

**AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE MUTAÇÃO NO
GENE *BRCA1* EM TUMORES TRIPLO-NEGATIVOS DE
MAMA: ASSOCIAÇÃO DA MUTAÇÃO COM
CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DE RESPOSTA
TERAPÊUTICA**

RAFAEL CANFIELD BRIANESE

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Dirce Maria Carraro

**Co-Orientadora: Dra. Elisa Napolitano e
Ferreira**

São Paulo

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Brianese, Rafael Canfield

Avaliação da prevalência de mutação no gene *BRCA1* em tumores triplo-negativos de mama: associação da mutação com características clínicas e de resposta terapêutica / Rafael Canfield

Brianese – São Paulo, 2015.

77p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. NEOPLASIAS DA MAMA. 2. NEOPLASIAS DE MAMA TRIPLO NEGATIVAS/genética. 3. GENES BRCA1. 4. SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS EM LARGA ESCALA/método. 5. ANÁLISE DE SOBREVIDA. 6. MUTAÇÃO

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que sempre me incentivaram na busca do conhecimento,
As pacientes que de forma altruísta consentiram em participar dessa
pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e bênçãos concedidas.

Agradeço a todas as pessoas envolvidas direta ou indiretamente na execução desse trabalho. Primeiramente, minha orientadora Dra. Dirce Maria Carraro pela paciência e por ter sido uma mentora na execução desse trabalho, bem como durante as revisões desse documento. Também agradeço a todos os membros do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, em especial minha co-orientadora, Dra. Elisa N. Ferreira, e, também, Dra. Bruna D. F. Barros, Dr. Felipe C. C. Silva e Dra. Giovana T. Torrezan, os quais estiveram mais envolvidos com a execução desse trabalho.

Agradeço a equipe do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, Dr. Antônio Hugo J. F. M. Campos, M^a Eloisa R. Olivieri, M^a Ana Paula Suenaga e Louise D.C. Mota, pela prontidão e excelência em atender aos pedidos de amostras usadas nos experimentos aqui descritos e ao laboratório de Diagnóstico Molecular, principalmente M^a Bianca Lisboa e Dra. Maristela T. Pimenta, pelas contribuições.

Agradecimentos à divisão de bioinformática do Centro Internacional de Ensino e Pesquisa (CIPE), Dr. Jorge E. Souza e Renan Valieris, e a todos os funcionários do CIPE, em especial a Vanessa Dantas e Patrícia Santos pela assessoria e momentos de descontração. Agradeço também, aos funcionários da secretaria de pós-graduação da Fundação Antônio Prudente bem como aos funcionários da biblioteca, representados pela bibliotecária Suely Francisco.

Agradeço ainda, às pacientes e familiares pela valiosa contribuição para a ciência consentindo em participar dessa pesquisa.

Agradeço a minha família e namorada pelo apoio e amor nessa jornada.

Por fim, agradeço às CAPES, CNPq e FAPESP pelo fomento financeiro.

RESUMO

Brianese RC. **Avaliação da prevalência de mutação no gene *BRCA1* em tumores triplo-negativos de mama: associação da mutação com características clínicas e de resposta terapêutica.** São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente em mulheres em todo o mundo, excluindo os casos de câncer de pele não-melanoma. A estimativa de incidência para o biênio de 2014-2015 no Brasil é de mais de 57 mil novos casos por ano. O câncer de mama é uma doença heterogênea, podendo ser dividida em subtipos de acordo com o perfil imunofenotípico e de expressão gênica desses tumores. Em relação ao perfil imunofenotípico, o tumor de mama triplo-negativo (TN) é caracterizado pela ausência dos receptores hormonais de estrogênio (ER) e de progesterona (PR) além de não apresentar super-expressão/amplificação do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Essa condição é importante, pois as terapias hormonais e moleculares efetivas em outros subtipos, não têm efeito nesses tumores, sendo o tratamento feito com base em quimioterapia sistêmica. Somado a isso, o tumor TN demonstra maior agressividade e padrões metastáticos distintos dos outros tumores, o que resulta em pior prognóstico e sobrevida para as pacientes portadoras desses tumores. Vários trabalhos, incluindo do nosso grupo de pesquisa, têm relatado alta prevalência de mutações germinativas patogênicas no gene *BRCA1* em mulheres jovens portadoras de tumores TN de mama. Esse gene está envolvido principalmente com mecanismos de reparo de DNA por recombinação homóloga, atuando como um supressor tumoral. Dessa forma, mutações germinativas que ocasionem perda de função da respectiva proteína podem favorecer o desenvolvimento de câncer, principalmente na mama e no ovário de mulheres portadoras. No entanto, não está bem estabelecido o percentual de mutação patogênica em tumores triplo negativo em mulheres brasileiras não selecionadas por idade ao diagnóstico ou por histórico familiar, e nem a origem dessa mutação, se é somática ou

