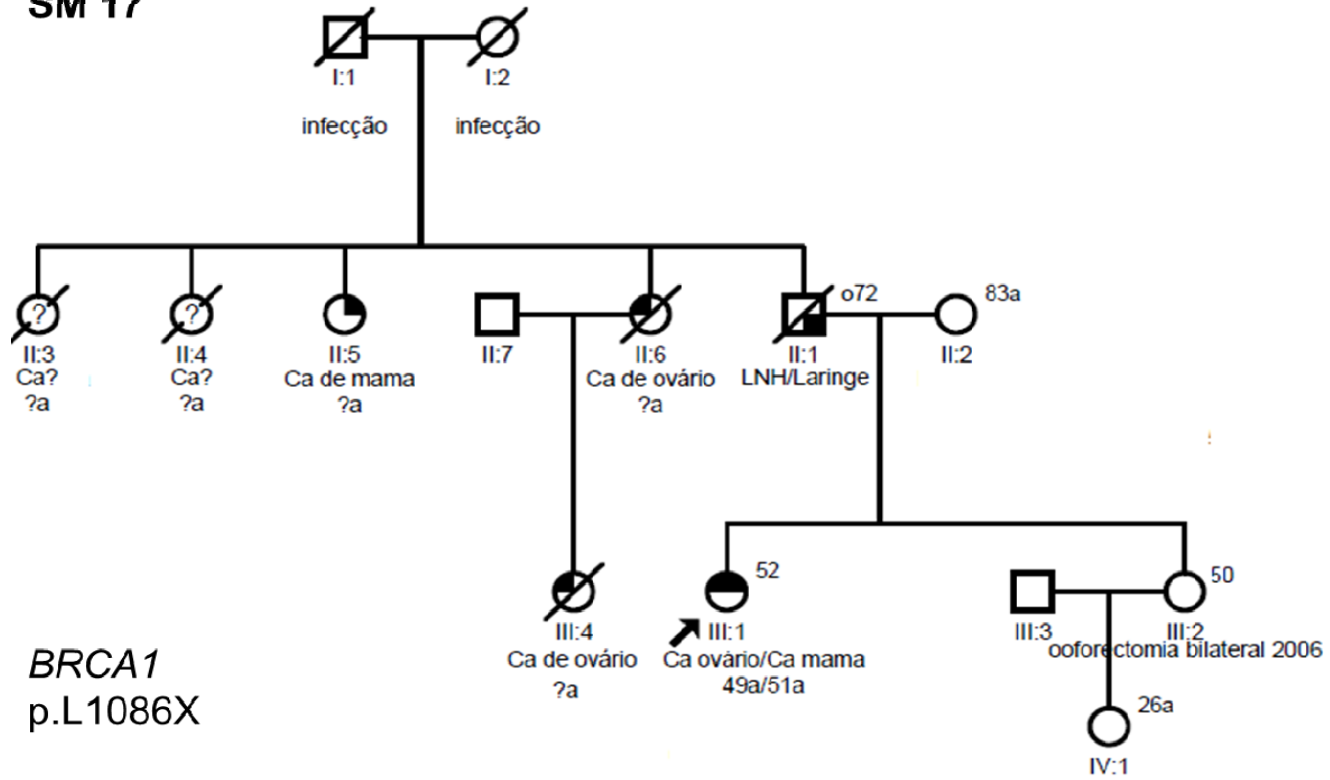
Assinatura do pesquisador ou representante

Anexo 2 – Heredogramas dos pacientes com alteração identificada

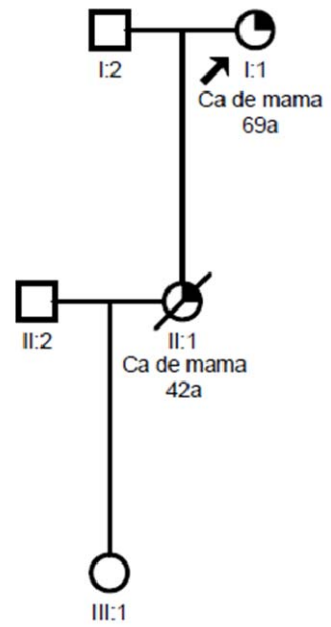
2.1 -Heredogramas dos pacientes portadores de mutações no gene *BRCA1*