germinativa. Sendo assim, a avaliação da prevalência dessas mutações em tumores TN de mulheres em diferentes idades ao diagnóstico, a caracterização de sua origem somática ou germinativa e o estabelecimento da associação da presença de mutação com as características clínicas e demográficas dessas pacientes é de grande relevância. Assim, neste estudo, avaliamos a prevalência de mutações patogênicas somáticas e germinativas em tumores de mama do subtipo triplo negativo através de estratégias de sequenciamento paralelo de múltiplos alvos (*Target sequencing*) com sequenciamento em paralelo nas plataformas Ion PGM Torrent e 454 GS Junior e associamos esta informação com características clínicas e de resposta à terapêutica. Foram avaliadas amostras tumorais de 131 pacientes atendidas no A.C.Camargo Cancer Center, das quais 15 (11,45% - 15/131) apresentaram mutação patogênica no gene *BRCA1*, 4 (3,05% - 4/131) apresentaram uma Variante de Significado Incerto e 112 (85,5% - 112/131) foram classificadas como selvagens. Mutações germinativas representaram 85,7% das mutações patogênicas observadas. Tumores *BRCA1*-mutados foram mais propensos a se desenvolver em pacientes que apresentaram histórico de câncer de mama na família ($p=0,0008$) e em idade mais jovem que os tumores *BRCA1*-selvagens [8/15 (53,3%) <40 anos vs 24/88 (21,4%) <40anos, respectivamente, $p=0,0101$]. Demais variáveis clínico-patológicas não apresentaram associações com a presença da mutação patogênica. Houve uma tendência de melhor sobrevida global e sobrevida livre de doença para pacientes portadoras de mutação patogênica, entretanto não estatisticamente significativa. A maior parte das pacientes recebeu tratamento quimioterápico baseado em antraciclinas combinado ou não ao uso de taxanos. Nossos resultados mostram que mutação de perda de função em *BRCA1* é um evento recorrente em tumores de mama triplo-negativos que acometem mulheres brasileiras jovens e confirma que mulheres diagnosticadas com tumores triplo-negativo em idade jovem estão em risco de apresentarem mutações germinativas patogênicas neste gene e devem, portanto, ser referenciadas para teste genético.

SUMMARY

Brianese RC. **[Evaluation of *BRCA1* gene mutation prevalence in triple negative breast cancer: Association of mutation with clinical features and treatment response]**. São Paulo; 2015. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Breast cancer is the most frequent type of cancer in women worldwide, with exception of non-melanoma skin cancer. The incidence estimate for 2014-2015 biennium in Brazil is more than 57 thousand new cases per year. Breast cancer is a heterogeneous disease that is divided according to immunophenotypic and gene expression profiles of the tumors. Regarding the immunophenotypic profile, the triple-negative breast cancer (TNBC) is characterized by the lack of hormonal receptors for estrogen and progesterone (ER and PR) and also the absence of super-expression/amplification of the Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2). This condition is important because hormonal and molecular therapies have no effect on these tumors. Therefore systemic chemotherapy is the mainstay treatment. Moreover, TNBC displays higher aggressiveness and distinct metastatic pattern compared to other breast tumors, resulting in worse prognosis and survival for TNBC patients. Several researchers, including our research group, have reported high prevalence of germline pathogenic mutations in the *BRCA1* gene among young women diagnosed with TNBC. This gene is involved primarily in the mechanism of DNA repair by homologous recombination and acts as a tumor suppressor gene. Thus, germline mutation that leads to loss of function of its respective protein may favor cancer development, mostly in the breast and ovarian of carriers. However, it is not well established the proportion of pathogenic mutation in TNBC patients unselected for age at diagnosis and for family history in Brazil nor the mutation origin, whether somatic or germline. Thereby, it is important to evaluate the prevalence of these mutations in TNBC patients in different

age at diagnosis; to characterize the somatic or germline origin of the mutation and to establish an association between the mutation presence and clinic and demographic features of TNBC patients. Thus, in this study, we evaluated the prevalence of somatic and germline pathogenic mutations in TNBC using a multiple-target massive parallel sequencing (Target sequencing) strategy in the Ion PGM Torrent and 454 GS Junior platforms and associated the information with clinical features and treatment response. Tumor samples from 131 TNBC patients attending A.C.Camargo Cancer Center were evaluated: fifteen (11,45% - 15/131) harbored *BRCA1* pathogenic mutations; four (3,05% - 4/131) showed a Variant of Uncertain Significance (VUS) and 112 (85,5% - 112/131) were classified as wild type. Germline mutations accounted for 85,7% of the pathogenic mutations detected. *BRCA1*-mutated tumors were more prone to be developed by patient who had family history of breast cancer ($p=0,0008$) and in younger women than *BRCA1*-wild type tumors [8/15 (53,3%) <40 years vs 24/88 (21,4%) <40 years, respectively, $p=0,0101$]. Other clinopathological variables slightly varied with no statistical significance. There was a trend to better overall and disease-free survival in TNBC *BRCA1*-mutated patients although not statistically significant. Most of patients were treated with chemotherapy in an anthracyclines-based regimen combined or not with taxanes. Lastly, our findings showed that loss of function mutations in *BRCA1* gene is a recurrent event in TNBC that affects young Brazilian women and confirm that women diagnosed with TNBC at early age are in risk of carrying *BRCA1* germline pathogenic mutation and thus should be referred to genetic testing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação do reparo de quebra de dupla fita de DNA por recombinação homóloga.....	16
Figura 2	Delineamento do estudo.....	25
Figura 3	Representação da PCR em emulsão.....	28
Figura 4	Construção de biblioteca para 454 GS Junior adaptada a partir da biblioteca Ion Torrent.....	30
Figura 5	Seleção das amostras incluídas no estudo.....	36
Figura 6	Representação do alinhamento das sequencias referentes à amostra MJ 2021 ressaltando a região da mutação deletéria c.300T>G.....	41
Figura 7	Prevalência de mutação no gene <i>BRCA1</i> em tumores imunofenótipo triplo-negativo.....	48
Figura 8	Representação esquemática da proteína BRCA1 e das alterações patogênicas encontradas nesse estudo.....	49
Figura 9	Distribuição da idade ao diagnóstico das portadoras de tumor TN.....	51
Figura 10	Taxa de tumores com mutação em <i>BRCA1</i> em mulheres diagnosticadas com 40 anos ou menos e com histórico familiar de câncer de mama.....	52
Figura 11	Sobrevida global em 5 anos (60 meses).....	55

Figura 12	Sobrevida livre de recorrência em 5 anos (60 meses).....	55
Figura 13	Curva de sobrevida global em cinco anos em pacientes portadoras de tumor TN.....	57
Figura 14	Curva de sobrevida livre de recorrência em cinco anos em pacientes portadoras de tumor TN.....	58

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Sequência dos <i>primers</i> adaptados para a plataforma 454 GS Junior.....	30
Tabela 1	Caracterização clínico-demográfica das pacientes com tumor imunofenótipo triplo-negativo.....	36
Tabela 2	Comparação entre as plataformas de sequenciamento massivo paralelo 454 GS Junior e Ion PGM Torrent.....	40
Tabela 3	Comparação das abordagens de <i>Target Sequencing</i>	42
Tabela 4	Status de mutação de pacientes portadoras de tumores de mama imunofenótipo triplo-negativo.....	44
Tabela 5	Características clínicas e demográficas de pacientes com tumores de imunofenótipo triplo-negativo de acordo com a presença de mutação no gene <i>BRCA1</i>	52