SM 17

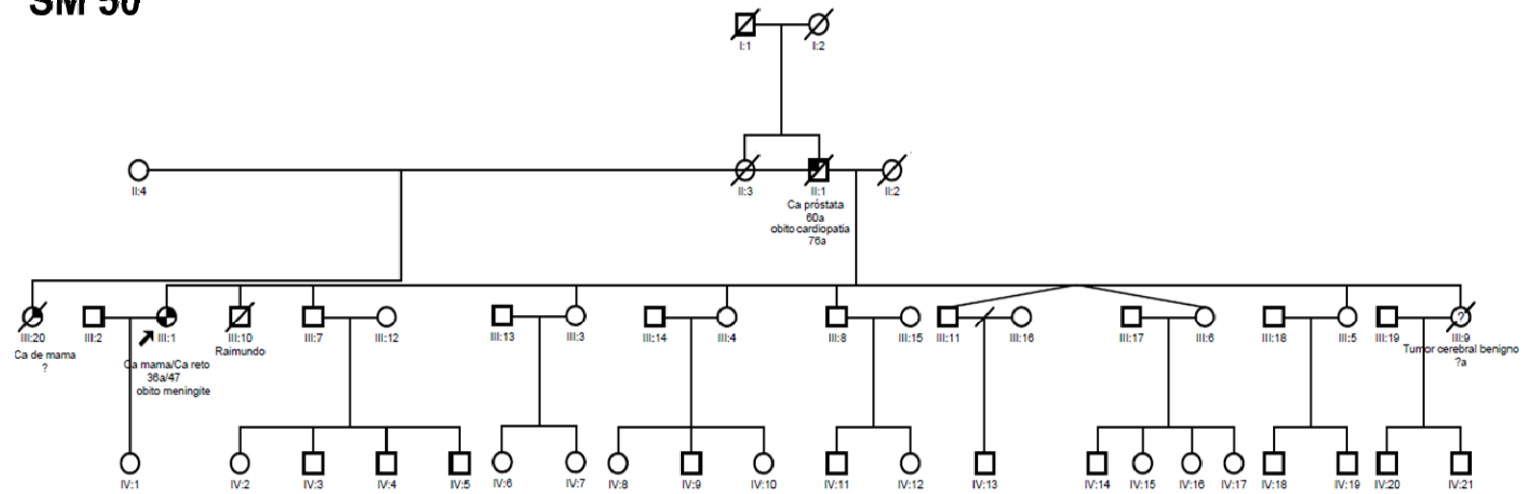


**SM 25**



**BRCA1**  
**c.120 A>G; p.M1V**

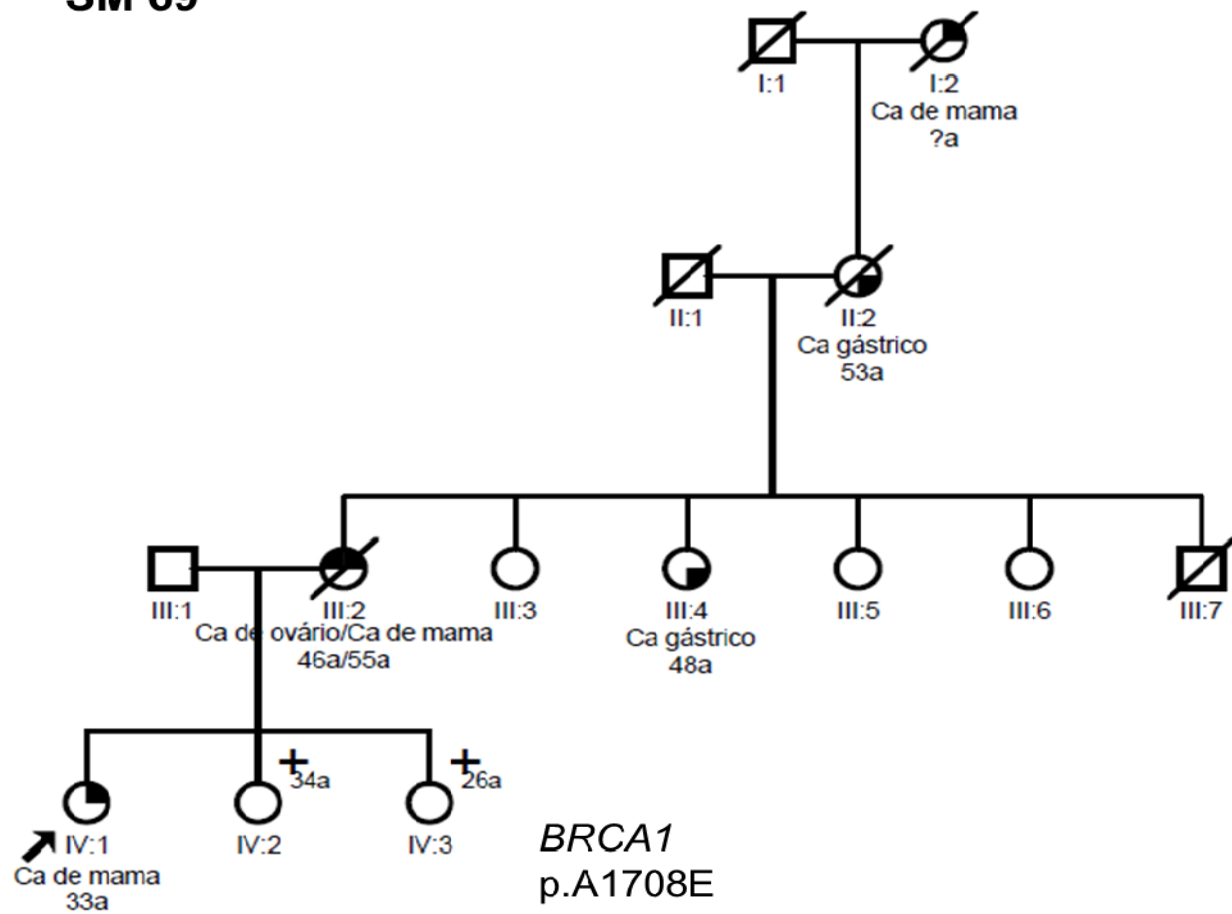
# SM 50



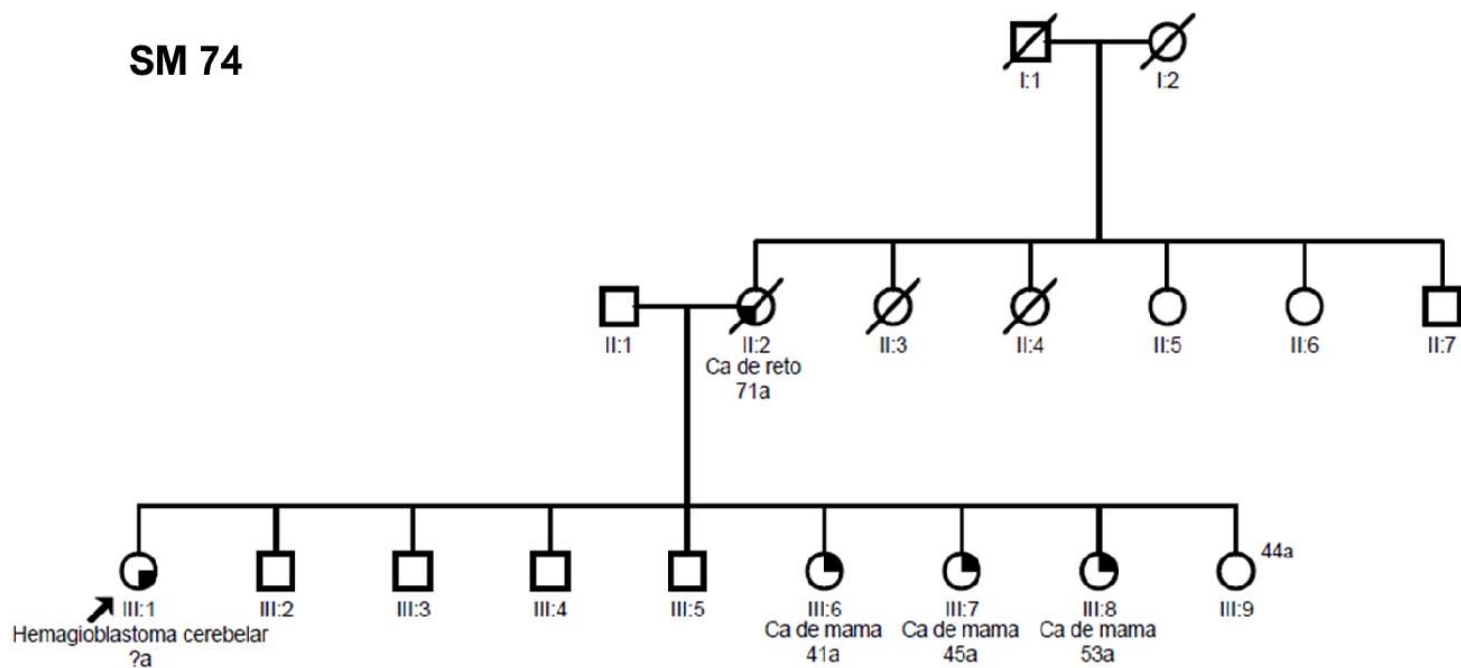
**BRCA1**  
**c.4794+1G>A**



SM 69

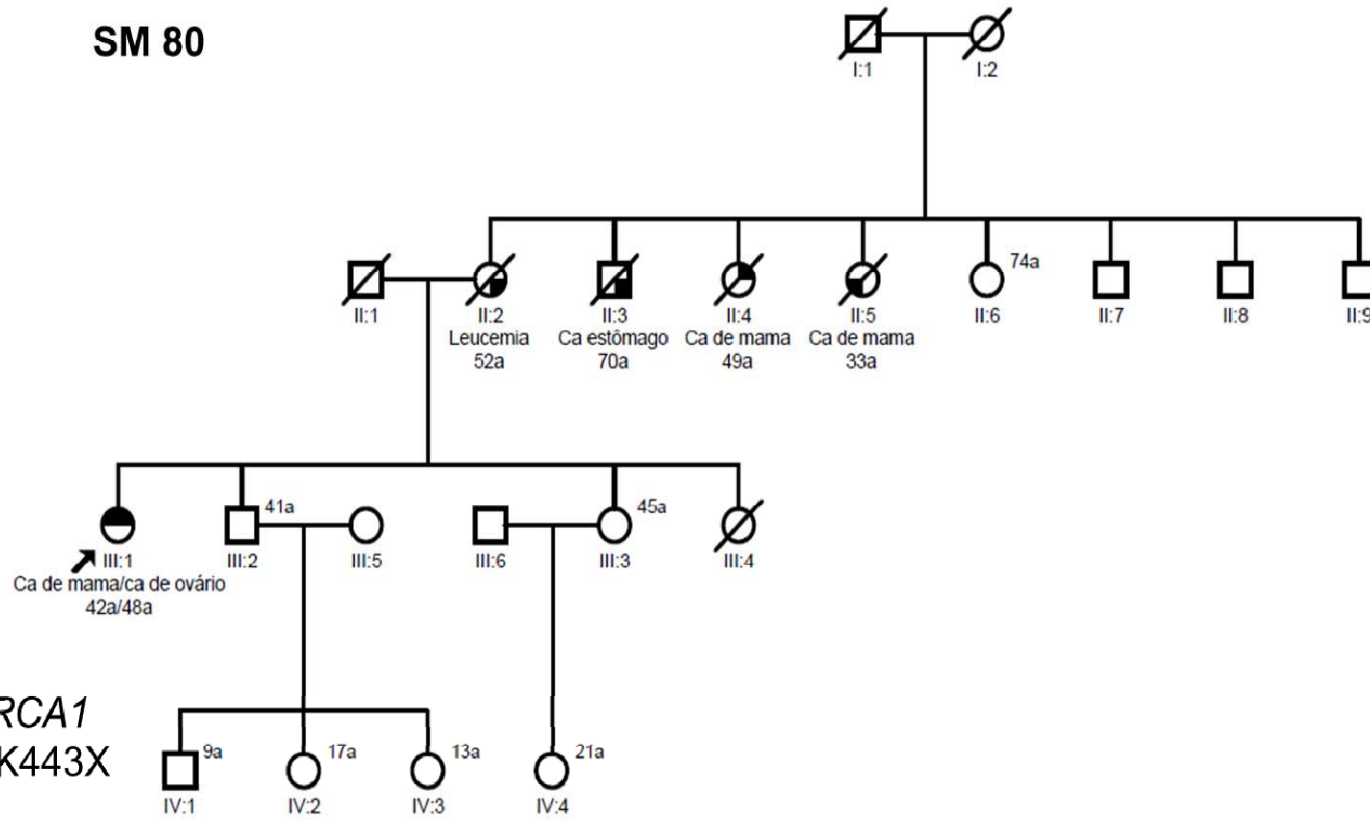


SM 74



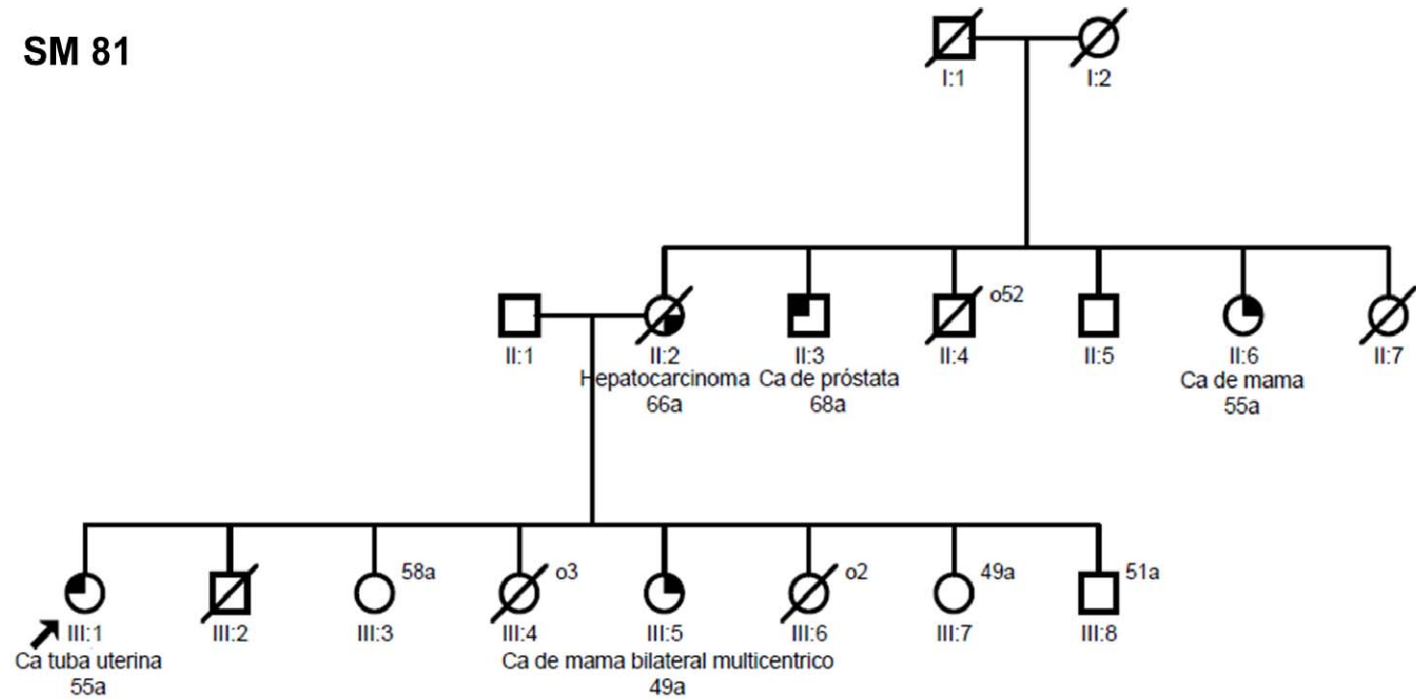
BRCA1  
c.2080delA

SM 80



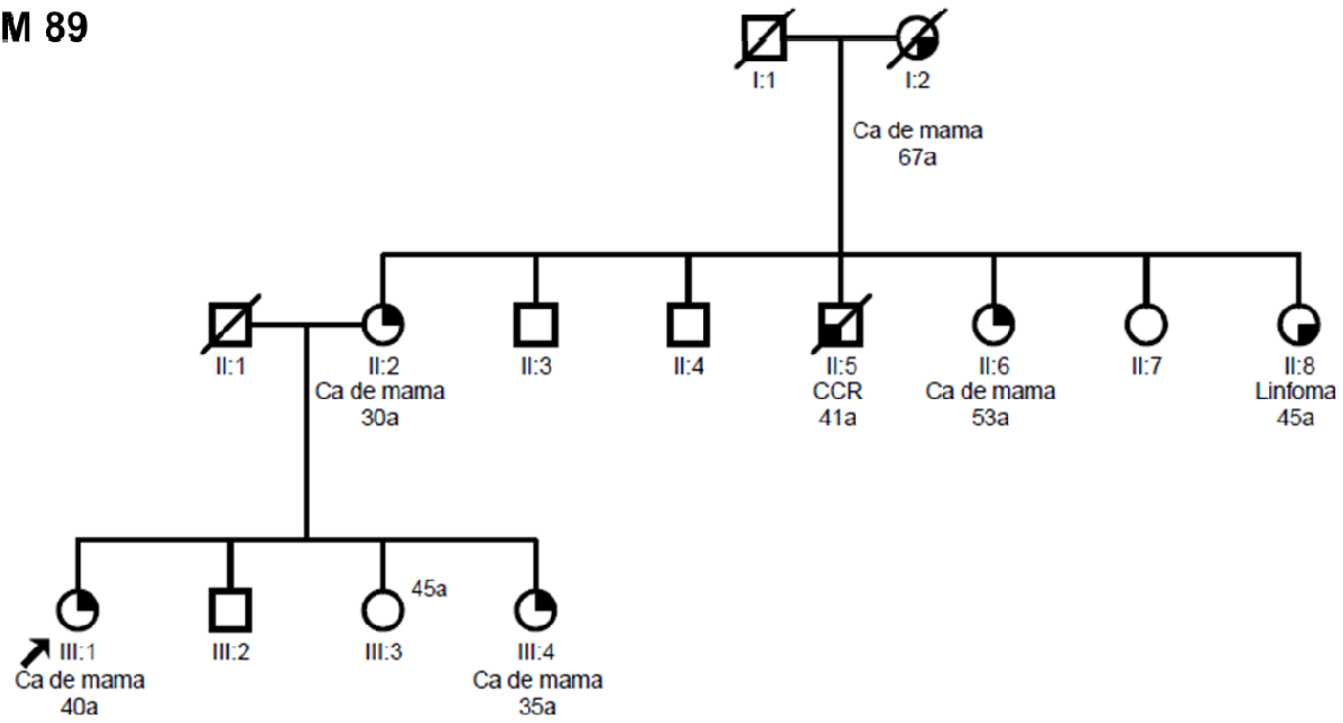
*BRCA1*  
p.K443X

SM 81



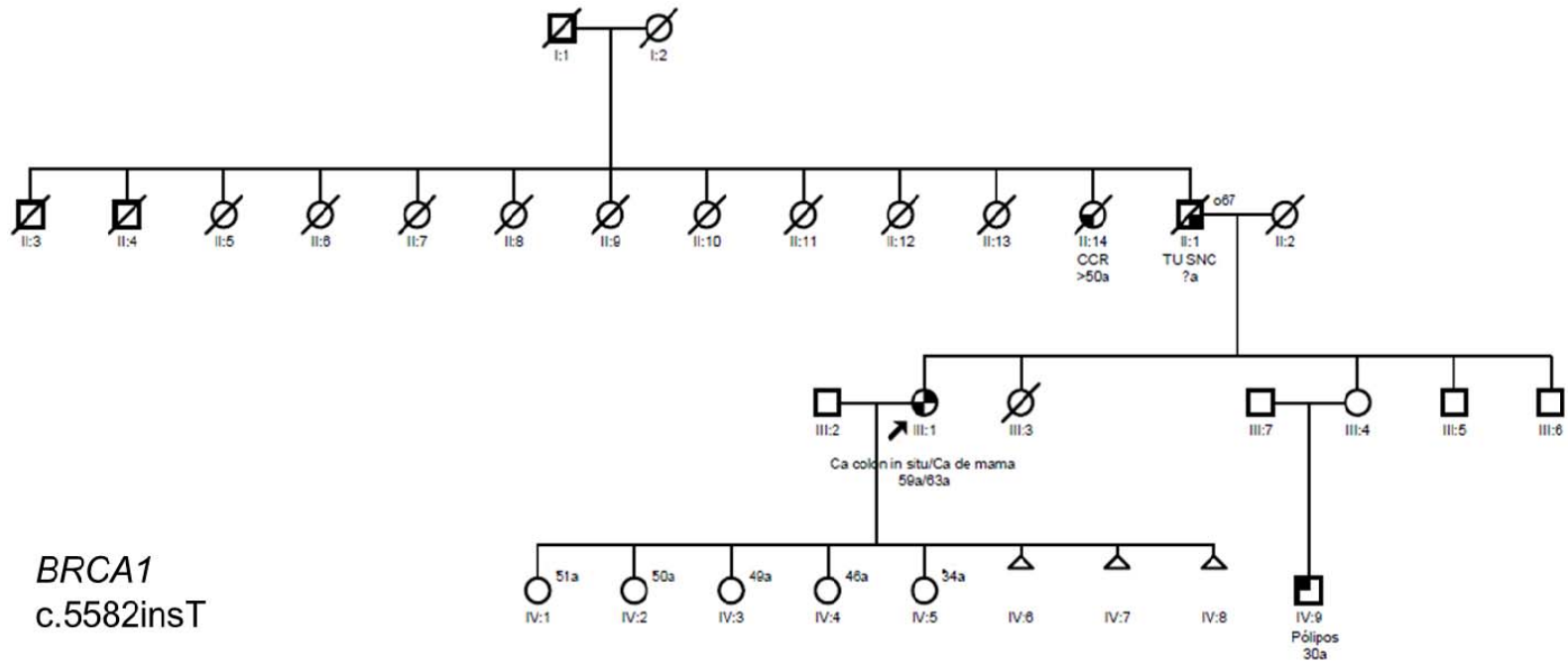
**BRCA1**  
c.5582insT

SM 89



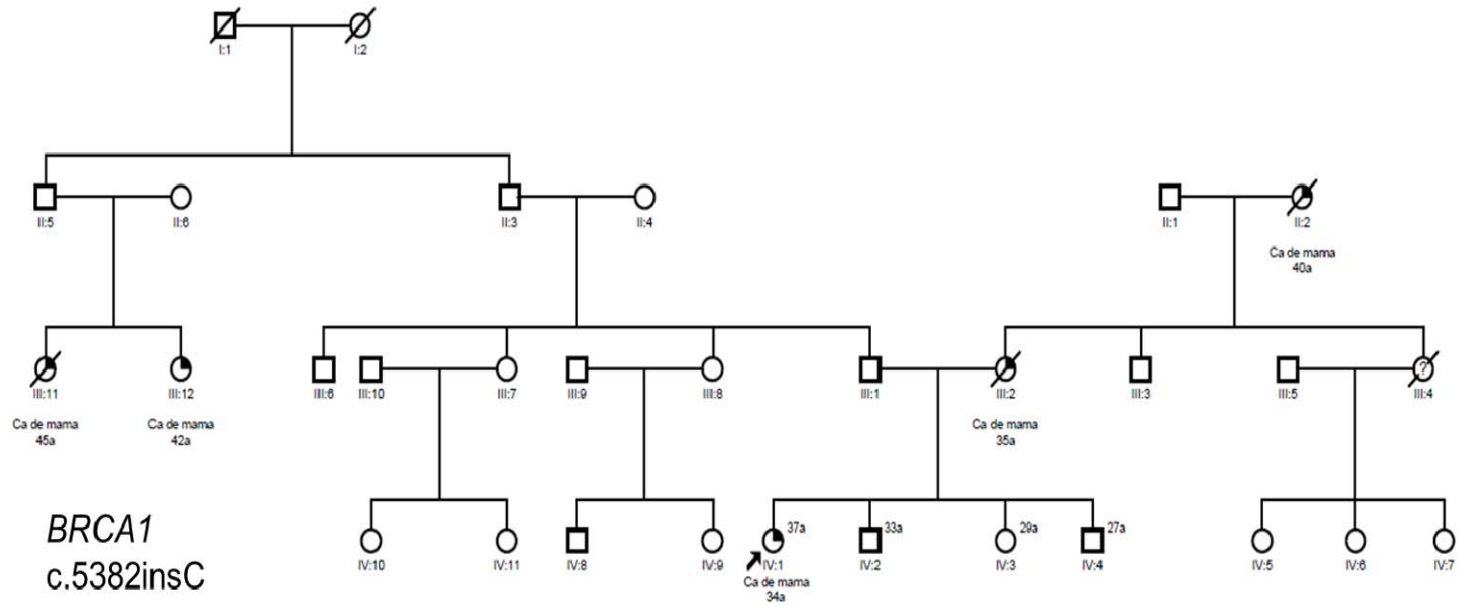
**BRCA1**  
p.Y1429X

# SM 102



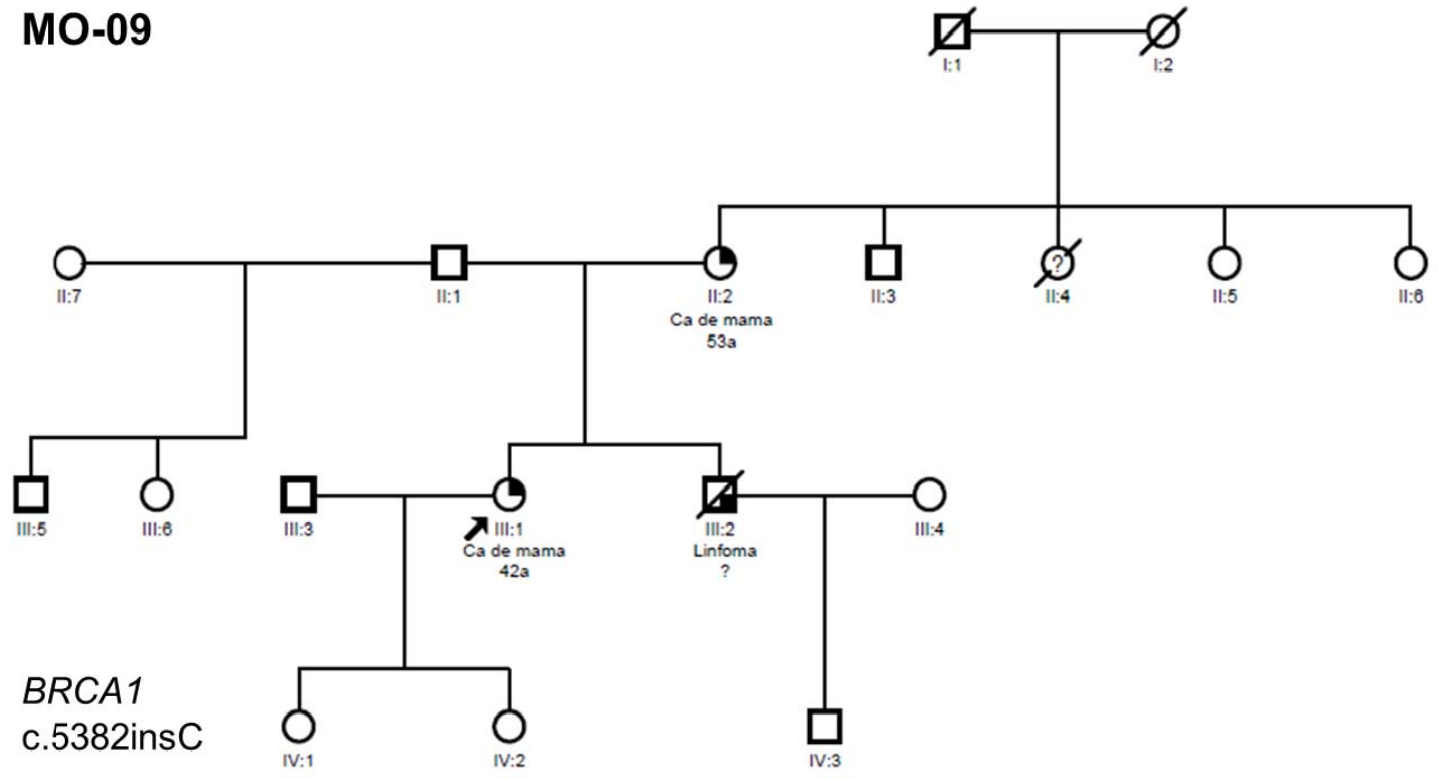