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACCCC	A.C.Camargo Cancer Center
AKT	v-akt murine thymoma viral oncogene homologs
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated serine/threonine kinase
ATR	Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related
BARD1	BRCA1 associated RING domain 1
BIC	Breast Information Core
BRCA1	Breast cancer 1, early onset
BRCA2	Breast cancer 2, early onset
BRIP1	BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1
CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
CDI	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
CHEK2	Checkpoint kinase 2
CK	cytokeratin
CTNNB1	Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1
DNA	Deoxyribonucleic acid
EGFR	Epidermal growth factor receptor 1
ER	Estrogen receptor
ERBB2	Avian Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 2
FOXA1	Forkhead box protein A1
H2AX	H2A Histone Family, Member X
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
IHQ	imuno-histoquímica
IM	imuno-modulador
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ki67	Antigen KI-67
KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogenes homolog
KRT18	keratin 18, type I

LOVD-IARC	Leiden Open Variation Database - International Agency for Research on Cancer
LRA	luminal receptor de andrógeno
METABRIC	Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium
ML	mesenchymal like
MLH1	MutL homolog 1
Mre11	MRE11 Meiotic Recombination 11
MSH2	mutS homolog 2
MSH6	mutS homolog 6
MSL	mesenchymal stem-like
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NBN/NBS1	Nibrin
P53	Tumor protein 53
P63	Tumor protein 63
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PARP	Poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase
PCR	Polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-derived growth factor
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PI3KCA	Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform
PR	Progesterone receptor
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
QT	Quimioterapia
RAD50	RAD50 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)
RAD51	RAD51 recombinase
RAD51B	RAD51 Paralog B
RB1	Retinoblastoma 1
RNA	Ribonucleic acid
RPA	Replication protein A

RPC	Resposta patológica completa
SBR	Scarff-Bloom-Richardson
STK1	Ser/Thr kinase 1
TCGA	The cancer genome Atlas
TGF-β	Transforming growth factor beta
TN	Triplo-negativo
TNM	Tumor-Nódulo-Metástase
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VSI	Variante de significado incerto
XBP1	X-box binding protein 1

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Tumor de Mama Triplo-Negativo	5
1.1.1	Aspectos Clínicos	5
1.1.2	Aspectos Moleculares	10
1.1.3	Aspectos Genéticos.....	13
1.2	O Gene BRCA1	14
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo Geral	22
2.2	Objetivos Específicos	22
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Levantamento de amostras	23
3.2	Amplificação das Regiões Alvo e Construção de Biblioteca para Sequenciamento em Larga Escala.....	26
3.3	Sequenciamento	28
3.3.1	Sequenciamento de Alto Desempenho na Plataforma Ion PGM Torrent™ (Life Technologies®)	29
3.3.2	Sequenciamento de Alto Desempenho na plataforma GS Junior™ (Roche®).....	29
3.3.3	Validação das Alterações Pontuais	31
3.4	Análise das Sequências	32
3.5	Análise de Características Demográficas e Clínicas	33
4	RESULTADOS	35
4.1	Seleção de Amostras	35
4.2	Métodos de <i>Target Sequencing</i>	39
4.3	Classificação e Prevalência de Mutação em <i>BRCA1</i>	43
4.4	Variáveis Clínicas e Demográficas.....	50

4.4.1	Análise de Sobrevida	53
5	DISCUSSÃO	60
6	CONCLUSÃO	65
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	66

ANEXOS

- Anexo 1** Adaptação para preparo de biblioteca usando o kit GeneRead Mix-n-Match
- Anexo 2** Condições de PCR para validação por sequenciamento por eletroforese capilar de mutações detectadas por sequenciamento massivo paralelo
- Anexo 3** Purificação dos fragmentos de PCR
- Anexo 4** Reação de sequenciamento por terminação de cadeia
- Anexo 5** Variantes detectadas no gene BRCA1 em amostras provenientes de pacientes portadoras de tumor imunofenótipo triplo-negativo e suas classificações
- Anexo 6** Custo de reagente de preparo de biblioteca usando Ion Ampliseq BRCA1/2 Panel
- Anexo 7** Custo de reagente de preparo de biblioteca usando Ion Generead BRCA1/2 Panel
- Anexo 8** Custo de reagente de preparo de biblioteca usando Haloplex Target Enrichment Kit Custom
- Anexo 9** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo e o mais frequente entre mulheres, excluindo-se os casos de câncer de pele não-melanoma. Dados para o biênio de 2014-2015 estimaram uma incidência de cerca de 57.120 novos casos anuais no Brasil com mais de 13 mil mortes por essa neoplasia (Ministério da Saúde 2014). O principal fator de risco para esse tipo de neoplasia maligna é a idade e sabe-se que o risco aumenta com o passar do tempo. O estilo de vida também demonstra ser de grande relevância para o risco de desenvolvimento de câncer de mama. Obesidade, consumo de álcool e tabaco aumentam o risco do surgimento dessa neoplasia (MCPHERSON et al. 2000).

Fatores de risco englobam ainda a região geográfica, exposição à radiação, desenvolvimento prévio de doença benigna de mama, uso de contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal, além do histórico familiar. Estima-se que 10% dos cânceres de mama são causados por alterações genéticas nas linhagens germinativas, transmitidas na família (PHAROAH et al. 2002), ou seja, atribuídos às síndromes hereditárias. A síndrome hereditária mais importante em câncer de mama é a síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário (HBOC, do inglês, *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*) que apresenta herança autossômica dominante com alta penetrância. No entanto, uma pessoa pode portar e transmitir um gene

anormal sem desenvolver a doença. Os genes mais importantes associados com esta síndrome são *BRCA1* e *BRCA2*, que conferem um risco de 10-30 vezes maior de desenvolver câncer de mama para mulheres com alterações de perda de função nesses genes em relação a população em geral (ANTONIOU et al. 2003). Outros genes com menor prevalência de mutação patogênica, mas que conferem um risco aumentado ao câncer de mama, também foram identificados, como os genes *TP53*, *PTEN* associados com as síndromes de Li-Fraumeni e Cowden, respectivamente (NELEN et al. 1997; OLIVIER et al. 2003; PILARSKI 2009), além de genes como *CDH1*, *STK1*, *BRIP1*, *ATM*, *CHEK2* e *PALB2* entre outros (BELL et al. 1999; LIM et al. 2004; PHAROAH et al. 2001; SEAL et al. 2006; XIA et al. 2006; ZHANG et al. 2011). Um estudo recente, realizado por ANTONIOU et al. (2014), sugere que, ao lado de *BRCA1* e *BRCA2*, o gene *PALB2* é um dos genes mais importantes na susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama, com penetrância equivalente aos dois principais genes, conferindo 35% de chance de surgimento de câncer até os 70 anos nas mulheres com mutação de perda de função nesse gene.

Os genes *BRCA1* (*Breast cancer 1, early onset*) e *BRCA2* (*Breast cancer 2, early onset*) são genes supressores tumorais e a ocorrência de mutações patogênicas germinativas em suas sequências é o fator mais fortemente relacionado ao risco aumentado de câncer de mama familiar. Indivíduos com mutações em um desses genes apresentam 40-80% de probabilidade de desenvolvimento de câncer de mama (FACKENTHAL e OLOPADE 2007). Mutações nesses genes também estão associadas ao

maior risco de outros tipos de câncer, como o de ovário, próstata, pâncreas, estômago e vias biliares (FORD et al. 1994; Breast Cancer Linkage Consortium 1999).

Câncer de mama é uma doença heterogênea em termos de biologia tumoral, progressão e resposta às terapias. Os tumores de mama têm sido classificados com base em seu perfil imunofenotípico e de expressão gênica. Estudos conduzidos com base na análise de perfis de expressão gênica possibilitaram a classificação dos cânceres de mama em 5 padrões principais: luminal A e B, HER2 positivo, *normal-like* e *basal-like* (PEROU et al. 2000; SØRLIE et al. 2001). Os três últimos subtipos são caracterizados pela baixa ou nenhuma expressão de receptores hormonais de estrogênio (ER) e progesterona (PR) bem como de fatores de transcrição característicos do tecido luminal. O subtipo *basal-like* é caracterizado pela alta expressão de citoceratinas basais de alto peso molecular (5, 6 e 17), características das células basais/mioepiteliais, enquanto que o subtipo HER2(+) é marcado pela expressão elevada do gene *ERBB2* (*HER2*). Já o subtipo *normal-like* é caracterizado pela expressão elevada de genes normalmente expressos em tecido adiposo e de outros tipos celulares não epiteliais, além de genes do epitélio basal, com pouca expressão de genes do epitélio luminal. Como o nome sugere, os subtipos luminais têm maior expressão de genes característicos do tecido luminal, além de serem positivos para os receptores hormonais (ER e PR). O grupo luminal A é o que mostra maior expressão de ER, entre outros genes. Já o subtipo luminal B apresenta uma expressão moderada dos genes luminais, bem como de

ER, além de evidenciar níveis mais elevados dos marcadores Ki-67 e/ou HER-2 do que o subtipo luminal A, conferindo um pior prognóstico a essas pacientes (SØRLIE et al. 2001).