*BRCA1*  
c.5582insT

# MO-07



*BRCA1*  
c.5382insC

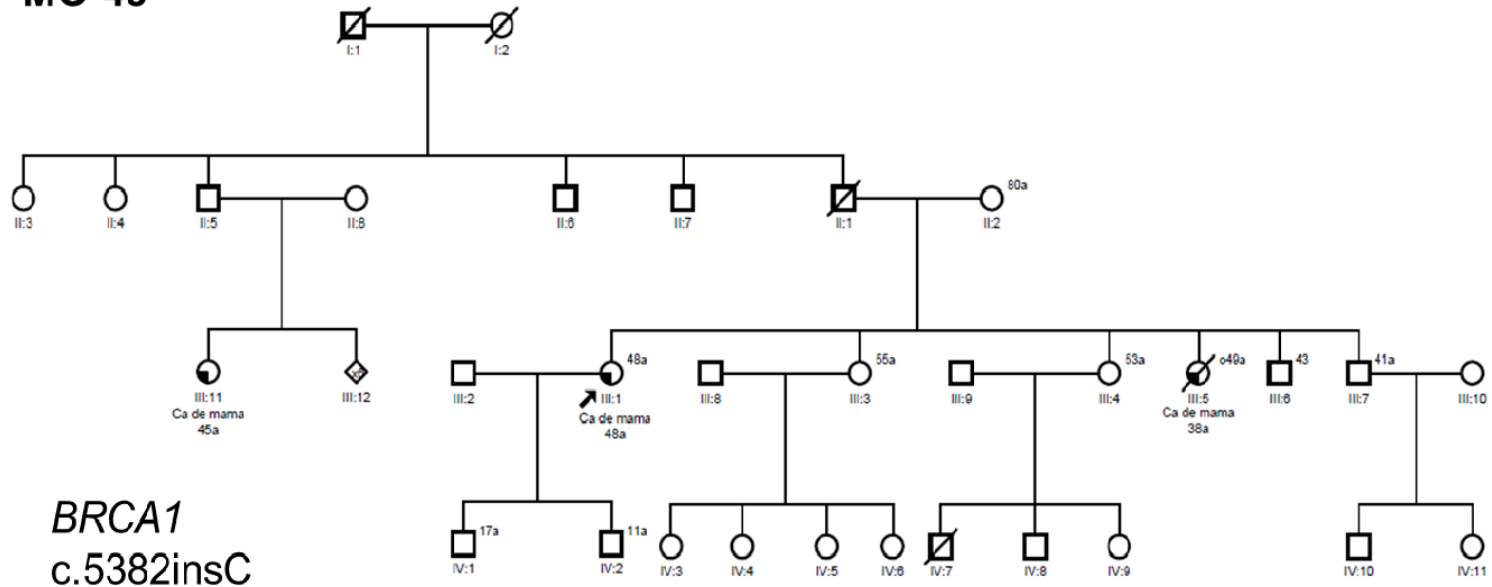
MO-09



*BRCA1*  
c.5382insC

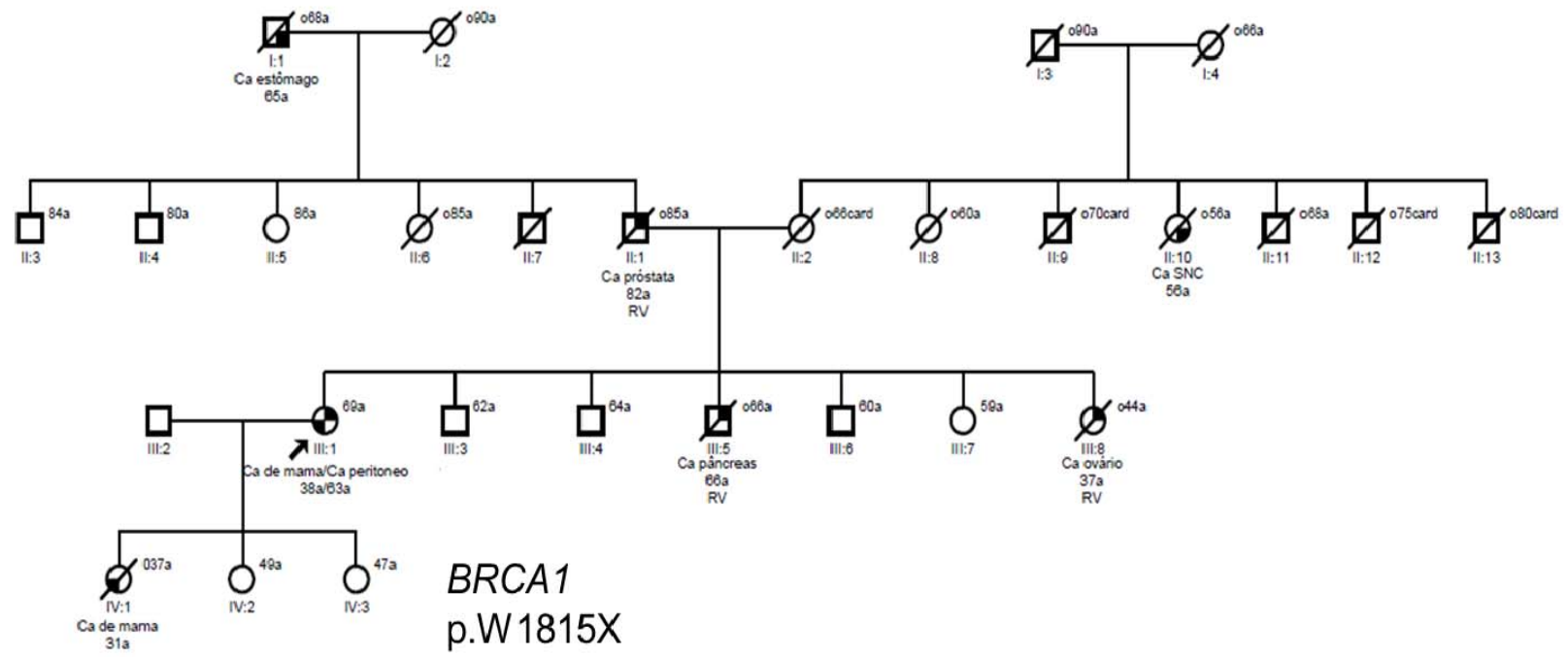


**MO-45**

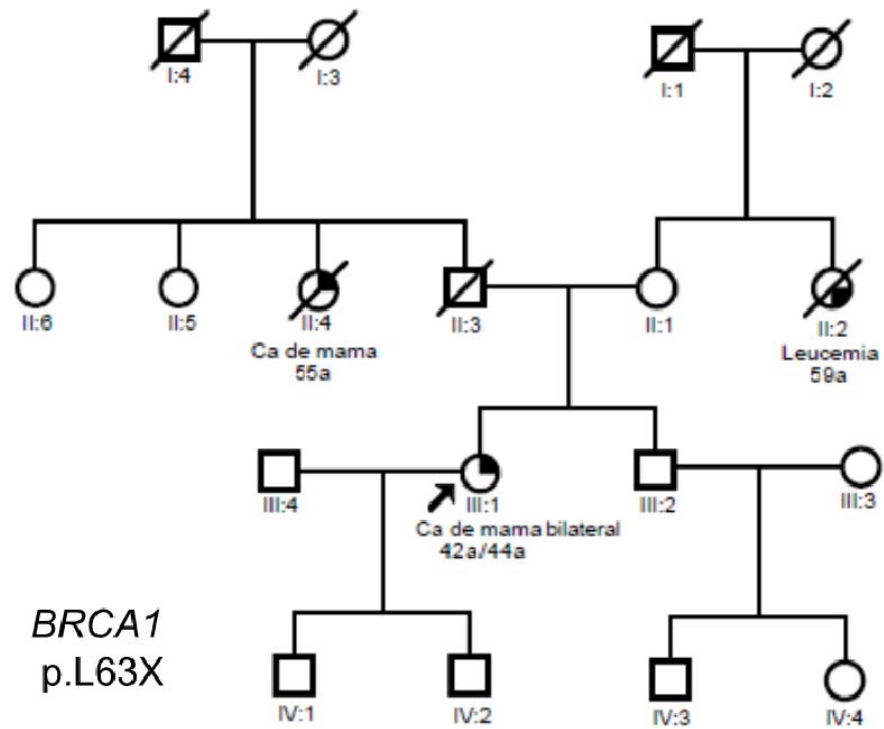


*BRCA1*  
c.5382insC

# MO-31



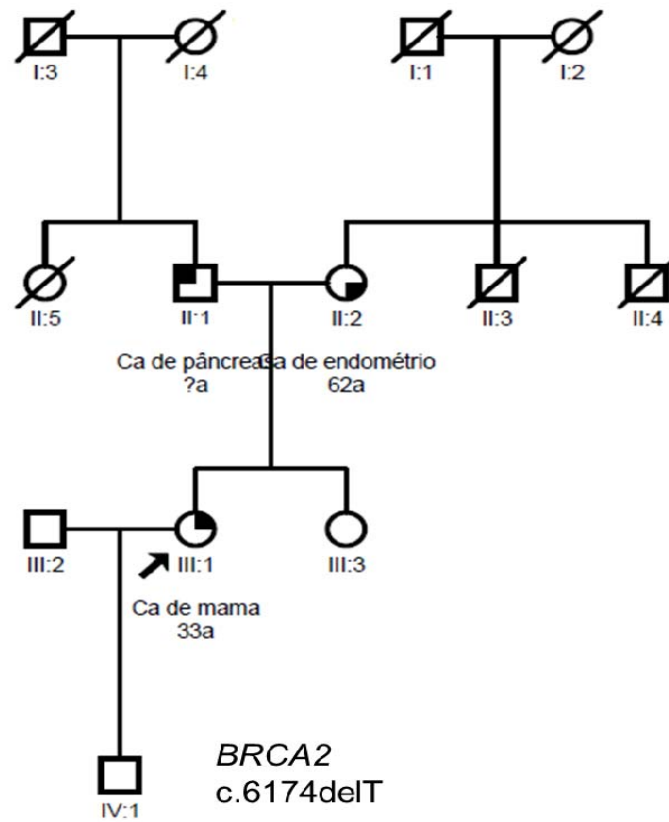
**MO-38**



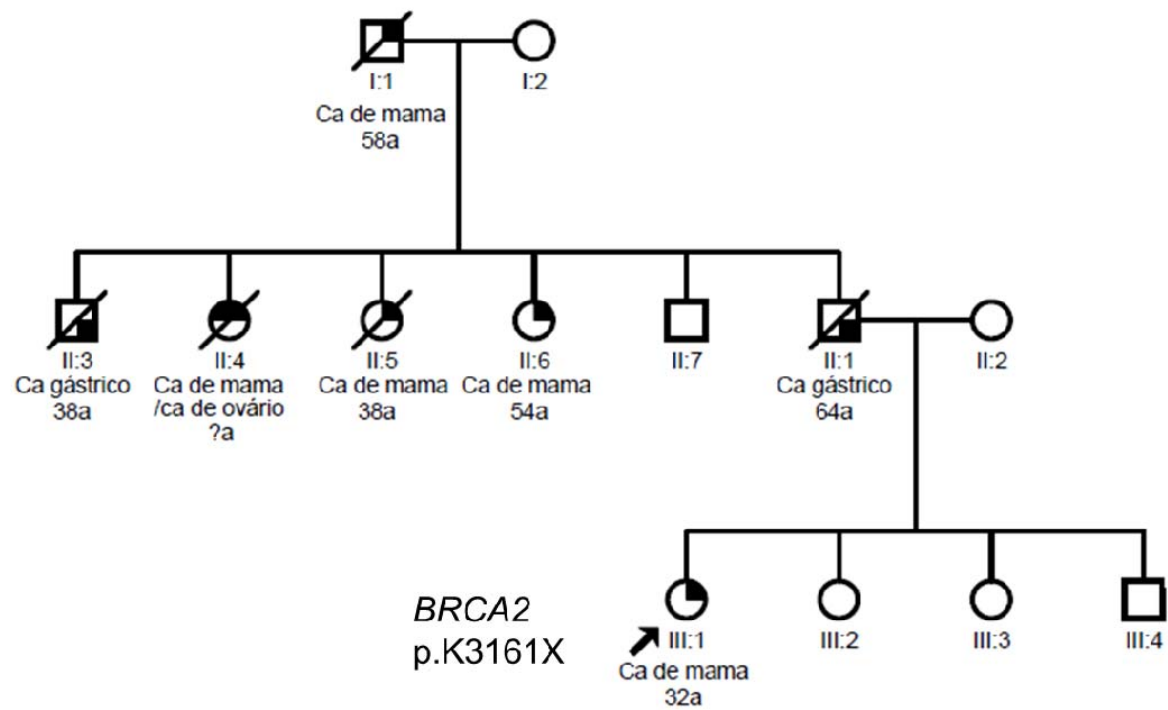
*BRCA1*  
p.L63X

## 2.2 Heredogramas dos pacientes portadores de mutações no gene *BRCA2*

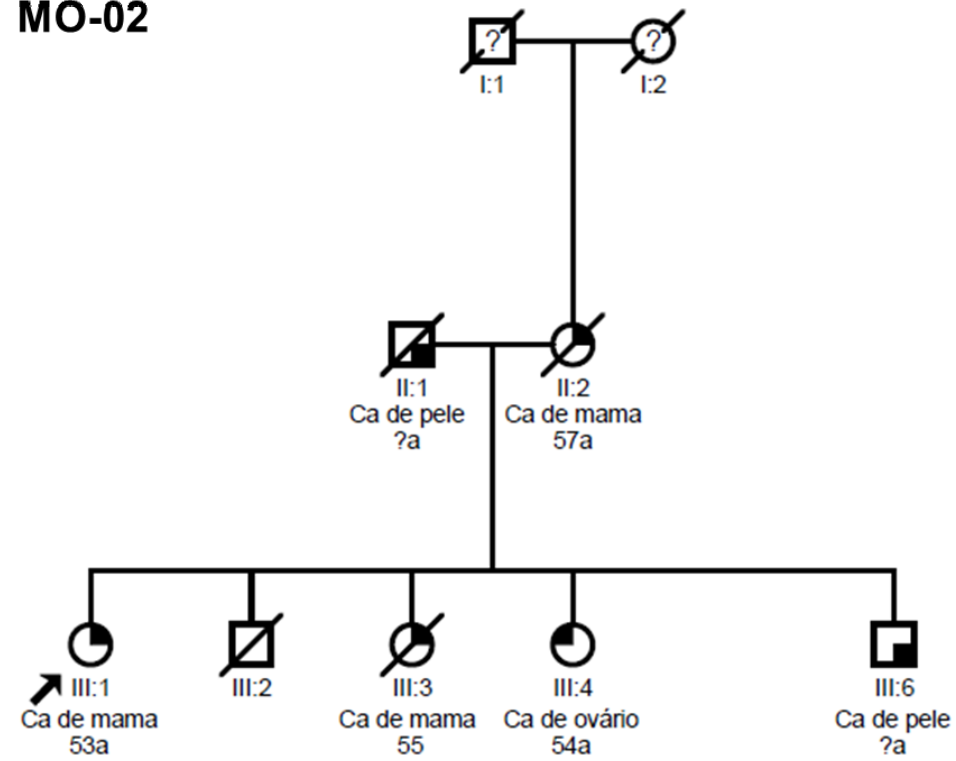
### SM 08



**SM 46**

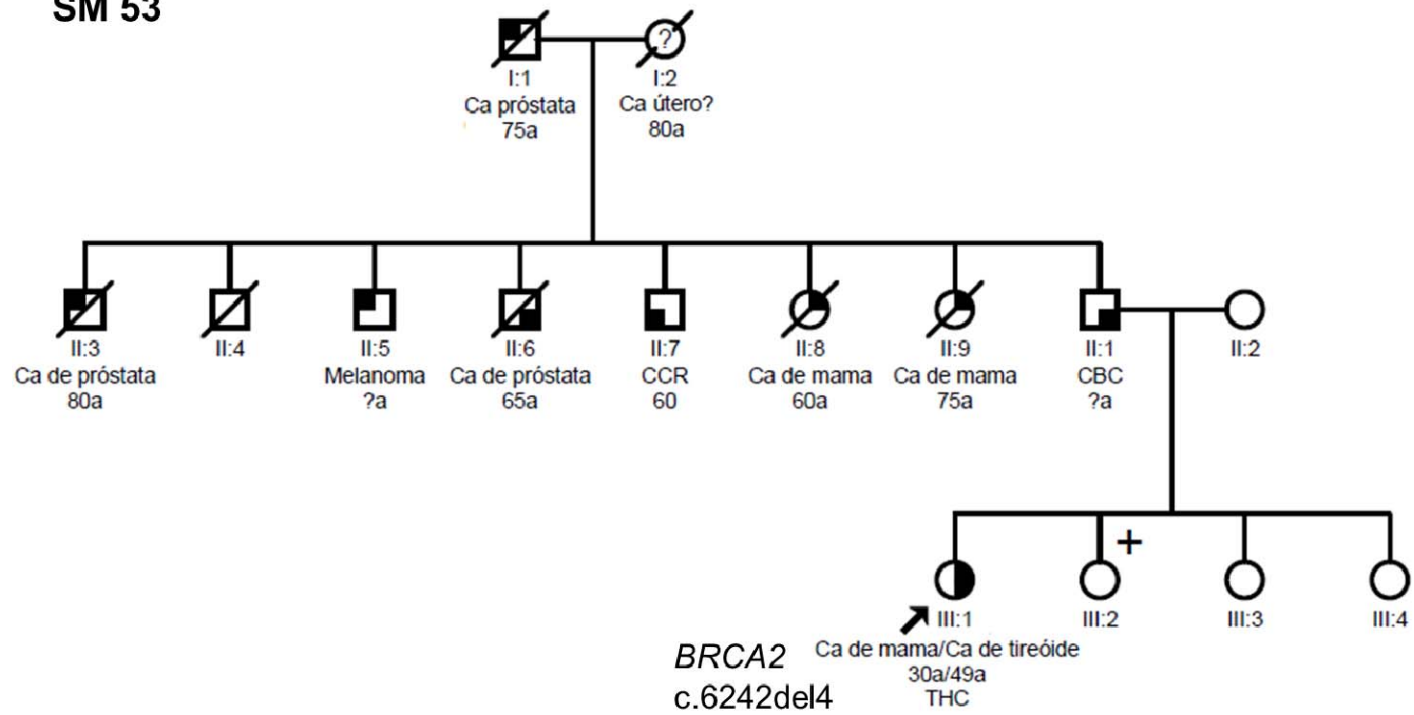


MO-02

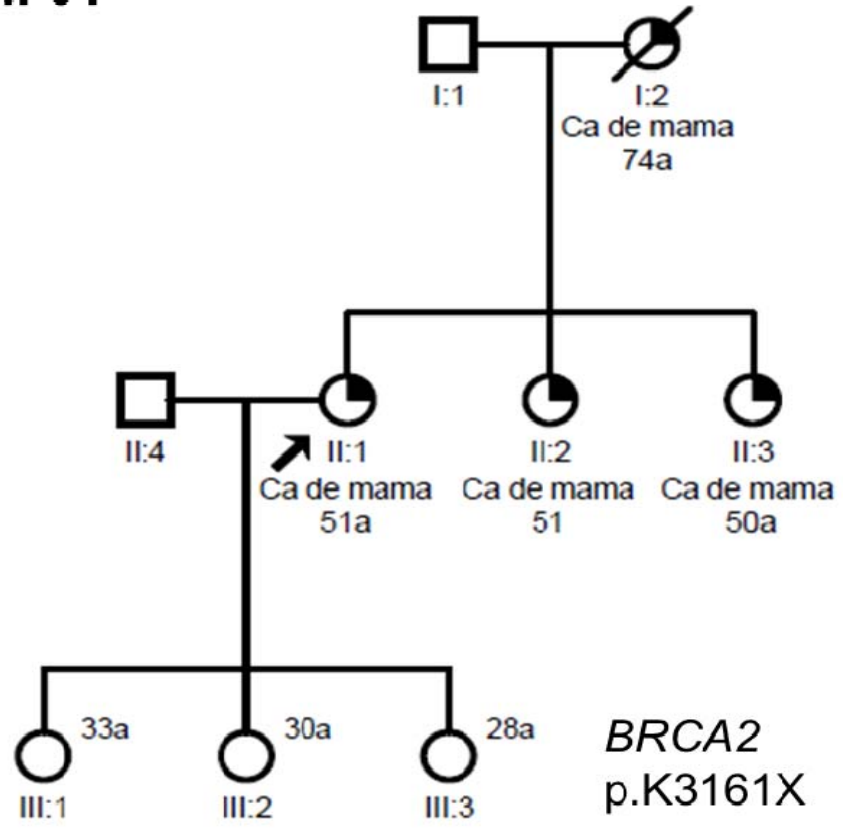


*BRCA2*  
p.K3128X

SM 53

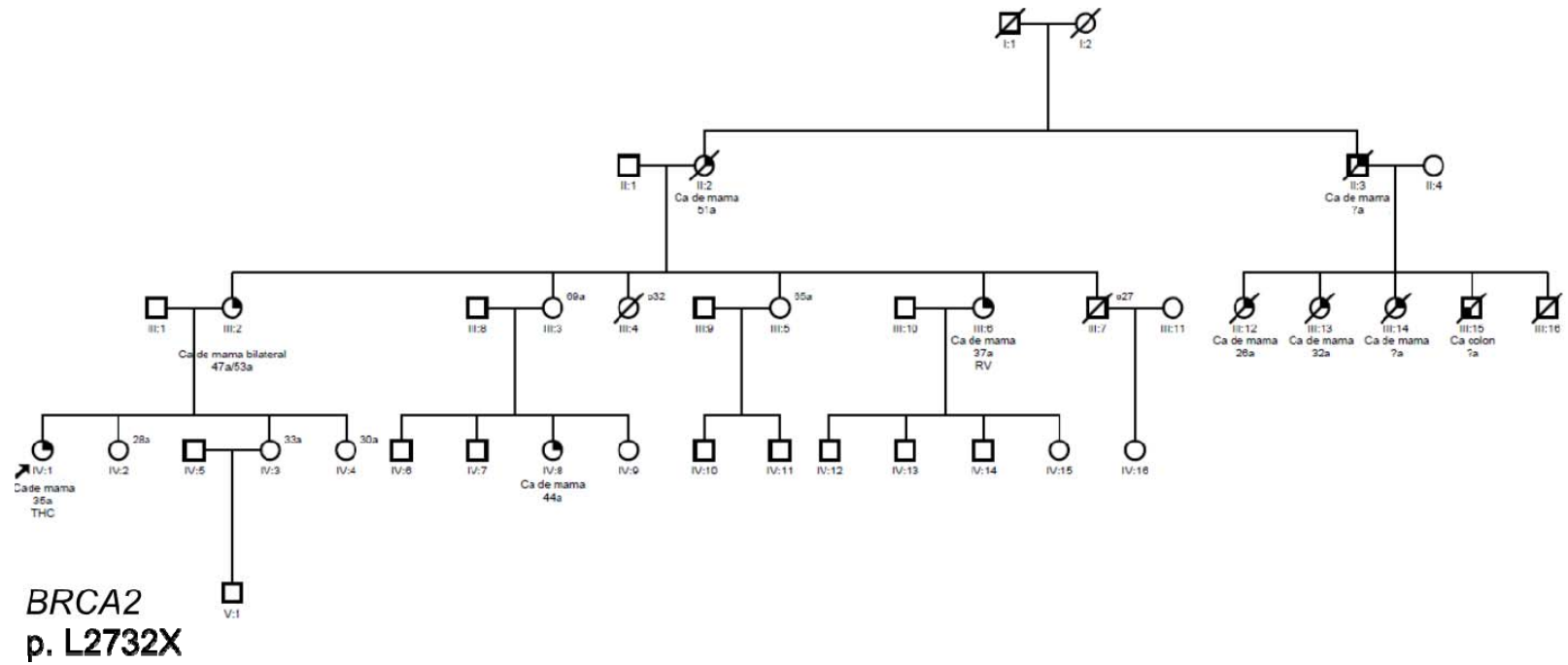


**SM 61**

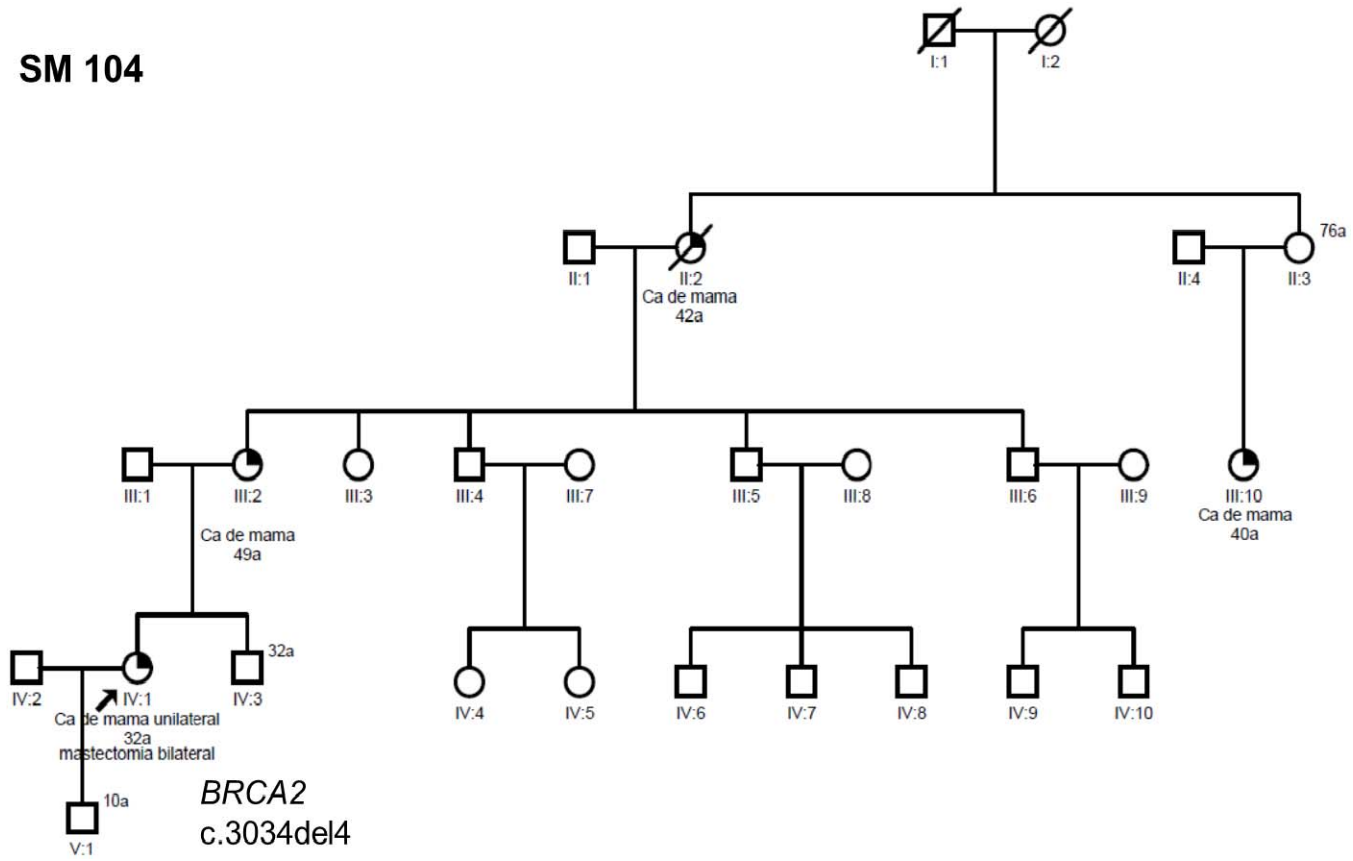




# SM 84

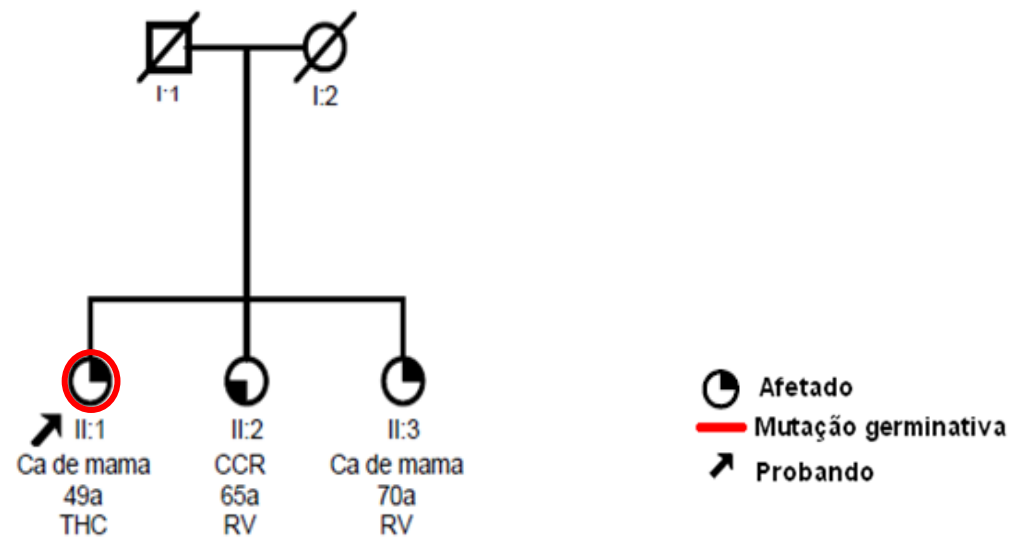


SM 104

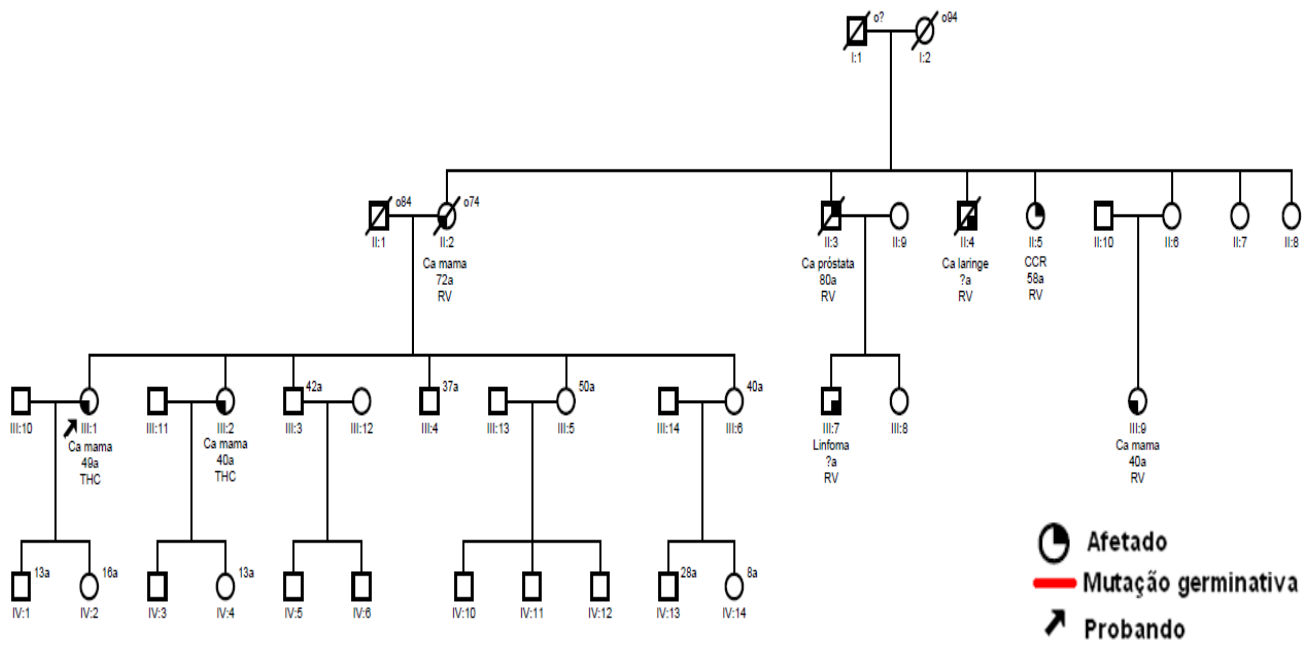


### 2.3 Heredogramas dos pacientes portadores de mutações no gene *TP53* (R337H)

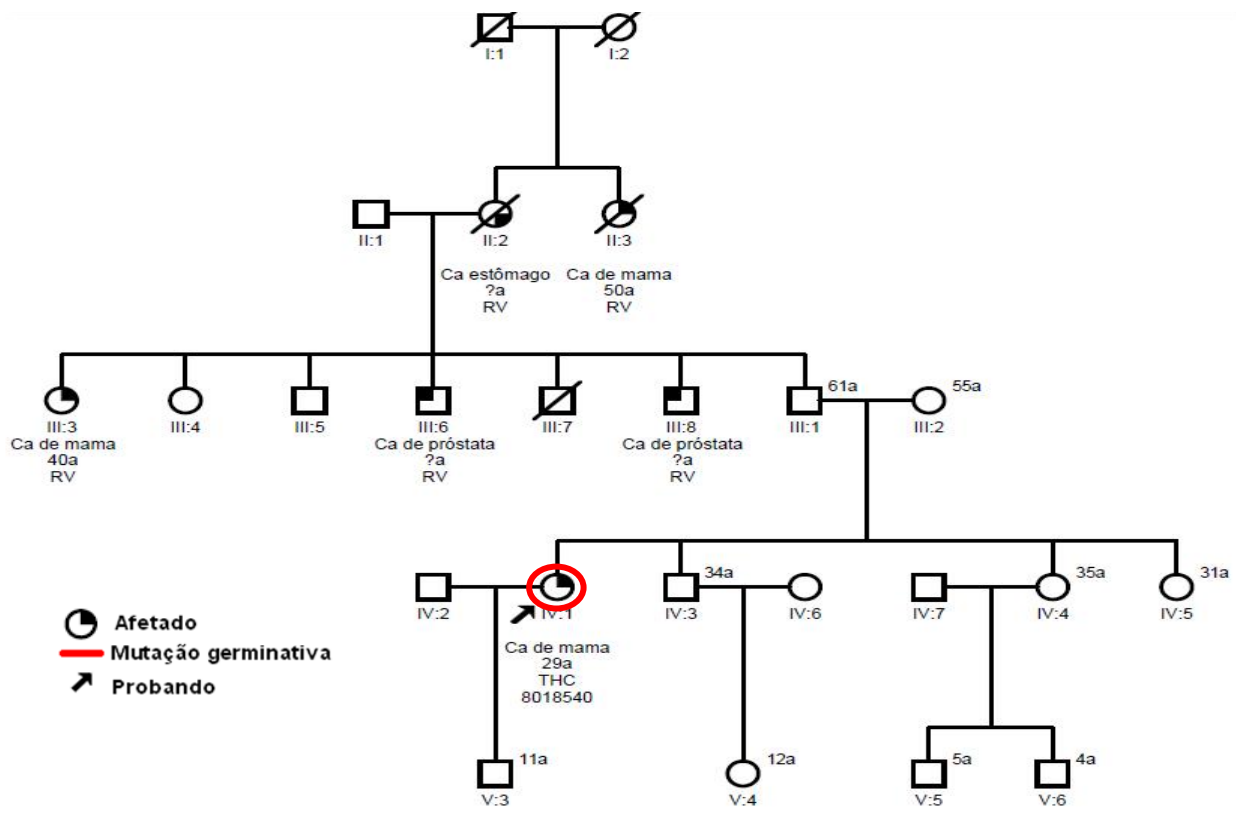
SM-31



SM-36

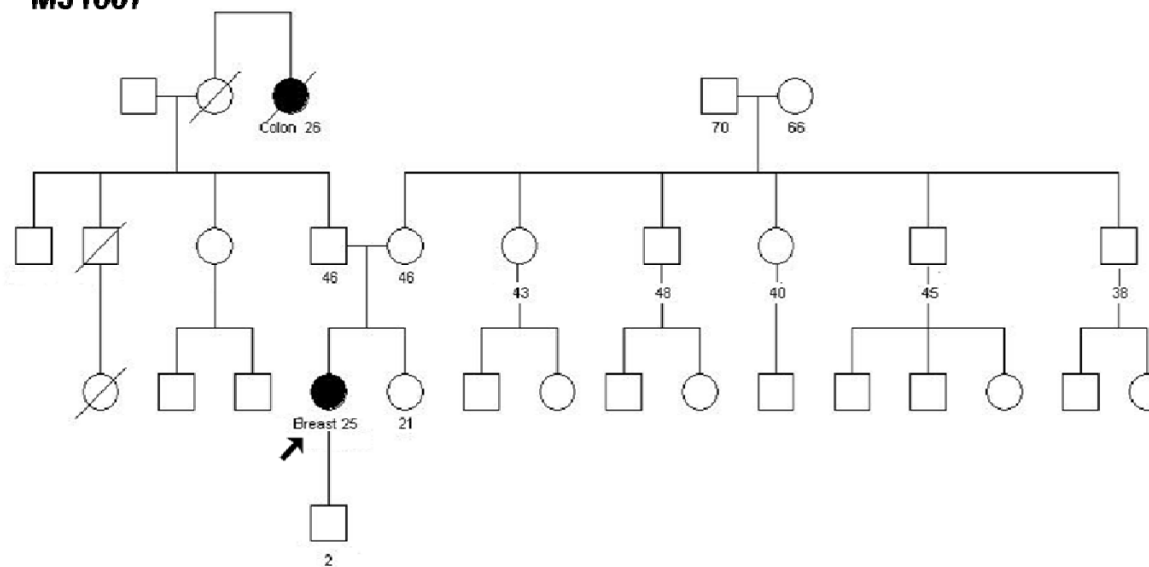


SM-82

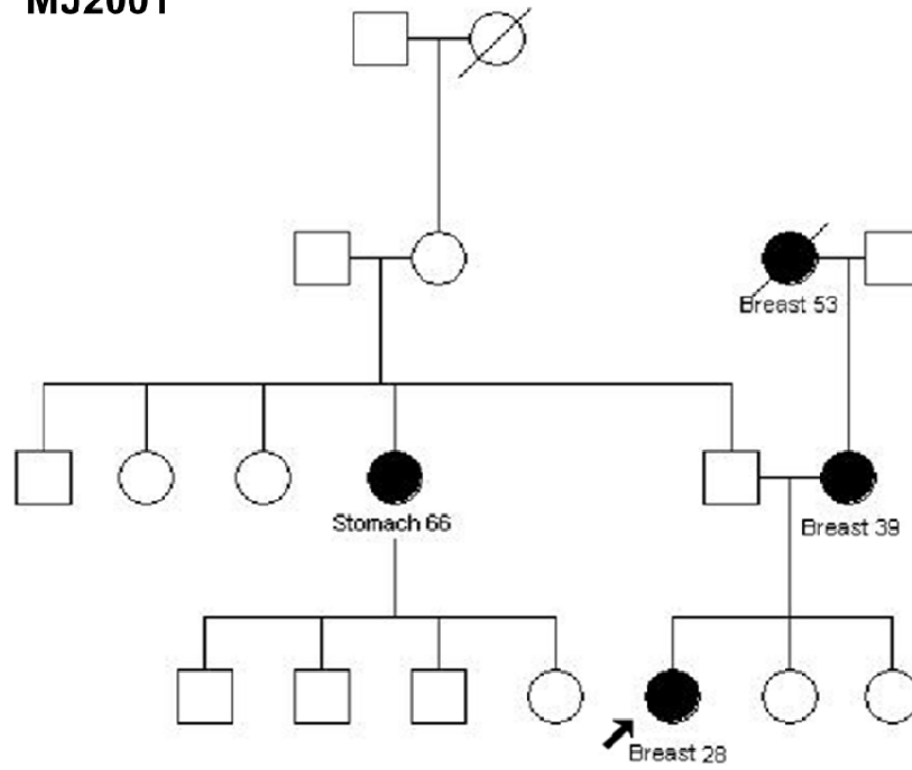


Anexo 3 – Heredogramas dos pacientes selecionados para fazer sequenciamento do exoma.