Essa classificação proposta foi reproduzida em diferentes coortes (SØRLIE et al. 2003), mantendo a mesma associação com desfecho clínico e com implicações na prática clínica, uma vez que distingue subgrupos que se beneficiariam de hormonioterapia ou inibidores de HER2, como trastuzumabe, daqueles para os quais não há benefício. Dessa forma, o Consenso Internacional de Especialistas de Saint Gallen propôs a classificação baseada em marcadores de imuno-histoquímica (receptores de estrógeno, progesterona, HER2, ki-67) acrescida da análise genômica de amplificação do gene HER2, em substituição a classificação por perfil de expressão gênica. Dessa forma, os tumores de mama são categorizados em luminal A/B, hiperexpressão de HER2 e triplo-negativo (GOLDHIRSCH et al. 2013). Essa classificação vem sendo adotada pela comunidade científica na categorização dos tumores de mama.

Em 2012, um estudo sugeriu uma nova subclassificação em 10 subtipos de câncer de mama, com base em novos dados genômicos. Os pesquisadores analisaram alterações de número de cópias gênicas e níveis de expressão e conseguiram estratificar em 10 subgrupos associados com sobrevida em amostras provenientes de quase 2000 amostras de pacientes diagnosticadas com câncer de mama. Entretanto, ainda existe pouca aplicação clínica para essa nova divisão (CURTIS et al. 2012).

Ainda, outro subtipo de mama denominado *claudin-low* foi proposto por HERSCHKOWITZ et al. (2007) como sendo uma subdivisão dos tumores triplo-negativos, com baixa expressão de proteínas de adesão celular, denominadas claudinas (3, 4 e 7) entre outros marcadores envolvidos na transição epitélio-mesênquima, além de apresentar características de células-tronco. Contudo, o significado biológico e clínico dessa classificação ainda precisa ser elucidado.

A maior parte dos tumores TN é do subtipo *basal-like* (cerca de 80%), assim como a maioria dos tumores basal-like são TN. (BERTUCCI et al. 2008; BERNARD et al. 2009; DE RONDE et al. 2010). Contudo, é importante ressaltar que aproximadamente 20% dos tumores *basal-like* não são TN, o que significa que essas definições não são sinônimas (BERTUCCI et al. 2008; FOULKES et al. 2010).

1.1 TUMOR DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO

1.1.1 Aspectos clínicos

O tumor de mama triplo-negativo (TN) é responsável por aproximadamente 15% de todos os casos de câncer de mama e acomete principalmente mulheres jovens (<40 anos) e de ascendência africana, entre as mulheres norte-americanas. Ele é caracterizado pela ausência de receptores de estrogênio progesterona, além da não expressão e/ou amplificação do gene para o receptor 2 do fator de crescimento epitelial humano (HER2 - do inglês, *Human Epithelial growth factor Receptor 2*)

(CAREY et al. 2006; BAUER et al. 2007; RAKHA et al. 2007). Essas características fazem com que não haja uma terapia específica, uma vez que as terapias hormonal e molecular, efetivas em outros subtipos, não são eficazes para o subtipo TN. Sendo assim, o tratamento é feito através de quimioterapia sistêmica. Além disso, esses tumores tendem a ser maiores que os de outros subtipos e frequentemente são carcinomas invasivos de alto grau (CAREY et al. 2006). O tumor TN demonstra grande agressividade, um padrão metastático com predileção por órgãos sólidos (principalmente pulmão e cérebro) e recorrência do tumor em intervalos menores, embora seja menos frequente o acometimento de linfonodos (RODRÍGUEZ-PINILLA et al. 2006; DENT et al. 2009). Assim, pacientes com tumor TN de mama apresentam um pior prognóstico, com uma sobrevida menor que as demais pacientes diagnosticadas com câncer de mama (LIEDTKE et al. 2008).