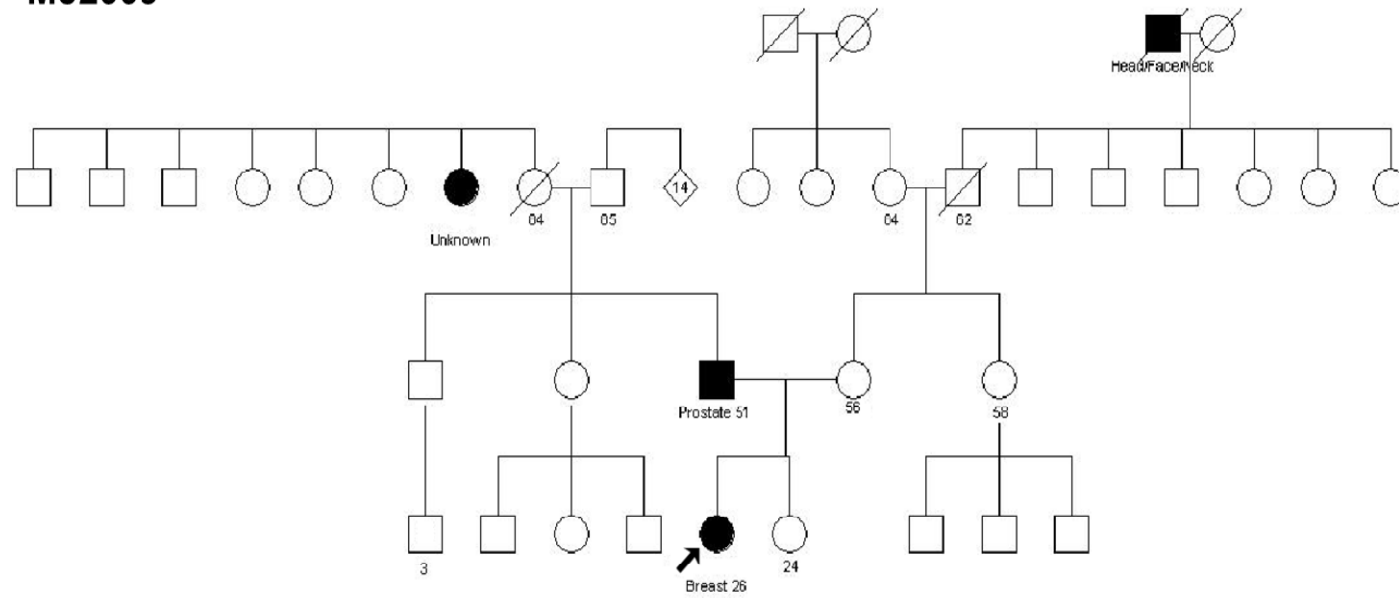
**MJ1007**



MJ2001

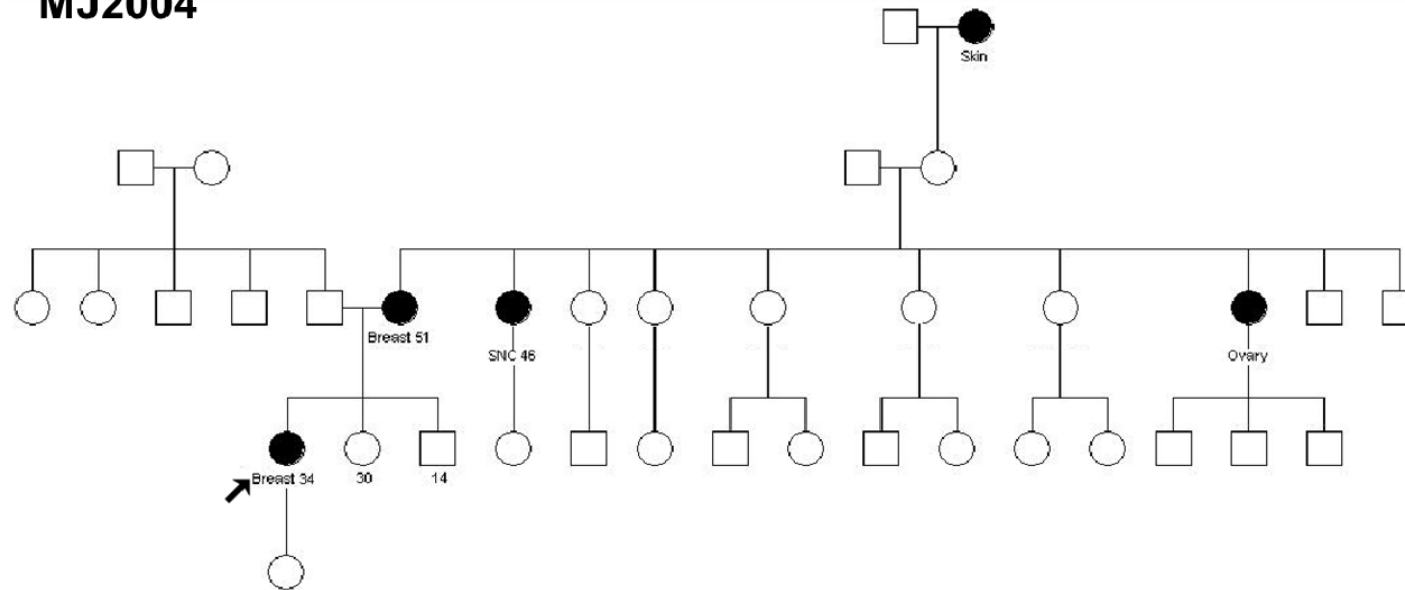


# MJ2003

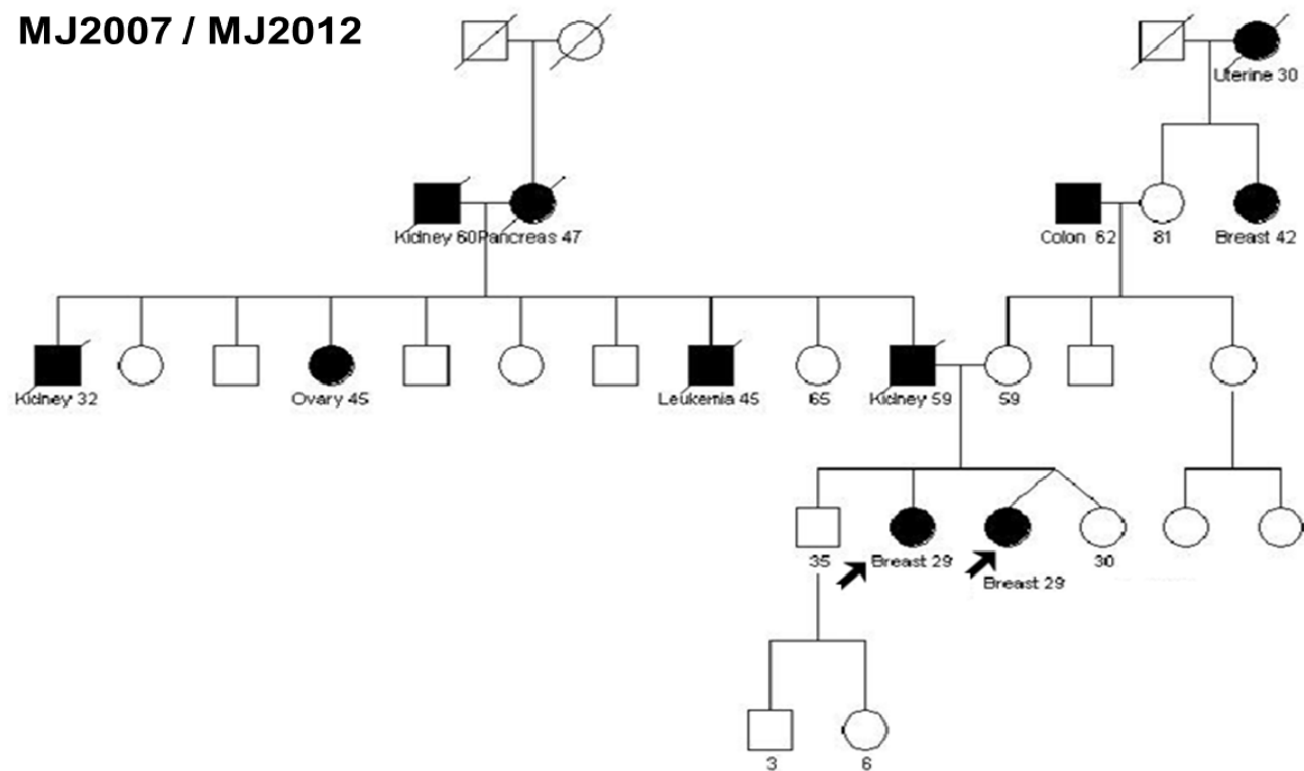




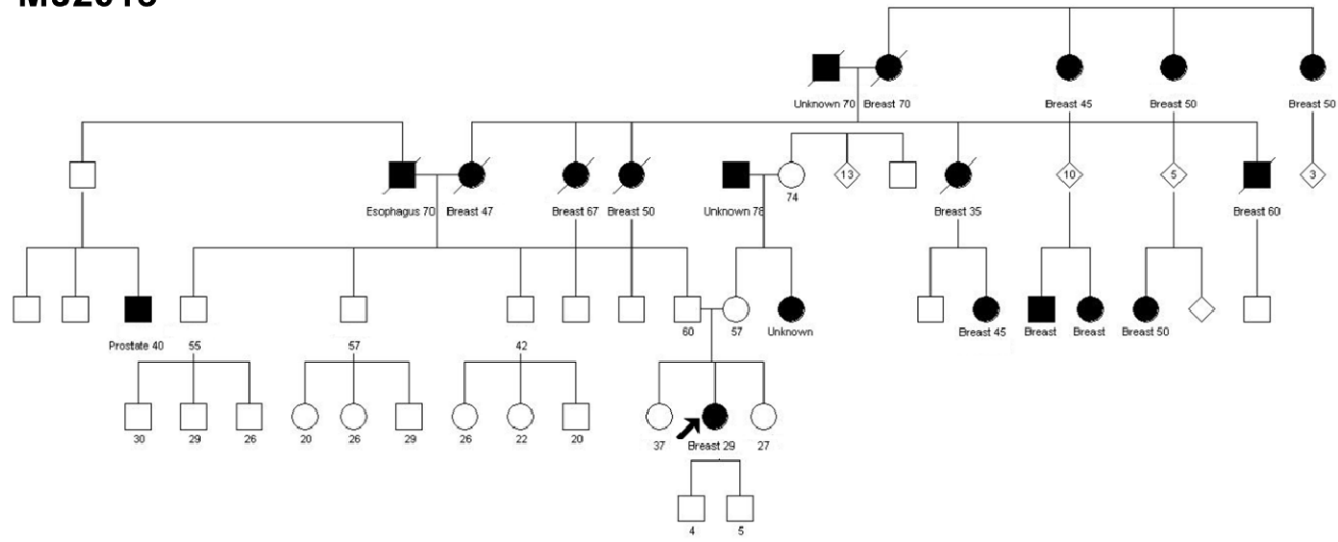
MJ2004



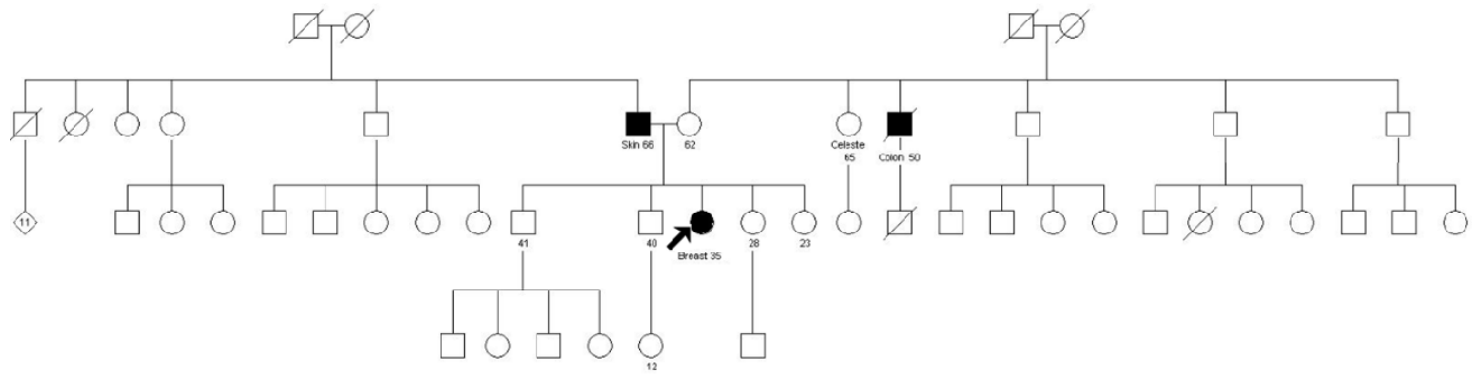
MJ2007 / MJ2012



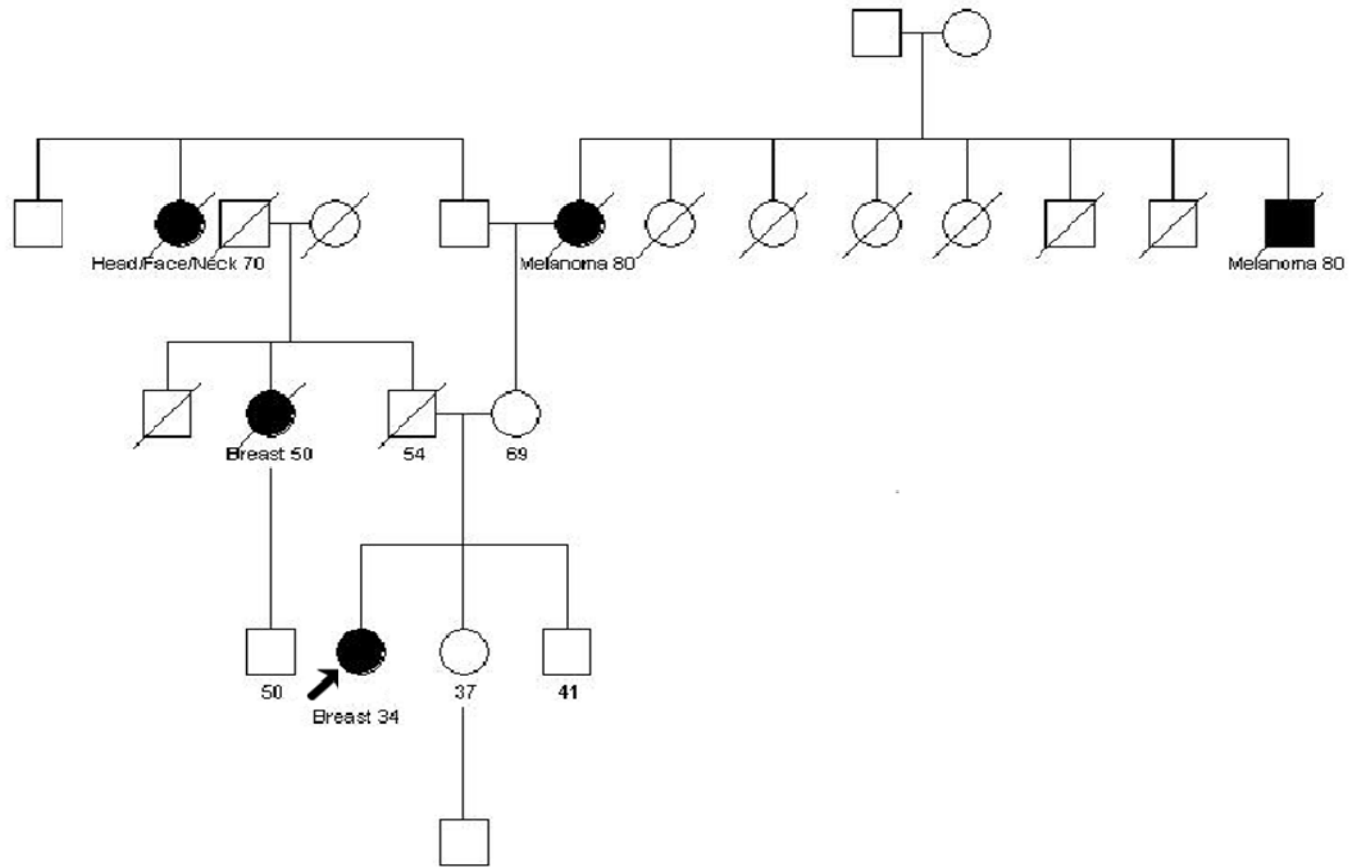
# MJ2013



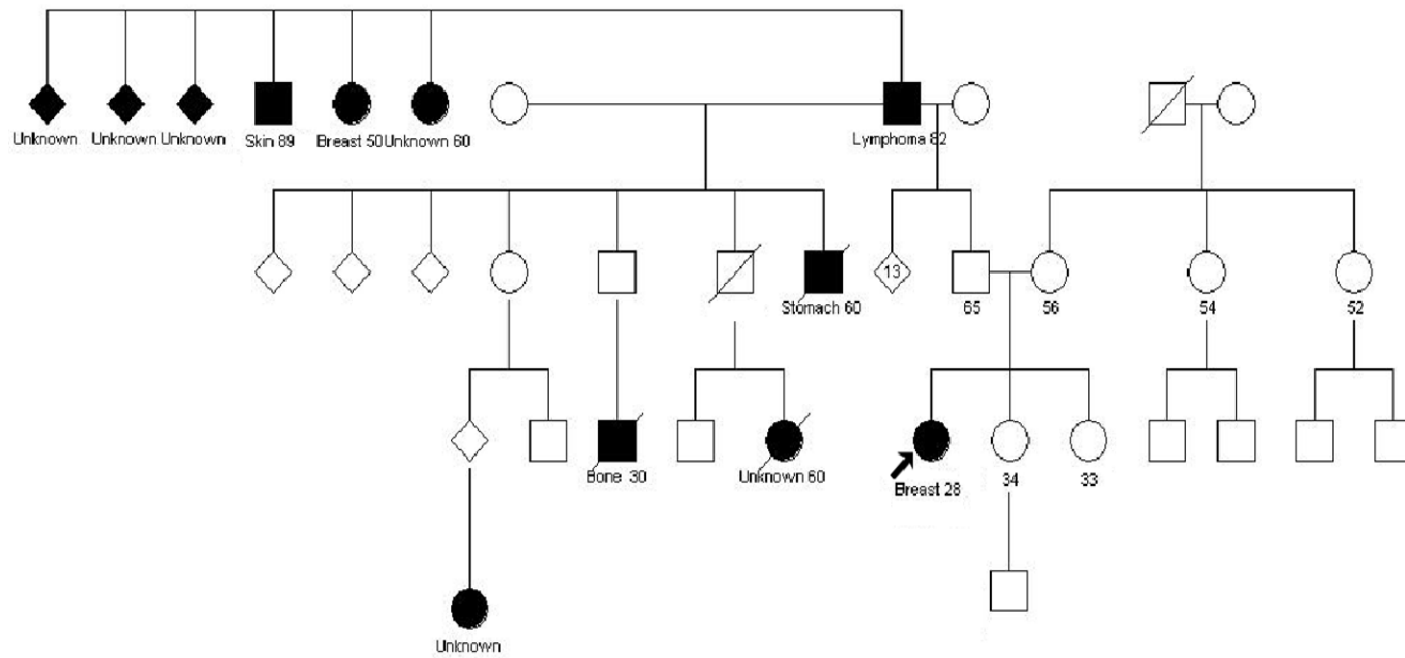
# MJ2014



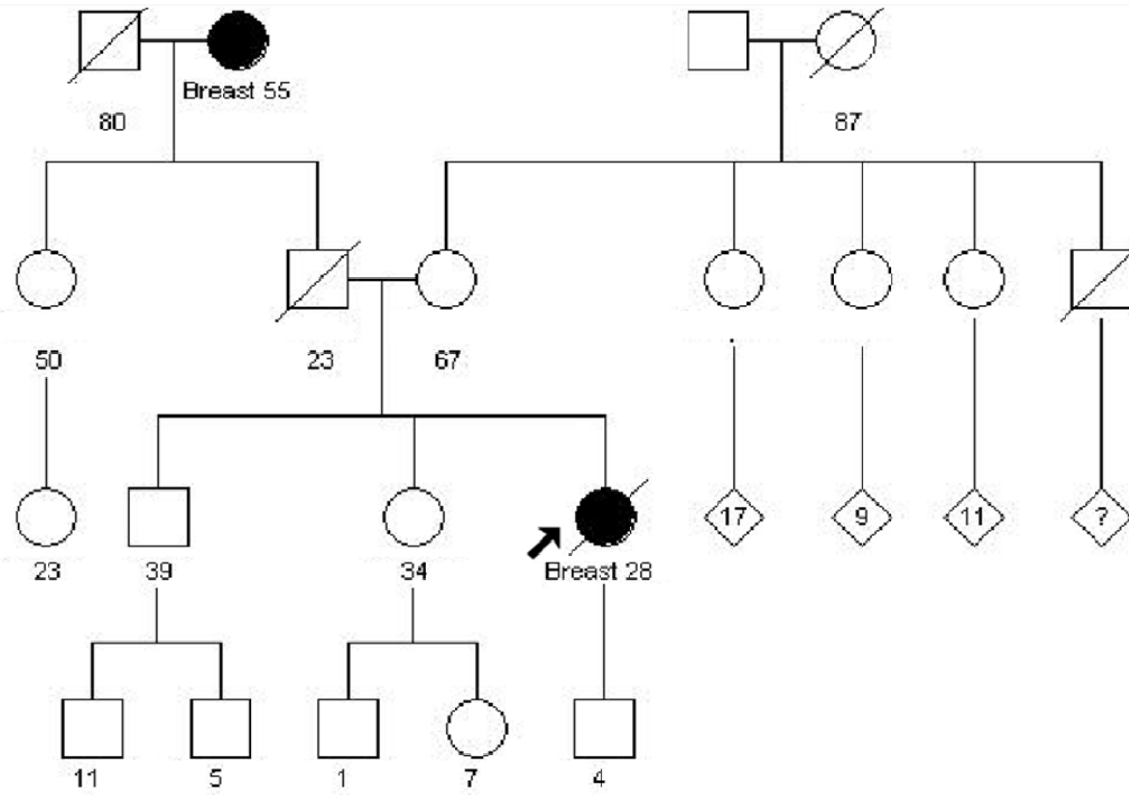
# MJ2015



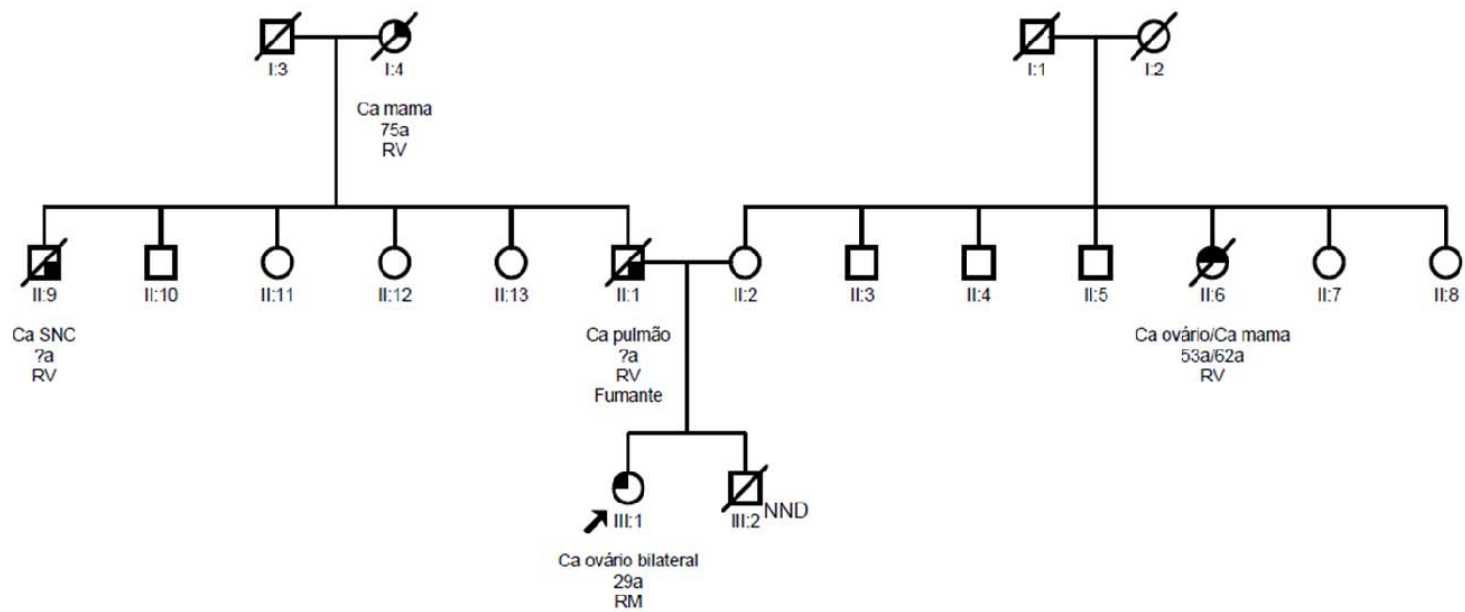
# MJ2016



# MJ2037

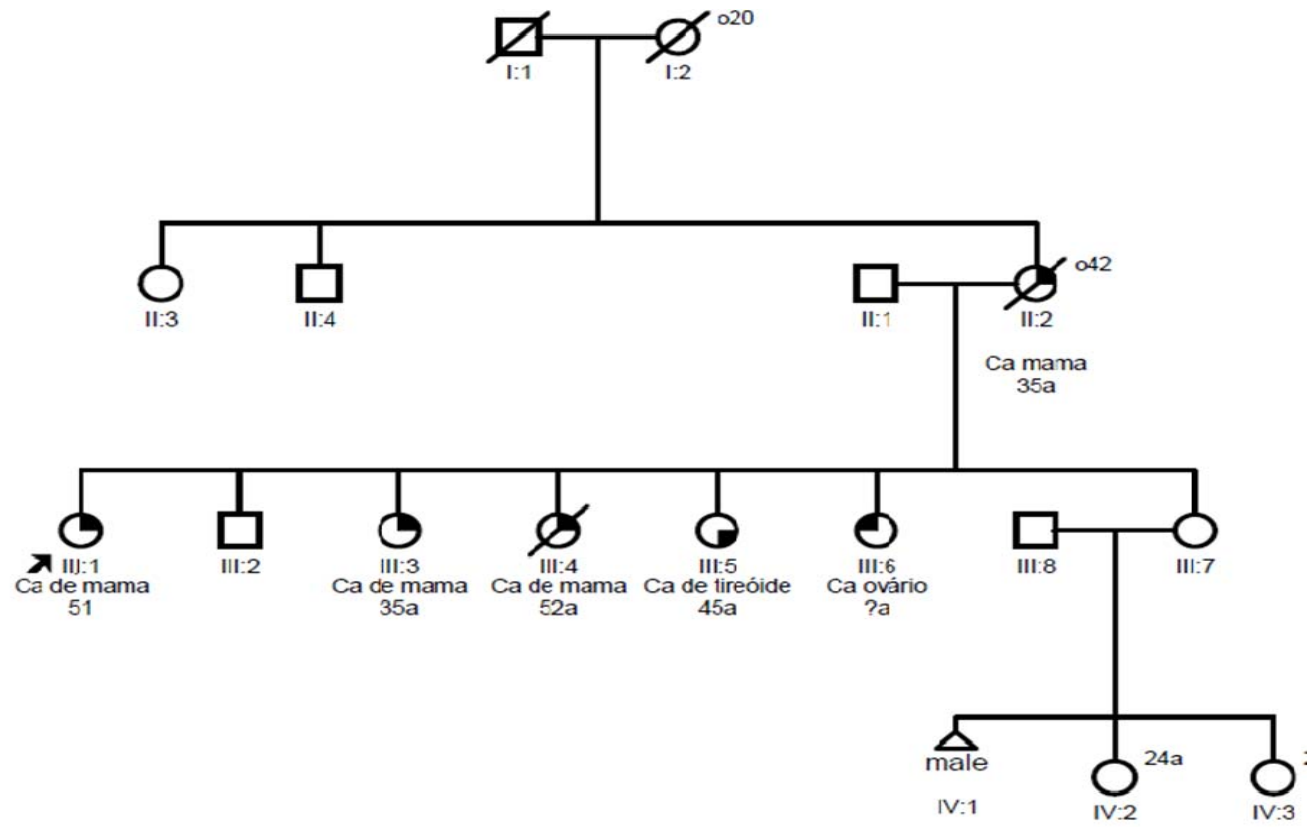


# SM 001.021

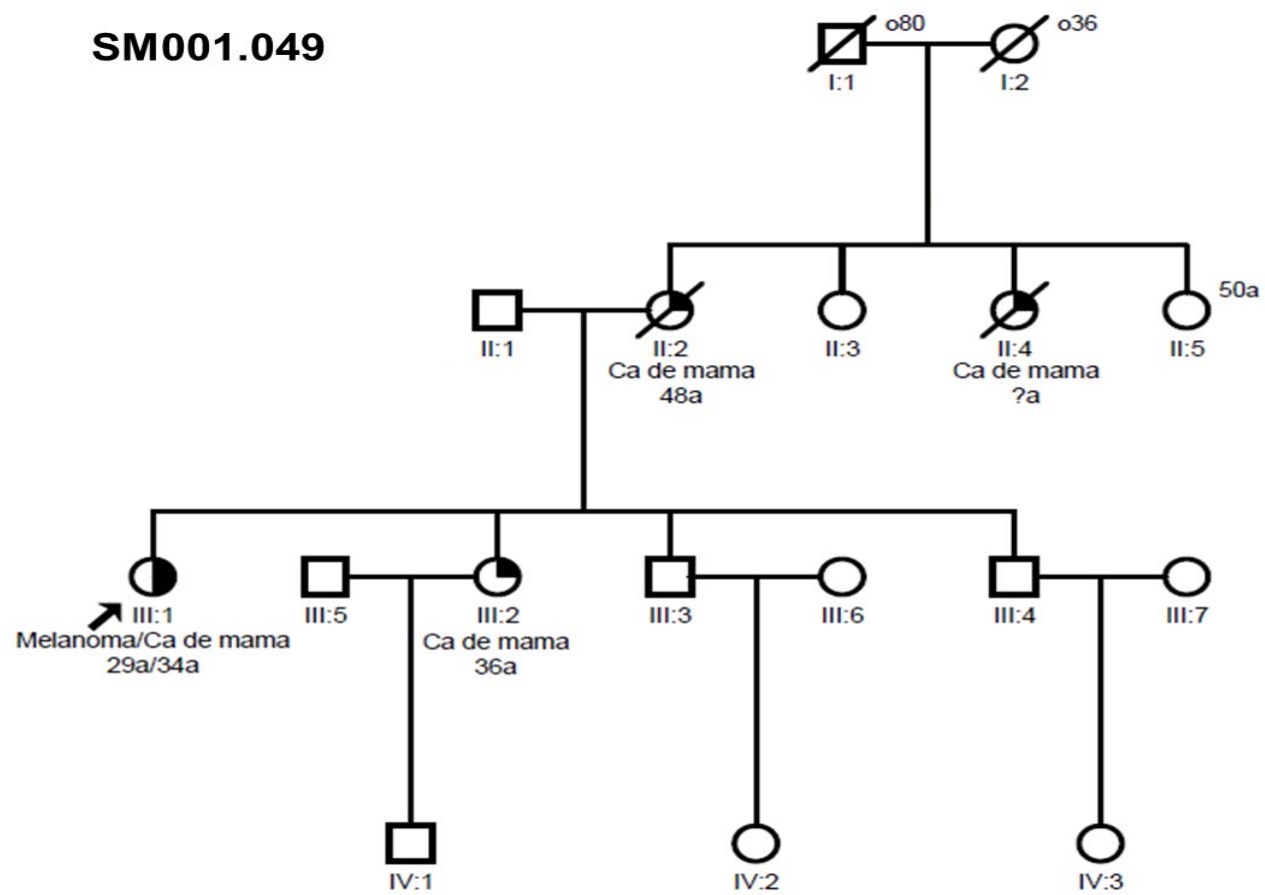




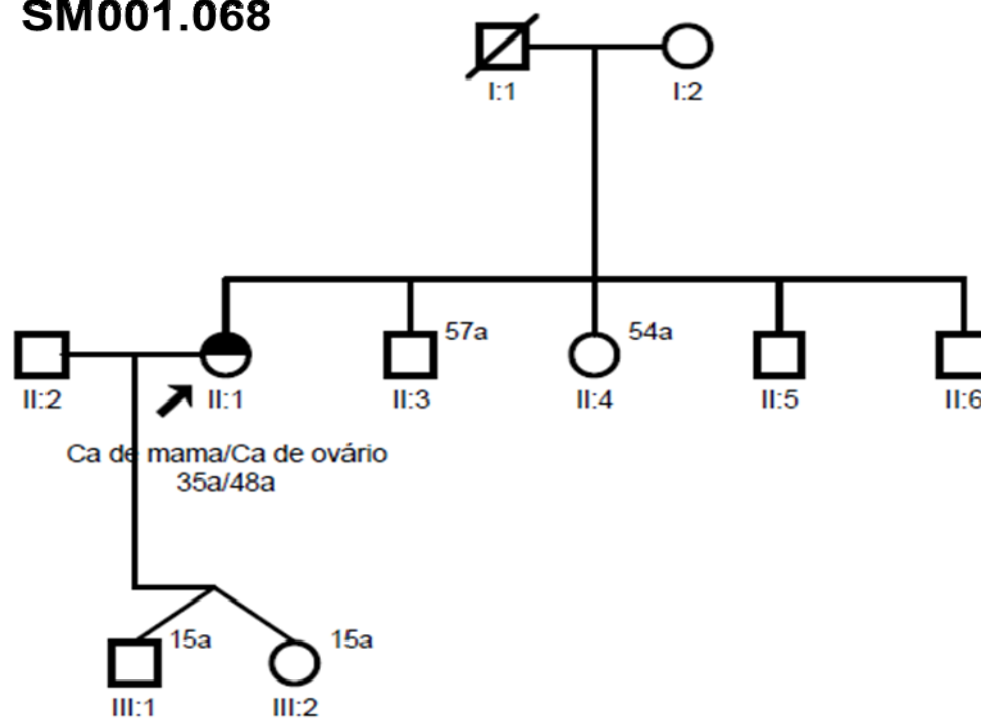
**SM001.040**



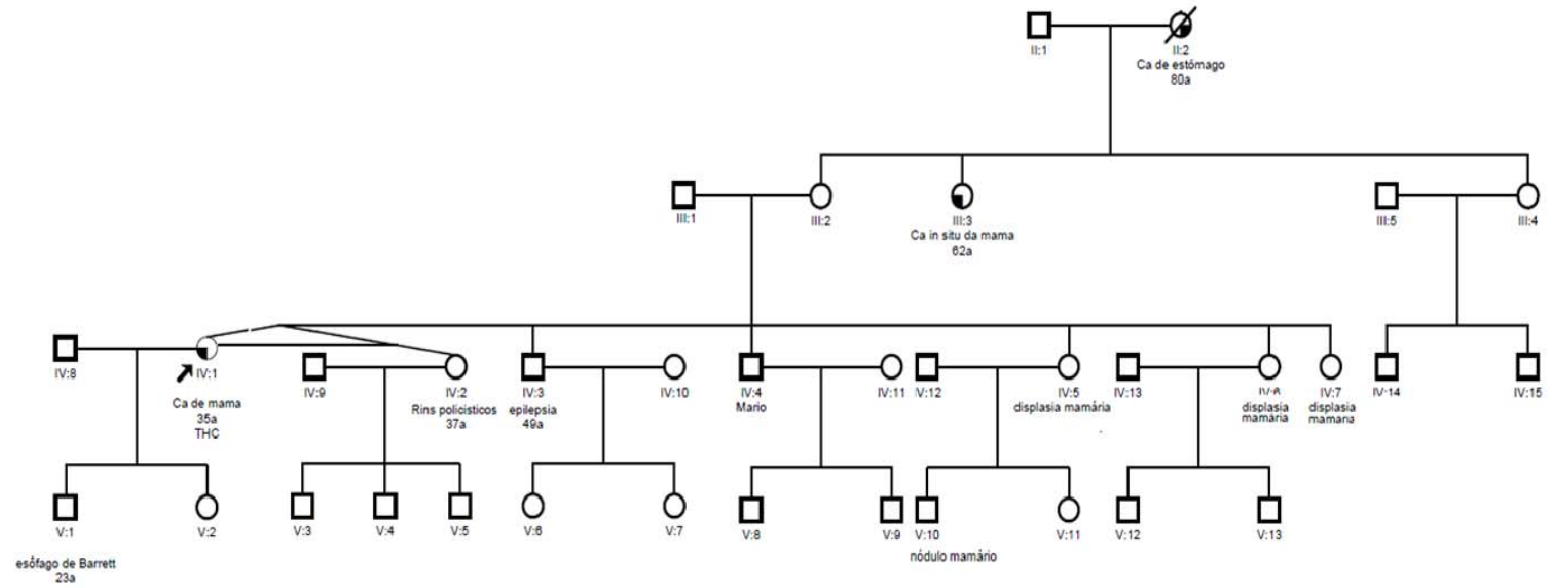
SM001.049



SM001.068



SM001.088



Anexo 4 – Descrição das sondas do kit SALSA MLPA P087-B1 BRCA1

| Length (nt) | SALSA MLPA probe  | Chromosomal position            |                 |
|-------------|---|---------------------------------|-----------------|
|             |   | reference                       | BRCA1           |
| 64-70-76-82 | Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA          |                                 |                 |
| 88-92-96    | D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation |                                 |                 |
| 100         | X-fragment: Specific for the X chromosome   |                                 |                 |
| 105         | Y-fragment: Specific for the Y chromosome   |                                 |                 |
| 130         | Reference probe 02269-L01761  | 1p36                            |                 |
| 136         | Reference probe 02283-L01774  | 13q13 ( <i>BRCA2, exon 1</i> )  |                 |
| 148         | <b>BRCA1 probe</b> 02807-L01268   |                                 | Promoter region |
| 157         | <b>BRCA1 probe</b> 02808-L02168   |                                 | Promoter region |
| 167         | <b>BRCA1 probe</b> 02810-L02239   |                                 | Exon 2          |
| 175         | <b>BRCA1 probe</b> 02811-L02240   |                                 | Exon 3          |
| 185         | <b>BRCA1 probe</b> 03398-L02254   |                                 | Exon 18         |
| 193         | Reference probe 03217-L02642  | 10q25                           |                 |
| 200 *       | <b>BRCA1 probe</b> 11457-L12189   |                                 | Exon 22         |
| 208         | <b>BRCA1 probe</b> 02813-L02242   |                                 | Exon 6          |
| 219         | <b>BRCA1 probe</b> 02814-L02243   |                                 | Exon 7          |
| 226         | <b>BRCA1 probe</b> 02815-L02244   |                                 | Exon 8          |
| 234         | <b>BRCA1 probe</b> 02816-L02245   |                                 | Exon 9          |
| 244         | <b>BRCA1 probe</b> 03411-L02074   |                                 | Exon 13         |
| 256         | Reference probe 02279-L01770  | 13q13 ( <i>BRCA2, exon 11</i> ) |                 |
| 263 *       | <b>BRCA1 probe</b> 11802-L12190   |                                 | Exon 14         |
| 276         | <b>BRCA1 probe</b> 02818-L02247   |                                 | Exon 11         |
| 287         | <b>BRCA1 probe</b> 02819-L02248   |                                 | Exon 12         |
| 295         | <b>BRCA1 probe</b> 03890-L03337   |                                 | Exon 13         |
| 310 *       | Reference probe 09809-L10644  | 13q13 ( <i>BRCA2, exon 5</i> )  |                 |
| 319         | Reference probe 00495-L03128  | 12p12                           |                 |
| 329         | <b>BRCA1 probe</b> 02821-L02250   |                                 | Exon 15         |
| 337         | <b>BRCA1 probe</b> 02822-L02251   |                                 | Exon 16         |
| 346 ¥       | <b>BRCA1 probe</b> 03395-L12877   |                                 | Exon 5          |
| 355         | <b>BRCA1 probe</b> 03822-L03285   |                                 | Exon 10         |
| 364         | <b>BRCA1 probe</b> 02826-L02255   |                                 | Exon 19         |
| 371         | Reference probe 02667-L02134  | 11q22 ( <i>ATM, exon 25</i> )   |                 |
| 380         | Reference probe 00655-L03268  | 4q27                            |                 |
| 390         | <b>BRCA1 probe</b> 02827-L02256   |                                 | Exon 20         |
| 397         | <b>BRCA1 probe</b> 02828-L02257   |                                 | Exon 21         |
| 408 ¥       | <b>BRCA1 probe</b> 03397-L13116   |                                 | Exon 17         |
| 416         | <b>BRCA1 probe</b> 02830-L02259   |                                 | Exon 23         |
| 425 *       | <b>BRCA1 probe</b> 04578-L04795   |                                 | Exon 24         |
| 436 ¥       | <b>BRCA1 probe</b> 02100-L02537   |                                 | Exon 1          |
| 445         | Reference probe 02445-L01409  | 16p13                           |                 |
| 454         | Reference probe 02355-L01415  | 9q34                            |                 |

Anexo 5 – Descrição das sondas do kit SALSA MLPA P045-B3 BRCA2 / CHEK2

| Length (nt) | SALSA MLPA probe  | Chromosomal position |   |                      |
|-------------|---|----------------------|---|----------------------|
|             |   | reference            | CHEK2   | BRCA2                |
| 64-70-76-82 | Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA          |                      |   |                      |
| 88-92-96    | D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation |                      |   |                      |
| 100         | X-fragment: Specific for the X chromosome   |                      |   |                      |
| 105         | Y-fragment: Specific for the Y chromosome   |                      |   |                      |
| 130         | Reference probe 00797-L00463  | 5q31                 |   |                      |
| 137         | <b>BRCA2 probe</b> 02283-L12281   |                      |   | <b>Exon 1</b>        |
| 148         | <b>BRCA2 probe</b> 02285-L01776   |                      |   | <b>Exon 1</b>        |
| 154         | <b>BRCA2 probe</b> 09297-L08066   |                      |   | <b>Exon 14</b>       |
| 160         | <b>FRY probe</b> 02143-L09586   |                      |   | 20 kb before BRCA2   |
| 166         | <b>BRCA2 probe</b> 02486-L01985   |                      |   | <b>Exon 2</b>        |
| 172 ∞       | <b>BRCA2 probe</b> 08898-L09587   |                      |   | <b>Exon 3</b>        |
| 178         | <b>BRCA2 probe</b> 01599-L10642   |                      |   | <b>Exon 3</b>        |
| 184         | Reference probe 01217-L00694  | 4q35                 |   |                      |
| 191         | <b>BRCA2 probe</b> 09812-L10643   |                      |   | <b>Exon 23</b>       |
| 197         | <b>BRCA2 probe</b> 01600-L04671   |                      |   | <b>Exon 4</b>        |
| 202         | <b>BRCA2 probe</b> 08265-L08128   |                      |   | <b>Exon 7</b>        |
| 211         | Reference probe 02333-L01826  | 12q23                |   |                      |
| 220         | <b>BRCA2 probe</b> 01602-L01184   |                      |   | <b>Exon 8</b>        |
| 229         | <b>BRCA2 probe</b> 01603-L01185   |                      |   | <b>Exon 9</b>        |
| 238         | Reference probe 00517-L00097  | 2q13                 |   |                      |
| 247         | <b>BRCA2 probe</b> 01604-L01186   |                      |   | <b>Exon 10</b>       |
| 256 °       | <b>BRCA2 probe</b> 02279-L01770   |                      |   | <b>Exon 11 start</b> |
| 265         | <b>HCS20 probe</b> 06800-L02040   |                      | In CHEK2 promotor region                          |                      |
| 274         | <b>BRCA2 probe</b> 01606-L01188   |                      |   | <b>Exon 11 end</b>   |
| 283         | <b>BRCA2 probe</b> 01607-L01189   |                      |   | <b>Exon 12</b>       |
| 292         | Reference probe 03018-L02458  | 12q13                |   |                      |
| 301         | <b>BRCA2 probe</b> 02280-L01771   |                      |   | <b>Exon 13</b>       |
| 310         | <b>BRCA2 probe</b> 09809-L10257   |                      |   | <b>Exon 5</b>        |
| 319 ±       | <b>BRCA2 probe</b> 09296-L11090   |                      |   | <b>Exon 27</b>       |
| 326         | <b>BRCA2 probe</b> 01610-L01192   |                      |   | <b>Exon 15</b>       |
| 337         | <b>BRCA2 probe</b> 01611-L01193   |                      |   | <b>Exon 16</b>       |
| 346         | <b>BRCA2 probe</b> 04585-L03983   |                      |   | <b>Exon 6</b>        |
| 355         | <b>BRCA2 probe</b> 02281-L01772   |                      |   | <b>Exon 17</b>       |
| 364 ~       | <b>BRCA2 probe</b> 01613-L01195   |                      |   | <b>Exon 18</b>       |
| 373         | Reference probe 02667-L04984  | 11q22                |   |                      |
| 382         | <b>BRCA2 probe</b> 01614-L01196   |                      |   | <b>Exon 19</b>       |
| 391         | <b>BRCA2 probe</b> 08266-L08129   |                      |   | <b>Exon 20</b>       |
| 400 ^‡      | <b>CHEK2 probe</b> 02579-L12282   |                      | <b>CHEK2 Exon 10</b>                              |                      |
| 409         | <b>BRCA2 probe</b> 02069-L01970   |                      |   | <b>Exon 21</b>       |
| 418         | <b>BRCA2 probe</b> 01617-L01199   |                      |   | <b>Exon 22</b>       |
| 427         | Reference probe 06942-L06522  | 11q12                |   |                      |
| 436         | <b>BRCA2 probe</b> 08267-L08130   |                      |   | <b>Exon 24</b>       |
| 445         | <b>BRCA2 probe</b> 08268-L08131   |                      |   | <b>Exon 25</b>       |
| 454         | <b>N4BP2L1 (CG018) probe</b> 02144-L01619   |                      |   | 9 kb after BRCA2     |
| 463         | <b>BRCA2 probe</b> 11984-L15346   |                      |   | <b>Exon 26</b>       |
| 476 ±       | <b>BRCA2 probe</b> 09293-L15678   |                      |   | <b>Exon 27</b>       |
| 486         | Reference probe 05028-L15679  | 2q32                 |   |                      |
| 495 §^      | <b>CHEK2 probe</b> 01772-L15680   |                      | <b>CHEK2 exon 12, Mutation 1100delC specific!</b> |                      |

## Anexo 6 – Lista dos 119 genes associados ao Câncer de Mama Hereditário

### Listas 1 (88 genes da via do BRCA + HBC)

ABRAXAS MUC13  
 ATM MUTYH  
 ATR MYC  
 BACH1 NBA1  
 BARD1 NBN  
 BLM NBS1  
 BRCA1 NF1  
 BRCA2 OCT1  
 BRCC36 ODF1  
 BRCC45 OR5H6  
 BRIP1 P21  
 CASP8 PALB2  
 CCDC98 PLK1  
 CDH1 PMS2  
 CDKN2A PTEN  
 CEP350 RAD50  
 CHEK1 RAD51  
 CHEK2 RAD51C  
 Cip1 RAD51D  
 CtIP RAP80  
 CTNNB1 RB1  
 ECAD RNF8  
 EPCAM SIGLEC12  
 FAM123B SLC22A16  
 FANCA SLC5A4  
 FANCB SLX4  
 FANCC STAT1  
 FANCD1 STK11  
 FANCD2 SWI/SNF  
 FANCE TGFB1  
 FANCF TNRC19  
 FANCG TOPBP1  
 FANCL TOX3  
 FANCL TP53  
 FGFR2 TP53BP1  
 GADD45 UTRN  
 GATA3 Waf1  
 H19 XRCC2  
 H2AX ZNF574  
 HEATR7B2  
 IFN-Gamma  
 LSP1  
 MAP3K1  
 MDC1  
 MERIT40  
 MLH1  
 MRE11A  
 MSH2  
 MSH6

### Lista 2 (31 genes; publicado na Science /2014)

AFF2  
 AKT1  
 AR  
 ATM  
 BARD1  
 BRCA1  
 BRCA2  
 BRIP1  
 CBF3  
 CDH1  
 CDKN1B  
 CHEK2  
 DIRAS3  
 ERBB2  
 GATA3  
 MAP3K1  
 NBN  
 NF1  
 PALB2  
 PIK3CA  
 PTEN  
 PTPN22  
 PTPRD  
 RAD50  
 RAD51  
 RB1  
 RUNX1  
 SF3B1  
 STK11  
 TBX3  
 TP53

## Anexo 7 - Lista dos 479 genes mutados em câncer

|          |        |         |          |          |         |         |         |         |          |
|----------|--------|---------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|----------|
| ABL1     | BRIP1  | CTNNB1  | FANCF    | IGF1R    | MAP3K13 | NFKB1   | PMS1    | SGK1    | TNFRSF14 |
| ABL2     | BRL1   | CYLD    | FANCG    | IGF2     | MAP3K7  | NFKB2   | PMS2    | SH2D1A  | TNK2     |
| ACVR2A   | BTK    | CYP2C19 | FAS      | IGF2R    | MAPK1   | NIN     | POLA1   | SIN3B   | TOP1     |
| ADAMTS20 | BUB1   | CYP2D6  | FBXW7    | IKBKB    | MAPK8   | NKX2-1  | POT1    | SLC16A5 | TP53     |
| AFF1     | BUB1B  | DAXX    | FGFR1    | IKBKE    | MARK1   | NLRP1   | POU5F1  | SMAD2   | TPR      |
| AFF2     | CARD11 | DCC     | FGFR2    | IKZF1    | MARK4   | NOTCH1  | PPARG   | SMAD4   | TPTE2P   |
| AFF3     | CASC5  | DDB2    | FGFR3    | IL2      | MBD1    | NOTCH2  | PPP2R1A | SMARCA4 | TRAF3IP1 |
| AKAP9    | CASP8  | DDIT3   | FGFR4    | IL21R    | MCL1    | NOTCH4  | PRDM1   | SMARCB1 | TRIM23   |
| AKT1     | CBFB   | DDR2    | FH       | IL6ST    | MCM2    | NPM1    | PRKAR1A | SMARCD1 | TRIM24   |
| AKT2     | CBL    | DEK     | FLCN     | IL7R     | MCM8    | NR3C1   | PRKDC   | SMARCE1 | TRIM33   |
| AKT3     | CCND1  | DICER1  | FLI1     | ING4     | MDM2    | NRAS    | PSIP1   | SMO     | TRIP11   |
| ALK      | CCND2  | DIRAS3  | FLT1     | IRF4     | MDM4    | NSD1    | PTCH1   | SMUG1   | TRRAP    |
| APC      | CCNE1  | DNMT3A  | FLT3     | IRS2     | MELK    | NTRK1   | PTEN    | SOCS1   | TSC1     |
| AR       | CD4    | DPYD    | FLT4     | ITGA10   | MEN1    | NTRK3   | PTGS2   | SOX11   | TSC2     |
| ARID1A   | CD79A  | DST     | FMR1     | ITGA9    | MET     | NUMA1   | PTPN11  | SOX2    | TSHR     |
| ARID1B   | CD79B  | DYM     | FN1      | ITGB2    | MITF    | NUP214  | PTPN22  | SPRED1  | UBE2E3   |
| ARID2    | CDC45  | DX60    | FOXL2    | ITGB3    | MLH1    | NUP98   | PTPRD   | SRC     | UBE2J1   |
| ARNT     | CDC73  | E2F7    | FOXO1    | JAK1     | MLL     | OVGP1   | PTPRT   | SRCIN1  | UBE2T    |
| ASPM     | CDCA3  | E2F7    | FOXO3    | JAK2     | MLL2    | PAK3    | RABEP1  | SSX1    | UBR5     |
| ASXL1    | CDCA8  | EGFR    | FOXP1    | JAK3     | MLL3    | PALB2   | RAD50   | STAT1   | UGT1A1   |
| ATF1     | CDH1   | EML4    | FOXP4    | JUN      | MLLT10  | PARP1   | RAD51C  | STK11   | USP35    |
| ATM      | CDH11  | EP300   | FRY      | KAT6A    | MMP2    | PARP9   | RAD54B  | STK36   | USP9X    |
| ATR      | CDH2   | EP400   | FZR1     | KAT6B    | MN1     | PAX3    | RAF1    | SUFU    | VHL      |
| ATRX     | CDH20  | EPHA3   | G6PD     | KDM5C    | MPL     | PAX5    | RALGDS  | SYK     | WAS      |
| AURKA    | CDH5   | EPHA7   | GATA1    | KDM6A    | MRE11A  | PAX7    | RARA    | SYNE1   | WDR20    |
| AURKB    | CDK12  | EPHB1   | GATA2    | KDR      | MSH2    | PAX8    | RB1     | TAF1    | WDR31    |
| AURKC    | CDK4   | EPHB4   | GATA3    | KEAP1    | MSH6    | PBRM1   | RECQL4  | TAF1L   | WDR33    |
| AXL      | CDK6   | EPHB6   | GDNF     | KIAA0146 | MTOR    | PBX1    | REL     | TAL1    | WDR48    |
| BAI3     | CDK8   | ERBB2   | GNA11    | KIF9     | MTR     | PDE4DIP | RET     | TBX22   | WDR70    |
| BAP1     | CDKN1B | ERBB3   | GNAQ     | KIT      | MTRR    | PDGFB   | RHOH    | TBX3    | WHSC1    |
| BCL10    | CDKN2A | ERBB4   | GNAS     | KLF6     | MUC1    | PDGFRA  | RNASEL  | TC1     | WRN      |
| BCL11A   | CDKN2B | ERCC1   | GPR124   | KRAS     | MUTYH   | PDGFRB  | RNF2    | TCAP    | WT1      |
| BCL11B   | CDKN2C | ERCC2   | GRM8     | LAMP1    | MYB     | PER1    | RNF213  | TCF12   | XPA      |
| BCL2     | CEBPA  | ERCC3   | GUCY1A2  | LCK      | MYC     | PGAP3   | ROS1    | TCF3    | XPC      |
| BCL2L1   | CENPN  | ERCC4   | HCAR1    | LIFR     | MYCL1   | PHOX2B  | RPS6KA2 | TCF7L1  | XPO1     |
| BCL2L2   | CHEK1  | ERCC5   | HIF1A    | LPHN3    | MYCN    | PIK3C2B | RRM1    | TCF7L2  | XRCC2    |
| BCL3     | CHEK2  | ERG     | HLF      | LPP      | MYD88   | PIK3CA  | RRM2    | TCL1A   | YPEL2    |
| BCL6     | CIC    | ESR1    | HMGB3P1  | LRP1B    | MYH11   | PIK3CB  | RUNX1   | TET1    | ZNF217   |
| BCL9     | CKS1B  | ETS1    | HNF1A    | LTF      | MYH9    | PIK3CD  | RUNX1T1 | TET2    | ZNF384   |
| BCR      | CMPK1  | ETV1    | HOOK3    | LTK      | NBAL2   | PIK3CG  | SAMD9   | TFE3    | ZNF396   |
| BIRC2    | COL1A1 | ETV4    | HRAS     | MAF      | NBN     | PIK3R1  | SBDS    | TGFBR2  | ZNF521   |
| BIRC3    | CRBN   | EXO1    | HSP90AA1 | MAFB     | NCOA1   | PIK3R2  | SDHA    | TGM7    |          |
| BIRC5    | CREB1  | EXT1    | HSP90AB1 | MAGEA1   | NCOA2   | PIM1    | SDHB    | THBS1   |          |
| BLM      | CREBBP | EXT2    | HTR7     | MAGI1    | NCOA4   | PKHD1   | SDHC    | TIMP3   |          |
| BLNK     | CRKL   | EZH2    | ICK      | MALT1    | NCOR1   | PLAG1   | SDHD    | TLR4    |          |
| BMPR1A   | CRTC1  | FAM123B | IDH1     | MAML2    | NEIL3   | PLCG1   | SEPT9   | TLX1    |          |
| BRAF     | CSF1R  | FANCA   | IDH2     | MAP2K1   | NF1     | PLEKHG5 | SETD2   | TMEM135 |          |
| BRD3     | CSMD3  | FANCC   | IDI1     | MAP2K2   | NF2     | PLK1    | SETMAR  | TMPO    |          |
| BRF1     | CTNNA1 | FANCD2  | IFT140   | MAP2K4   | NFE2L2  | PML     | SF3B1   | TNFAIP3 |          |









**Hereditary breast and ovarian cancer: Assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients**

Felipe C Silva<sup>1,†</sup>

Email: felipe.silva@accamargo.org.br

Bianca CG Lisboa<sup>1,†</sup>

Email: lisboa.bianca@gmail.com

Marcia CP Figueiredo<sup>1,†</sup>

Email: marcia.figueiredo@accamargo.org.br

Giovana T Torrezan<sup>1</sup>

Email: giovana.torrezan@accamargo.org.br

Érika MM Santos<sup>2</sup>

Email: erikammsantos@gmail.com

Ana C Krepischi<sup>1,3</sup>

Email: ana.krepischi@gmail.com

Benedito M Rossi<sup>2</sup>

Email: rossibm@gmail.com

Maria I Achatz<sup>3,4</sup>

Email: miachatz@cipe.accamargo.org.br

Dirce M Carraro<sup>1,3,\*</sup>

Email: dirce.carraro@cipe.accamargo.org.br

<sup>1</sup> Laboratory of Genomics and Molecular Biology, CIPE - A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Department of Colorectal Tumors, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

<sup>3</sup> National Institute of Science and Technology in Oncogenomics (INCITO), São Paulo, Brazil

<sup>4</sup> Department of Oncogenetics, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

\* Corresponding author. National Institute of Science and Technology in Oncogenomics (INCITO), São Paulo, Brazil

† Equal contribution.

# Abstract

## Background

Germ line mutations in *BRCA1* and *BRCA2* (*BRCA1/2*) and other susceptibility genes have been identified as genetic causes of hereditary breast and ovarian cancer (HBOC). To identify the disease-causing mutations in a cohort of 120 Brazilian women fulfilling criteria for HBOC, we carried out a comprehensive screening of *BRCA1/2*, *TP53* R337H, *CHEK2* 1100delC, followed by an analysis of copy number variations in 14 additional breast cancer susceptibility genes (*PTEN*, *ATM*, *NBN*, *RAD50*, *RAD51*, *BRIP1*, *PALB2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *TP53*, *CDKN2A*, *CDH1* and *CTNNB1*).

## Methods

Capillary sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) were used for detecting point mutations and copy number variations (CNVs), respectively, for the *BRCA1* and *BRCA2* genes; capillary sequencing was used for point mutation for both variants *TP53* R337H and *CHEK2* 1100delC, and finally array comparative genomic hybridization (array-CGH) was used for identifying CNVs in the 14 additional genes.

## Results

The positive detection rate in our series was 26%. *BRCA1* pathogenic mutations were found in 20 cases, including two cases with CNVs, whereas *BRCA2* mutations were found in 7 cases. We also found three patients with the *TP53* R337H mutation and one patient with the *CHEK2* 1100delC mutation. Seven (25%) pathogenic mutations in *BRCA1/2* were firstly described, including a splice-site *BRCA1* mutation for which pathogenicity was confirmed by the presence of an aberrant transcript showing the loss of the last 62 bp of exon 7. Microdeletions of exon 4 in *ATM* and exon 2 in *PTEN* were identified in *BRCA2*-mutated and *BRCA1/2*-negative patients, respectively.

## Conclusions

In summary, our results showed a high frequency of *BRCA1/2* mutations and a higher prevalence of *BRCA1* (64.5%) gene. Moreover, the detection of the *TP53* R337H variant in our series and the fact that this variant has a founder effect in our population prompted us to suggest that all female breast cancer patients with clinical criteria for HBOC and negative for *BRCA1/2* genes should be tested for the *TP53* R337H variant. Furthermore, the presence of genomic structural rearrangement resulting in CNVs in other genes that predispose breast cancer in conjunction with *BRCA2* point mutations demonstrated a highly complex genetic etiology in Brazilian breast cancer families.

## Keywords

Breast cancer, Mutation, *BRCA1*, *BRCA2*, HBOC, *CHEK2* 1100delC, *TP53* R337H

## Background

Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) accounts for 5-10% of all breast cancer (BC) cases and is inherited in an autosomal dominant fashion. Nearly 30% of HBOC patients harbor germ line point mutations or genomic structural rearrangements that result in copy number variations (CNVs) in *BRCA1/2* genes, with a lifetime risk of 45-70% for BC and 20-40% for ovarian cancer [1]. Mutations in these genes also confer a slightly increased risk of other types of cancer, such as pancreatic, primary peritoneal, prostate, male breast and fallopian tube cancer [2].

Germ line *BRCA1* (MIM# 113705) and *BRCA2* (MIM# 600185) mutations are also frequently found in isolated cases of bilateral and/or early-onset BC [3]. The frequency of these mutations is variable because a higher frequency of *BRCA1* mutations has been described in the United States [4], whereas a clear prevalence of *BRCA2* mutations has been reported in Icelandic BC families [5]. Conversely, similar mutation frequency in both genes has been described in French Canadian and British families [6,7].

Inherited mutations in other genes also influence the risk of BC. The *CHEK2* 1100delC has been associated with higher BC risks [8], conferring a two-fold increase in BC risk for women and a ten-fold increase for men [8-10]. Recent studies in cancer-prone families in southeast Brazil have identified a founder germ line *TP53* mutation (p.R337H) at a higher prevalence (1:3,000) than the others germ line *TP53* mutations [11]. A variety of cancer types have been found in *TP53* p.R337H-carrying families, such as soft tissue sarcomas, brain tumors, adrenocortical carcinomas and breast cancers [11].

Screening for mutations in the tumor suppressor genes *BRCA1* and *BRCA2* is of great significance for breast and ovarian cancer prevention and early detection. When a mutation is identified, the cancer risk can be reduced via prophylactic mastectomy; patients can also seek effective screening strategies to detect breast cancer earlier [12]. Moreover, whether a mutation is detected, the genetic testing can be extended to relatives who can enter specific screening programs for carriers or follow the strategy for the general population (non-carriers). More recently, emerging therapies, such as PARP inhibitors in combination with conventional treatment, have been shown to be more effective for *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers [13].

The complex genetic basis of hereditary breast cancer prompted us to perform a comprehensive genetic investigation of 120 Brazilian patients fulfilling clinical criteria for HBOC. We screened the *BRCA1/2* genes for point mutations and CNVs. We also evaluated the presence of the *CHEK2* 1100delC and *TP53* R337H variants via sequencing and used array comparative genomic hybridization (array-CGH) to investigate CNVs in 14 additional breast cancer-predisposing genes: *PTEN*, *ATM*, *NBN*, *RAD50*, *RAD51*, *BRIP1*, *PALB2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *TP53*, *CDKN2A*, *CDH1* and *CTNNB1*.

# Methods

## Patients

One hundred twenty unrelated breast cancer patients fulfilling criteria for hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) were recruited from 2007 to 2010 for this study. The inclusion criteria were: 1) Breast cancer diagnosed  $\leq 45$  years of age (no family history); 2) Breast cancer diagnosed  $\leq 45$  years of age with 1 or more close blood relative with breast / ovarian / fallopian tube / primary peritoneal cancer at any age; 3) Breast cancer diagnosed  $<45 \leq 50$  years of age with 1 or more blood relative with breast/ovarian/fallopian tube/primary peritoneal cancer  $\leq 50$  years of age; 4) Breast cancer diagnosed  $>50$  of age with 1 or more blood relative with breast/ovarian/fallopian tube/primary peritoneal cancer at any age; 5) Two primary BC when the first occurrence was prior to age 50; 6) Breast cancer with a history of ovarian/ fallopian tube/primary peritoneal cancer at any age; 7) For an individual with an ethnicity that is associated with a higher mutation frequency (e.g., Ashkenazi Jewish); 8) Personal history of ovarian/fallopian tube/primary peritoneal cancer; 9) Personal history of male breast cancer.. All enrolled individuals received genetic counseling and signed an informed consent. This study was performed in compliance with the Helsinki Declaration and was approved by the ethics committee of the A.C.Camargo Cancer Center (approval number: 870/06-B). The complete clinical and molecular information of the patients is given in the supplementary material (Additional file 1).

## Point mutation screening

DNA from peripheral blood was purified using the Puregene Genomic DNA Isolation kit (Quiagen, Hilden, Germany) according to manufacturer's instructions. The entire coding sequence and exon-intron boundaries of the *BRCA1* (U14680 or NM\_007294.3) and *BRCA2* (U43746 or NM\_000059.1) genes were evaluated. The *CHEK2* gene (NM\_007194.3) and the *TP53* gene (NM\_000546.5) were screened solely for the c.1100delC and p.R337H mutations, respectively. All PCR products were sequenced in both forward and reverse directions on an ABI Prism 3130xl genetic analyzer (Life Technologies, Foster City, USA). Mutations were recorded and referenced with respect to the cDNA sequence using the nomenclature proposed by the BIC database [14]. PCR conditions and primer sequences are available upon request.

## Investigation of BRCA1/2 CNVs by MLPA

Patients negative for *BRCA1/2* mutations were investigated for CNVs in these genes. Exonic deletions and duplications affecting *BRCA1* and *BRCA2* genes were investigated on genomic DNA using the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) commercial kits P087-B1 and P045-B3 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) according to the manufacturer's recommendations.

## Classification of variants

The BIC database was searched for all *BRCA1* and *BRCA2* alterations [14]. Unreported mutations that generated a premature stop codon (nonsense and frameshift) were classified as pathogenic. Missense alterations classified as class 3 in the IARC\_LOVD database [15] or unknown in the BIC database were considered to be variants of uncertain significance (VUSs). Variants classified as class 1 and 2 using the IARC\_LOVD were considered to be wild type. In cases of inconsistency between the databases, the classification from IARC-LOVD prevailed. Additionally, the VUSs were characterized using three *in silico* protein prediction algorithms: SIFT [16], POLYPHEN-2 [17] and Align-GVGD [18].

## Transcript analysis

For transcriptional analysis of the novel splice site variant, frozen tumor tissues were obtained from the carrier and from a sporadic breast tumor that was negative for mutations in the *BRCA1* gene, which was used as a control sample. RNA samples were purified using the Precellys 24® equipment (Carlsbad, California, USA), followed by total RNA extraction using an RNeasy Mini kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). The first strand cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using a random hexamer primer with the Superscript first strand system for RT-PCR (Life Technologies, Foster City, USA). RT-PCR fragments of the index patient and the control sample were both obtained according to standard PCR protocols using primers adjacent to the exon involved in the splice site mutation. All RT-PCR products were inserted into the T/A plasmid vector pTZ57R/T using the InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, USA), and the ligated plasmid was used for transformation in DH10B *E. coli* cells via electroporation (2.5 KV, 25 µ FD, 200 OHMS), followed by single-colony sequencing on the ABI 3130xl sequencer using M13 primers.

## Screening of copy number alterations via array comparative genomic hybridization (array-CGH)

Genomic CNVs affecting 14 cancer susceptibility genes (*PTEN*, *TP53*, *ATM*, *NBN*, *RAD50*, *BRIP1*, *PALB2*, *RAD51*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *CDKN2A*, *CDH1* and *CTNNB1*) were investigated in oligo-based array-CGH data obtained from a previous study [19]. All hybridizations were gender-matched and processed in reverse labeling duplicates; experiments were carried out using the 180 K whole genome platform (design 22060, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The Agilent Genomic Workbench software was used for the detection of CNVs (deletion and duplications) with the aberration detection method 2 (ADM-2) and a threshold of 6.7. The duplication or deletion of genomic segments were declared when one probe exhibited a  $\log_2$  ratio of Cy3/Cy5  $> 0.70$  or  $< -0.70$ , respectively. A careful visual inspection was performed to filter out poor quality hybridizations and noisy data. Additionally, alterations located more than 3 kb upstream or downstream of the coding exons were excluded. The Database of Genomic Variants (DGV-HG19, <http://projects.tcag.ca/variation/>) was used to exclude common variants detected in the general population. Only alterations detected in both experiments of the same patient were considered.



## Gene dosage qPCR

To validate the genomic DNA CNVs, we used the quantitative duplex PCR method previously described [20]. *GAPDH* was used as a reference gene. For array-CGH probes located in introns, PCR primers were designed to encompass the closest exon.

## Results

### Screening of *BRCA1/2*: point mutations and copy number variations; *CHEK2* 1100delC and *TP53* R337H

The mean age of diagnosis of the first primary tumor in all 120 patients was 43 years-old (yo), with a range from 22 to 88. Thirty-one out of 120 patients (26%) were found to harbor pathogenic mutations, including 20 for *BRCA1* (64.5%), seven for *BRCA2* (22.5%), three for *TP53* R337H (10%) and one for *CHEK2* 1100delC (3%). In the *BRCA1* gene, 20 patients presented 18 different mutations, of which 16 were point mutations (89%) (Six nonsense, six frameshift, two splice site and two missense) and two were CNVs, one deletion encompassing exons 16 and 17 and a rare case of exon 24 amplification detected within *BRCA1* (11%) (Table 1 and Additional file 2). The Ashkenazi Jewish mutation c.5382insC was the most recurrent and was found in three cases. The seven *BRCA2* carriers presented six distinct mutations, of which three were nonsense and three were frameshift. The nonsense variant c.9709A > T was found in two cases. No CNVs were detected in *BRCA2*. Moreover, seven out of 28 (25%) *BRCA1/2*-carriers were found to harbor novel pathogenic mutations, five in *BRCA1* and two in *BRCA2*.

**Table 1 Clinical and molecular description of the *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* 1100delC and *TP53* R337H mutation carriers**

| Proband | Age Onset | of Tumor          | Clinical criteria | Gene         | Alteration             | Mutation type | Exon | Reference     |
|---------|-----------|-------------------|-------------------|--------------|------------------------|---------------|------|---------------|
| SM-01   | 39        | Breast            | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.5203delTT            | Frameshift    | 18   | BIC           |
| SM-17   | 49/51     | Ovarian/Breast    | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.3376 T > G; p.L1086X | Nonsense      | 11   | BIC           |
| SM-25   | 69        | Breast            | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.120A > G; p.M1V      | Missense      | 2    | BIC           |
| SM-69   | 33        | Breast            | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.5242C > A; p.A1708E  | Missense      | 18   | BIC           |
| SM-74   | 50        | Hemangioblastoma  | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.2080delA             | Frameshift    | 11   | BIC           |
| MO-07   | 34        | Breast            | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.5382insC             | Frameshift    | 20   | BIC           |
| MO-09   | 42        | Breast            | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.5382insC             | Frameshift    | 20   | BIC           |
| MO-45   | 48        | Breast            | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.5382insC             | Frameshift    | 20   | BIC           |
| MO-13   | 32/44     | Breast/Skin       | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.4831del5             | Frameshift    | 16   | BIC           |
| MO-26   | 37        | Breast            | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.1499insA             | Frameshift    | 11   | BIC           |
| MO-31   | 38/63     | Breast/Peritoneal | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.5563G > A; p.W1815X  | Nonsense      | 23   | BIC           |
| MO-37   | (-)       | Breast            | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.3759G > T; p.E1214X  | Nonsense      | 11   | BIC           |
| MO-38   | 42/44     | Breast/Breast     | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.307 T > A; p.L63X    | Nonsense      | 5    | BIC           |
| SM-50   | 36/47     | Breast/Breast     | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.4794 + 1G > A        | Splice site   | 15   | BIC           |
| SM-80   | 42/48     | Breast/Ovarian    | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.1446 A > T; p.K443X  | Nonsense      | 11   | Current study |
| SM-81   | 55        | Fallopian Tube    | HBOC              | <i>BRCA1</i> | c.5582insT             | Frameshift    | 23   | Current study |

|        |       |                |      |              |                                 |             |       |                     |
|--------|-------|----------------|------|--------------|---------------------------------|-------------|-------|---------------------|
| SM-89  | 40    | Breast         | HBOC | <i>BRCA1</i> | c.4406 C > A; p.Y1429X          | Nonsense    | 13    | Current study       |
| MO-15  | 43/56 | Breast/Ovarian | HBOC | <i>BRCA1</i> | c.560 + 2 T > A                 | Splice site | 7     | Carraro et al. 2013 |
| MO-28  | 48    | Breast         | HBOC | <i>BRCA1</i> | Exon 24 amplification           | LGR         | 24    | Current study       |
| SM-03  | 36/36 | Breast/Ovarian | HBOC | <i>BRCA1</i> | Exon 16–17 deletion             | LGR         | 16-17 | BIC                 |
| SM-08  | 33    | Breast         | HBOC | <i>BRCA2</i> | c.6174delT                      | Frameshift  | 11    | BIC                 |
| SM-46  | 32    | Breast         | HBOC | <i>BRCA2</i> | c.9709 A > T; p.K3161X          | Nonsense    | 25    | BIC                 |
| SM-61  | 51    | Breast         | HBOC | <i>BRCA2</i> | c.9709A > T; p.K3161X           | Nonsense    | 25    | BIC                 |
| SM-104 | 32    | Breast         | HBOC | <i>BRCA2</i> | c.3034del4                      | Frameshift  | 11    | BIC                 |
| MO-02  | 53/63 | Breast/Breast  | HBOC | <i>BRCA2</i> | c.9610C > T, p.R3128X           | Nonsense    | 25    | BIC                 |
| SM-53  | 30/49 | Breast/Thyroid | HBOC | <i>BRCA2</i> | c.6242del4                      | Frameshift  | 11    | Current study       |
| SM-84  | 35    | Breast         | HBOC | <i>BRCA2</i> | c.8423 T > G; p.L2732X          | Nonsense    | 18    | Current study       |
| MO-41  | 47    | Breast         | HBOC | <i>CHEK2</i> | c.1100delC;<br>p.Thr367MetfsX15 | Frameshift  | 10    | BIC                 |
| SM-31  | 49    | Breast         | HBOC | <i>TP53</i>  | c.1010G > A; p.R337H            | Missense    | 10    | IARC TP53           |
| SM-31  | 49    | Breast         | HBOC | <i>TP53</i>  | c.1010G > A; p.R337H            | Missense    | 10    | IARC TP53           |
| SM-82  | 29    | Breast         | HBOC | <i>TP53</i>  | c.1010G > A; p.R337H            | Missense    | 10    | IARC TP53           |

(-) Not available; LGR: Large Genomic Rearrangement; BIC: Breast cancer information core database; IARC TP53: IARC TP53 database

Interestingly, patient MO-15 was found to harbor a germ line splice site mutation (c.560 + 2 T > A) in intron 7 of the *BRCA1* gene (Figure 1a). RT-PCR products encompassing part of exon 6 to exon 8 revealed the presence of a 186-bp fragment in addition to the expected fragment of 258 bp (Figure 1b). Sequencing of the 186-bp fragment disclosed a frameshift deletion of the last 62 bp of exon 7 due to the activation of a novel cryptic splice site within exon 7 (Figure 1c). Figure 1d shows the schematic representation of the premature stop codon created in the mRNA after the deletion of 62 bp of exon 7 (r.[=, 499\_560del); p.Ser127Thrfs\*11) caused by the germ line splice site mutation c.560 + 2 T > A. The predicted protein from the aberrant mRNA apparently created an isoform of 137aa (Figure 1e).

**Figure 1 Characterization of a novel *BRCA1* splice site variant (c.560 + 2 T > A) in one HBOC patient.** **a.** Sequencing pattern of *BRCA1* exon 7 from blood cell genomic DNA showing the c.560 + 2 T > A mutation **b.** Agarose gel showing RT-PCR products obtained from the cDNA of a tumor from patient MO-15 and one control sample (sporadic tumor negative for the c.560 + 2 T > A) using a forward primer in exon 6 and a reverse primer in exon 8 of *BRCA1*. An additional 186-bp cDNA fragment caused by the partial deletion of exon 7 was observed in the tumor sample of patient MO-15. **c.** Above, partial sequence of the expected fragment (258 bp) in the control tumor sample showing the exon 7–8 junction; depicted below is the partial sequence of the patient tumor cDNA showing the creation of a novel cryptic splice donor site causing the deletion of the last 62 bp of *BRCA1* exon 7 in the aberrant transcript. **d.** Schematic representation of the premature stop codon (p.Ser127Thrfs\*11) created in the *BRCA1* mRNA after the frameshift deletion of the last 62 bp of exon 7 caused by the germ line splice site variant c.560 + 2 T > A. **e.** Amino acid sequence of the expected truncated protein (137 aa) showing the alteration of 10 amino acids (in red) and creation of a premature stop codon (\*).

Nineteen out of 120 HBOC patients (16%) harbored VUSs according to our criteria (based on BIC and/or IARC-LOVD databases - see the Methods section). Among the VUS carriers, 17 variants were distinct, and two of them were described for the first time (Table 2). The VUS evaluation using the three protein prediction algorithms (PolyPhen, SIFT and GVG-D-Align) showed that six were classified as likely pathogenic by at least one algorithm (three in one algorithm, two in two algorithms and one in all three algorithms). The schematic representation of all VUSs in the *BRCA1* and *BRCA2* genes and their functional domains on the protein are shown in Figure 2.

**Table 2 Variants of uncertain significance (VUSs)**

| Variant  | No. of families carrying VUS | Co-occurrence with pathogenic mutation | Gene         | BIC     | In silico analysis |           |             | IARC-LOVD database |
|----------|------------------------------|--|--------------|---------|--------------------|-----------|-------------|--------------------|
|          |                              |  |              |         | Polyphen-2         | SIFT      | Align GVG-D |                    |
| p.I1237M | 1                            | No                                     | <i>BRCA1</i> | Unknown | Benign             | Tolerated | C0          | -                  |
| p.S1448G | 1                            | No                                     | <i>BRCA1</i> | Unknown | Benign             | Affect    | C0          | -                  |
| p.A1615T | 1                            | No                                     | <i>BRCA1</i> | Unknown | Possibly           | Affect    | C0          | -                  |
| p.M1783T | 1                            | No                                     | <i>BRCA1</i> | Unknown | Probably           | Affect    | C55         | -                  |
| p.K322Q  | 1                            | No                                     | <i>BRCA2</i> | Unknown | Benign             | Affect    | C0          | -                  |
| p.L366V  | 1                            | No                                     | <i>BRCA2</i> | Novel   | Benign             | Tolerated | C0          | -                  |
| p.A495T  | 1                            | No                                     | <i>BRCA2</i> | Novel   | Benign             | Tolerated | C0          | -                  |
| p.M784V  | 4                            | No                                     | <i>BRCA2</i> | Unknown | Benign             | Tolerated | C0          | Class 3            |
| p.K1533N | 1                            | No                                     | <i>BRCA2</i> | Unknown | Benign             | Tolerated | C0          | -                  |
| p.H1561N | 1                            | Yes                                    | <i>BRCA2</i> | Unknown | Benign             | Tolerated | C0          | -                  |
| p.M1915T | 3                            | No                                     | <i>BRCA2</i> | Unknown | Benign             | Tolerated | C0          | -                  |
| p.G2044V | 1                            | Yes                                    | <i>BRCA2</i> | Unknown | Benign             | Tolerated | C0          | -                  |
| p.V2138F | 2                            | Yes                                    | <i>BRCA2</i> | Unknown | Benign             | Tolerated | C0          | -                  |
| p.I2490T | 3                            | Yes                                    | <i>BRCA2</i> | Unknown | Benign             | Tolerated | C45         | -                  |
| p.I2944F | 2                            | Yes                                    | <i>BRCA2</i> | Unknown | Probably           | Affect    | C0          | -                  |
| p.A3029T | 1                            | No                                     | <i>BRCA2</i> | Unknown | Benign             | Tolerated | C0          | -                  |
| p.I3412V | 1                            | Yes                                    | <i>BRCA2</i> | Unknown | Benign             | Tolerated | C0          | -                  |

Align GVG-D: C0 (Less likely to interfere in protein function), C15, C25, C35, C45, C55, C65 (More likely to interfere in protein function); Polyphen: Variant Benign, Possibly damaging and Probably damaging; SIFT: Variant Tolerated (benign) or Affect protein function. LOVD-IARC: class 1 (Not pathogenic or of no clinical significance), class 2 (Likely not pathogenic or of little clinical), class 3 (Uncertain), class 4 (Likely pathogenic), class 5 (definitely pathogenic).

**Figure 2 Schematic representations of *BRCA1/2* proteins.** *BRCA1/2* proteins with their functional domains and the localization of all identified pathogenic mutations (red labels) and VUSs (black labels). Novel alterations are marked with an asterisk. The frequency of each alteration is represented by gray dots. The red and green bars represent the detected genomic rearrangements. The black bar represents the *ATM*, *CDH1* and *RAD50* binding domain.

### Mutation frequency by inclusion criteria

Overall, the mutation detection rate was 26%; however, when selecting according to age of cancer onset, young women ( $\leq 35$  yo) had the highest rate at 35% (Figure 3). Regarding specific HBOC criteria fulfilled by each family, the majority of mutation carriers (45%) met criterion 2 (*Breast cancer diagnosed  $\leq 45$  yo and familial history*

positive for BC). Four out of five patients fulfilling the criterion for Ashkenazi Jewish ancestry (criterion 7) harbored pathogenic mutations, and patients fulfilling criterion 6 showed a detection rate of 44% (4/9). Patients younger than 45 yo without a family history of cancer (criterion 1) did not present pathogenic mutations in our cohort (Table 3).

**Figure 3 *BRCA1/2* mutation frequency.** Mutation frequency according to age of cancer onset.

**Table 3 Mutation detection rate according to inclusion criteria** BC: Breast cancer; OC: ovarian cancer; FTC: Fallopian tube cancer; PPC: Primary peritoneal cancer

| Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC)  | Distribution by criterion | Number of mutation carriers | Positive detection rate |
|--|---------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| 1. BC $\leq$ 45 years of age (no family history)   | 11                        | 0                           | 0%                      |
| 2. BC $\leq$ 45 years of age with $\geq$ 1 relative with BC, OC, FTC and PPC at any age                    | 42                        | 14                          | 33%                     |
| 3. BC $<$ 45 $\leq$ 50 years of age with $\geq$ 1 relative with BC, OC, FTC and PPC $\leq$ 50 years of age | 16                        | 2                           | 12%                     |
| 4. BC $>$ 50 years of age with $\geq$ 1 relatives with BC, OC, FTC and PPC at any age                      | 28                        | 5                           | 18%                     |
| 5. Two BC when the first occurrence was prior to age 50  | 5                         | 1                           | 20%                     |
| 6. BC at any age plus OC, FTC and PPC at any age   | 9                         | 4                           | 44%                     |
| 7. Ashkenazi Jewish ancestry   | 5                         | 4                           | 80%                     |
| 8. OC, FTC and PPC at any age  | 3                         | 1                           | 33%                     |
| 9. Male BC   | 1                         | 0                           | 0%                      |

## Array CGH and gene dosage qPCR

Among the 120 cancer patients included in this study, 100 had array CGH data available from a previous study [19], which were used for detecting CNVs within the 14 breast cancer susceptibility genes. After a careful visual inspection, two of them were found to harbor CNVs in *PTEN* and *ATM* genes. The exon-4 heterozygous deletion in the *ATM* gene (Patient SM-46, carrier of a pathogenic *BRCA2* mutation, c.K3161\*) and exon-2 heterozygous deletion in the *PTEN* gene (Patient SM-62) were confirmed using the duplex qPCR gene dosage method (Figure 4). However, both the array CGH probe and gene dosage PCR primers for the *PTEN* gene were located in the deleted region that has recently been described as a polymorphic chromosomal deletion [21].

## Discussion

In Brazil, data concerning the prevalence of *BRCA1/2* mutations are limited. Previous studies using different selection criteria have reported mutation frequencies ranging from 2.3% to 20% [22-28]. The largest study conducted in Brazil used the protein truncation test (PTT) to evaluate 612 BC cases with high and medium risks of breast cancer and found a mutation carrier prevalence of 3.4% [25]. In the current study, we detected a germ line mutation prevalence of 26% within the *BRCA1/2* genes, *TP53* R337H and *CHEK2* 1100delC in 120 Brazilian patients with clinical criteria for HBOC (16.5% in *BRCA1*, 6% in *BRCA2*, 2.5% in *TP53* and 1% in *CHEK2*). Previous studies have described a mutation detection rate ranging from 8.9 to 43.8% [29-31] in *BRCA1/2*, revealing differences between our cohort and others. Thus, it is important to note that our study was based on an institutional registry and probably does not

represent the broad ethnic and socio-economic diversity of the Brazilian population. This can partially explain some inconsistency between different Brazilian studies, in addition to the different screening methods and inclusion criteria for selecting patients.

Regardless of specific populations and ethnic groups, recurrent *BRCA1/2* mutations are rarely detected in hereditary breast cancer. In this sense, a wide range of pathogenic mutations was detected in this series, which is expected for an unrelated cohort of an ethnically mixed population such as that of Brazil. The most frequent mutation identified in this series was the Ashkenazi Jewish 5382insC variant, which was found in approximately 10% of the mutation carriers. This is one of the most common *BRCA1* mutations identified worldwide and is found both among Ashkenazi Jews and women of Slavic origin [32,33].

Splice-site mutations in the *BRCA1* gene are considered to be rare, and thus far, only a few splice-site mutations have been reported in the BIC database. Using transcriptional analysis of the BC tumor harboring the novel mutation c.560 + 2 T > A, we confirmed the presence of an aberrant transcript that was not found in the control sample. Interestingly, this variant was also reported in another series of unrelated young Brazilian patients with a positive family history recently reported by us [28]. Although we were able to show that the mutant allele can produce the aberrant transcript but not able to demonstrate whether the mutant allele was still able to produce the full-length *BRCA1* transcript, this splice site was considered pathogenic because it has been reported that mutations in the highly conserved acceptor or donor sites are pathogenic *per se* [34].

One of the main issues in the molecular diagnosis of *BRCA1/2* mutations is the effect of VUSs in protein function. Several approaches have been used to determine the pathogenicity of VUSs, including the investigation of co-segregation within pedigrees, frequency in healthy controls, lack of co-occurrence with pathogenic mutations, and *in silico* analysis such as amino acid conservation and the severity of amino acid change [35]. According to the criteria adopted in this study, only the p.M784V variant had an uncertain clinical relevance according to the IARC-LOVD database; however, because of the lack of co-segregation in one affected sister and the presence of the variant in a set of 95 healthy individuals (data not shown), this variant is likely to have little or no clinical relevance.

Our results demonstrated that the age at cancer diagnosis had a significant impact on the positive detection rate. In this sense, we found that the group of early-onset breast cancer patients ( $\leq 35$  yo) is at a higher risk of carrying pathogenic mutations in the *BRCA1/2* genes with a positive detection rate of 35%, which reached 42% in cases with a family history of breast cancer (not shown). In a previous study by our group, patients  $\leq 35$  years of age showed a mutation rate of 20% in *BRCA1/2* genes with a significant increase of the detection rate in young women with a positive family history (37.5%) [28]. The concordance among these studies in early-onset breast cancer patients strengthens the hypothesis that young Brazilian women with a positive family history are at high risk of being *BRCA1/2* carriers.

Li-Fraumeni syndrome is inherited in an autosomal dominant manner and is associated with germ line mutations in the *TP53* gene. Despite the broad range of pathogenic mutations in this gene, a specific mutation occurring in the tetramerization domain of the *TP53* gene (p.R337H) has been reported at a high prevalence in southern and southeastern Brazil. Recent studies have identified p.R377H carriers in a variety of tumors, in particular, early breast cancer [36]. In our analysis, the three carriers had breast cancer prior to the age of 50 without a family history of other tumors typical of Li-Fraumeni syndrome. Therefore, due to the high prevalence of the R337H mutation in southeast Brazil, we asserted that a genetic test for this variant is strongly recommended for families matching clinical criteria for HBOC and in whom mutation testing for *BRCA1* and *BRCA2* is negative.

Germ line DNA CNVs have recently been implicated in predisposition to different tumors [17]. In this regard, Rouleau and colleagues [37] used an in-house array CGH platform to search for copy number imbalances in ten genes involved in hereditary breast and ovarian cancer including *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *BARD1*, *ATM*, *RAD50*, *RAD51*, *BRIP1*, *RAP80* and *PALB2*. In a series of 472 patients, they found only three large rearrangements in *BRCA1/2*, two in *CHEK2* and one intronic deletion in *BRIP1*. In our series, with the exception of *RAP80*, all genes were also evaluated for DNA copy number imbalances. We detected four large rearrangements (3% of the cohort), thus confirming the two rearrangements affecting *BRCA1* and revealing two one-exon deletions in the *ATM* and *PTEN* genes. Since we cannot rule out the presence of point mutations in these 14 genes, we can only suggest that germ line CNVs in these genes are at low frequencies. Additionally, CNVs in both *BRCA1* and *BRCA2* genes were also confirmed to be at low frequency in this Brazilian HBOC series.

Germ line point mutations in *ATM* and *PTEN* have been reported to play a role in breast cancer predisposition [38-40]. However, to our knowledge, CNVs within these genes had never been reported in HBOC patients. In the current study, patient SM-46, who was found to carry an exon 4 deletion in the *ATM* gene, also had a pathogenic mutation in the *BRCA2* gene; therefore, the involvement of the *ATM* intragenic deletion with breast cancer predisposition in this particular case remains to be clarified.

Germ line mutations in the *PTEN* gene are associated with the PTEN hamartoma tumor syndrome (PHTS) in which Cowden syndrome (CS) is the most common phenotype. Patients with CS are at an increased risk of a variety of tumors including a 50% increased lifetime risk for breast cancer [41]. Although one of our BC patients presented a *PTEN* exon 2 deletion, recently, Sandell and colleagues described an 899-bp intronic deletion located 58 bp upstream *PTEN* exon 2 (c.80-956\_-58del899), which was identified in 4% of British PHTS patients and in 3% of healthy individuals [20]. Apparently, this British alteration is the same found in our BC patient; one of the primer pairs designed for duplex PCR was located within this polymorphic region. Nevertheless, according to Sandell and colleagues, the presence of this polymorphism in healthy individuals, the lack of aberrant splicing and the co-occurrence with known pathogenic mutations indicate that this variant is probably a polymorphism and has no phenotypic effect.

## Conclusions

In summary, this is the most comprehensive *BRCA1/2* mutation screening study of Brazilian BC patients from families with hereditary breast and ovarian cancer. The study demonstrates a high prevalence of *BRCA1* point mutations and low frequency of CNVs within the *BRCA1* and *BRCA2* genes. Moreover, the detection of the *TP53* R337H variant in our series and the fact that this variant has a founder effect in our population prompted us to suggest that all female breast cancer patients with clinical criteria for HBOC and negative for *BRCA1/2* genes should be tested for this variant. Additionally, the identification of CNVs in other breast cancer susceptibility genes revealed the complex genetic basis of this series of 120 unrelated Brazilian women with hereditary breast and ovarian cancer.

## Competing interests

The authors declare no competing interests

## Authors' contributions

BMR and DMC conceived the study; FCCS, BCL, MCPF, GTT, ACK and DMC performed and analyzed the experiments. EMMS, MIA and BMR assessed the clinical data and selected patients. BMR and DMC contributed reagents, materials and analysis tools. FCS and DMC wrote and edited the manuscript. BCL, MCPF and GTT edited and revised the manuscript. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

## Acknowledgments

The authors thank Dr. Ricardo R. Brentani (*in memoriam*), the patients and the A. C. Camargo biobank. We also thank the AC Camargo Biobank (ACCB), specially the DNA and RNA bank.

### *Grant support*

Brazilian Federal Agency Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (408833/2006-8) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2008/57887-9).

## Additional File

### **Additional\_file\_1 as DOC**

**Additional file 1** Complete molecular information of 120 patients.

### **Additional\_file\_2 as TIFF**

**Additional file 2** MLPA analysis. A. Electropherograms showing reduced peaks

(arrows) of exons 16 and 17 of the *BRCA1* gene in patient SM-03 compared with a control sample (C), characterizing a two-exon deletion. B. Electropherogram obtained from the patient MO-28 showing the amplification (off-scale peak) of exon 23 in the *BRCA1* gene (arrow).

## References

- 1 Clark AS, Domchek SM: **Clinical management of hereditary breast cancer syndromes.** *J Mammary Gland Biol and Neoplasia* 2011, **16**(1):17–25.
- 2 Durocher F, Tonin P, Shattuck-Eidens D, Skolnick M, Narod SA, Simard J: **Mutation analysis of the BRCA1 gene in 23 families with cases of cancer of the breast, ovary, and multiple other sites.** *J Med Genet* 1996, **33**:814–819.
- 3 Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE: **Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers.** *Breast Cancer Linkage Consortium. Lancet* 1994, **343**:692–695.
- 4 Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, Weber B, Lenoir G, Chang-Claude J, Sobol H, Teare MD, Struewing J, Arason A, Scherneck S, Peto J, Rebbeck TR, Tonin P, Neuhausen S, Barkardottir R, Eyfjord J, Lynch H, Ponder BA, Gayther SA, Zelada-Hedman M, and the Breast Cancer Linkage Consortium: **Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. the Breast Cancer Linkage Consortium.** *Am J Hum Genet* 1998, **62**(3):676–689.
- 5 Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, Neuhausen S, Jonasson JG, Tavtigian SV, Tulinius H, Ogmundsdottir HM, Eyfjörd JE: **A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes.** *Nat Genet* 1996, **13**(1):117–119.
- 6 Tonin PN, Mes-Masson AM, Futreal PA, Morgan K, Mahon M, Foulkes WD, Cole DE, Provencher D, Ghadirian P, Narod SA: **Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in French Canadian breast and ovarian cancer families.** *Am J Hum Genet* 1998, **63**(5):134113–134151.
- 7 Peto J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N, Easton DF, Evans C, Deacon J, Stratton MR: **Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer.** *J Natl Cancer Inst.* 1999, **91**:943–949.
- 8 Schutte M, Seal S, Barfoot R, Meijers-Heijboer H, Wasielewski M, Evans DG, Eccles D, Meijers C, Lohman F, Klijn J, van den Ouweland A, Futreal PA, Nathanson KL, Weber BL, Easton DF, Stratton MR, Rahman N, Breast Cancer Linkage Consortium: **Variants in CHEK2 other than 1100delC do not make a major contribution to breast cancer susceptibility.** *Am J Hum Genet* 2003, **72**(4):1023–1028.
- 9 Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, Wasielewski M, de Snoo A, Oldenburg R, Hollestelle A, Houben M, Crepin E, van Veghel-Plandsoen M, Elstrodt F, van Duijn C, Bartels C, Meijers C, Schutte M, McGuffog L, Thompson D, Easton D, Sodha N, Seal S, Barfoot R, Mangion J, Chang-Claude J, Eccles D, Eeles R, Evans DG, Houlston R, Murday V, Narod S, Peretz T, Peto J, Phelan C, Zhang HX, Szabo C, Devilee P, Goldgar D, Futreal PA, Nathanson KL, Weber B, Rahman N, Stratton MR, CHEK2-Breast Cancer Consortium: **Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(\*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations.** *Nat Genet* 2002, **31**:55–59.



- 10 CHEK2 Breast Cancer Case-control Consortium: **CHEK2\*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies.** *Am J Hum Genet* 2004, **74**:1175–1182.
- 11 Achatz MI, Hainaut P, Ashton-Prolla P: **Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening?** *Lancet Oncol* 2009, **10**(9):920–925.
- 12 Plevritis SK, Kurian AW, Sigal BM, Daniel BL, Ikeda DM, Stockdale FE, Garber AM: **Cost-effectiveness of screening BRCA1/2 mutation carriers with breast magneticresonance imaging.** *JAMA* 2006, **295**(20):2374–2384.
- 13 Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A: **Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy.** *Nature* 2005, **434**(7035):917–921. 14.
- 14 **Breast Cancer Information Core.** <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>.
- 15 Vallée MP, Francy TC, Judkins MK, Babikyan D, Lesueur F, Gammon A, Goldgar DE, Couch FJ, Tavtigian SV: **Classification of missense substitutions in the BRCA genes: a database dedicated to Ex-UVs.** *Hum Mutat* 2012, **33**(1):22–28.
- 16 **Sorting Intolerant From Tolerant.** [http://sift.jcvi.org/www/SIFT\\_BLink\\_submit.html](http://sift.jcvi.org/www/SIFT_BLink_submit.html).
- 17 **Polyphen-2.** <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>.
- 18 **Align GVGD.** [http://agvgd.iarc.fr/agvgd\\_input.php](http://agvgd.iarc.fr/agvgd_input.php).
- 19 Krepischi AC, Achatz MI, Santos EM, Costa SS, Lisboa BC, Brentani H, Santos TM, Gonçalves A, Nóbrega AF, Pearson PL, Vianna-Morgante AM, Carraro DM, Brentani RR, Rosenberg C: **Germline DNA copy number variation in familial and early-onset breast cancer.** *Breast Cancer Res* 2012, **14**(1):R24.
- 20 Torrezan GT, da Silva FC C, Krepischi AC, Monteiro Dos Santos EM, Rossi BM, Carraro DM: **A novel SYBR-based duplex qPCR for the detection of gene dosage: detection of an APC large deletion in a familial adenomatous polyposis patient with an unusual phenotype.** *BMC Med Genet* 2012, **13**:55.
- 21 Sandell S, Schuit RJ, Bunyan DJ: **An intronic polymorphic deletion in the PTEN gene: implications for molecular diagnostic testing.** *Br J Cancer*, **108**(2):438-441
- 22 Dufloth RM, Carvalho S, Heinrich JK, Shinzato JY, dos Santos CC, Zeferino LC, Schmitt F: **Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history.** *Sao Paulo Med J* 2005, **123**(4):192–197.
- 23 da Costa EC, Vargas FR, Moreira AS, Lourenço JJ, Caleffi M, Ashton-Prolla P, Martins Moreira M: **Founder effect of the BRCA1 5382insC mutation in Brazilian patients with hereditary breast ovary cancer syndrome.** *Cancer Genet Cytogenet* 2008, **184**(1):62–66.
- 24 Esteves VF, Thuler LC, Amêndola LC, Koifman RJ, Koifman S, Frankel PP, Vieira RJ, Brazilian Network of Breast and Ovarian Familial Cancer Aggregation: **Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in families with medium and high risk of breast and ovarian cancer in Brazil.** *Braz J Med Biol Res* 2009, **42**(5):453–457.
- 25 Ewald IP, Izetti P, Vargas FR, Moreira MA, Moreira AS, Moreira-Filho CA, Cunha DR, Hamaguchi S, Camey SA, Schmidt A, Caleffi M, Koehler-Santos P, Giugliani

- R, Ashton-Prolla P: **Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil.** *Breast Cancer Res Treat* 2007, **103**:349e53.
- 26 Ewald IP, Izetti P, Vargas FR, Moreira MA, Moreira AS, Moreira-Filho CA, Cunha DR, Hamaguchi S, Camey SA, Schmidt A, Caleffi M, Koehler-Santos P, Giugliani R, Ashton-Prolla P: **Prevalence of the BRCA1 founder mutation c.5266dupin Brazilian individuals at-risk for the hereditary breast and ovarian cancer syndrome.** *Hered Cancer Clin Pract* 2011, **20**(9):12.
- 27 Lourenco JJ, Vargas FR, Bines J, Santos EM, Lasmar CAP, Costa CH, Texeira EMB, Maia MCM, Coura F, Silva CHD, Moreira MAM: **BRCA1 mutations in Brazilian patients.** *Genet Mol Biol* 2004, **27**:500e4.
- 28 Carraro DM, Koike Folgueira MA, Garcia Lisboa BC, Ribeiro Olivieri EH, Vitorino Krepischi AC, de Carvalho AF, de Carvalho Mota LD, Puga RD, do Socorro Maciel M, Michelli RA, de Lyra EC, Grosso SH, Soares FA, de Souza Waddington Achatz MI, Brentani H, Moreira-Filho CA, Brentani MM: **Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil.** *Plos One*, **8**(3):e57581
- 29 Loman N, Johannsson O, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A: **Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2001, **93**(16):1215–1223.
- 30 Meindl A, German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer: **Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population.** *Int J Cancer* 2002, **97**(4):472–480.
- 31 Nanda R, Schumm LP, Cummings S, Fackenthal JD, Sveen L, Ademuyiwa F, Cobleigh M, Esserman L, Lindor NM, Neuhausen SL, Olopade OI: **Genetic testing in an ethnically diverse cohort of high-risk women: a comparative analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in American families of European and African ancestry.** *JAMA* 2005, **294**(15):1925–1933.
- 32 Finkelman BS, Rubinstein WS, Friedman S, Friebel TM, Dubitsky S, Schonberger NS, Shoretz R, Singer CF, Blum JL, Tung N, Olopade OI, Weitzel JN, Lynch HT, Snyder C, Garber JE, Schildkraut J, Daly MB, Isaacs C, Pichert G, Neuhausen SL, Couch FJ, van't Veer L, Eeles R, Bancroft E, Evans DG, Ganz PA, Tomlinson GE, Narod SA, Matloff E, Domchek S, Rebbeck TR: **Breast and Ovarian Cancer Risk and Risk Reduction in Jewish BRCA1/2 Mutation Carriers.** *J Clin Oncol* 2012, **30**(12):1321–1328.
- 33 Hamel N, Feng BJ, Foretova L, Stoppa-Lyonnet D, Narod SA, Imyanitov E, Sinilnikova O, Tihomirova L, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Hansen T, Nielsen FC, Thomassen M, Yannoukakos D, Konstantopoulou I, Zajac V, Ciernikova S, Couch FJ, Greenwood CM, Goldgar DE, Foulkes WD: **On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations.** *Eur J Hum Genet* 2011, **19**(3):300–306.
- 34 Pagenstecher C, Wehner M, Friedl W: **Aberrant splicing in MLH1 and MSH2 due to exonic and intronic variants.** *Hum Genet* 2006, **119**(1–2):9–22.
- 35 Caputo S, Benboudjema L, Sinilnikova O, Rouleau E, Bérout C, Lidereau R, French BRCA GGC Consortium: **Description and analysis of genetic variants in French hereditary breast and ovarian cancer families recorded in the UMD**

- BRCA1/BRCA2 databases.** *Nucleic Acids Res* 2012, **40**(Database issue):D992–D1002.
- 36 Palmero EI(1), Schüler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, Olivier M, Martel-Planche G, Marcel V, Aguiar E, Giacomazzi J, Ewald IP, Giugliani R, Hainaut P, Ashton-Prolla P: **Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil.** *Cancer Lett* 2008, **261**(1):21–25.
- 37 Rouleau E, Jesson B, Briaux A, Nogues C, Chabaud V, Demange L, Sokolowska J, Coulet F, Barouk-Simonet E, Bignon YJ, Bonnet F, Bourdon V, Bronner M, Caputo S, Castera L, Delnatte C, Delvincourt C, Fournier J, Hardouin A, Muller D, Peyrat JP, Toulas C, Uhrhammer N, Vidal V, Stoppa-Lyonnet D, Bieche I, Lidereau R: **Rare germline large rearrangements in the BRCA1/2 genes and eight candidate genes in 472 patients with breast cancer predisposition.** *Breast Cancer Res Treat* 2012, **133**(3):1179–1190.
- 38 Walsh T, King MC: **Ten genes for inherited breast cancer.** *Cancer Cell* 2007, **11**(2):103–105.
- 39 Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE, Lubratovich M, Verselis SJ, Isselbacher KJ, Fraumeni JF, Birch JM, Li FP, Garber JE, Haber DA: **Heterozygous germline hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome.** *Science* 1999, **286**:2528–2531.
- 40 The Cancer Genome Atlas Network: **Comprehensive molecular portraits of human breast tumours.** *Nature*. 2012, **490**(7418):61–70.
- 41 Nusbaum R, Vogel KJ, Ready K: **Susceptibility to breast cancer: hereditary syndromes and low penetrance genes.** *Breast Dis* 2006, **27**:21–50.