Em termos de sobrevida, estudos demonstram uma queda acentuada na porcentagem de pacientes que sobrevivem nos primeiros 3-5 anos, entretanto após esse período o risco de recorrência a distância é baixo, ao ponto que, após 10 anos, é mais comum tumores ER(+) recorrerem que os tumores ER(-) (TISCHKOWITZ et al. 2007; LIEDTKE et al. 2008).

Tendo em vista que a terapia endócrina e o trastuzumabe não trazem benefícios às pacientes diagnosticadas com tumor TN, o padrão de tratamento para essas pacientes consiste em quimioterapia sistêmica. Pacientes com tumor TN apresentam melhor resposta a quimioterapia que as pacientes positivas pra ER (LIEDTKE et al. 2008; COLLEONI et al. 2010). LIEDTKE et al. (2008) observaram uma excelente evolução para as

pacientes TN que foram tratados com quimioterapia neoadjuvante e atingiram resposta patológica completa. Entretanto, aquelas que apresentam doença residual têm uma evolução ruim. Isso sugere que existe um subgrupo de mulheres cujos tumores são extremamente sensíveis a quimioterapia, enquanto que para a maior parte delas o benefício é incerto. Não existe um padrão universal para o tratamento dos tumores TN, contudo há evidências que a adição de taxanos (docetaxel, paclitaxel) à quimioterapia adjuvante baseada em antraciclinas (doxorrubicina, epirrubicina) confere um maior benefício às pacientes TN quando comparadas às pacientes ER(+)/HER2(+) (HAYES et al. 2007).

Pesquisas têm sido realizadas no sentido de estabelecer terapias específicas para o tumor TN. Benefícios no tratamento de tumores TN com cisplatina e carboplatina estão sendo avaliados, baseado no racional de que eles compartilham com os tumores relacionados a *BRCA1*, defeitos no reparo do DNA, o que sensibiliza as células a esses agentes. Dados iniciais sugerem que o tratamento neoadjuvante incluindo cisplatina proporciona altos índices de resposta patológica completa nas pacientes portadoras de mutação em *BRCA1* (BYRSKI et al. 2009) e talvez em pacientes TN (SILVER et al. 2010). Um estudo clínico conduzido por MINCKWITZ et al. (2014) mostrou um aumento de 16% na taxa de resposta patológica completa para as pacientes TN, quando tratadas com a adição de carboplatina ao esquema quimioterápico baseada em doxorrubicina e taxanos. Outro estudo recente testou o benefício do tratamento com carboplatina em adição à doxorrubicina, ciclofosfamida e paclitaxel e

observou uma melhora de 13% na taxa de resposta patológica completa para esse grupo teste (SIKOV et al. 2014). Entretanto, ALBA et al. (2012) não observaram benefício na adição de carboplatina à quimioterapia baseada epirrubicina e taxano no tratamento de tumores TN. Além disso, nesses estudos, a adição de sais de platina foi associada a maior toxicidade, o que tem gerado debate sobre risco-benefício desse tratamento entre alguns oncologistas. Estudos avaliando especificamente as pacientes TN portadoras ou não de mutação em *BRCA1* são necessários para melhor categorização do grupo com maior potencial para esse tipo de tratamento.

Existem ainda estudos que investigam a via do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR – do inglês, *epidermal growth factor receptor*) no tumor de mama TN, pelo fato dessa molécula recorrentemente ser encontrada mais expressa em tumores *basal-like*, e, portanto, em tumores TN. Entretanto, os resultados mostraram melhora apenas discreta entre as pacientes que receberam inibidores de EGFR (CAREY et al. 2012).

Angiogênese é um processo crítico na progressão tumoral e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF – do inglês, *vascular endothelial growth factor*), o qual é um mediador chave desse processo, tem sido encontrado em níveis elevados em tumores de prognóstico ruim, como o TN (MILLER et al. 2007). Anticorpos monoclonais foram testados mostrando melhora em pacientes diagnosticadas com tumor TN (MILLER et al. 2007; GRIFFITHS e OLIN 2012). Entretanto, um estudo randomizado de fase III que recrutou 1290 pacientes TN não mostrou benefício da adição de

bevacizumabe, um inibidor de VEGF, à quimioterapia baseada em antraciclinas e taxanos (CAMERON et al. 2013).

Uma linha de pesquisa particularmente interessante propõe o tratamento de pacientes diagnosticadas com tumor TN metastático e portadoras de mutação patogênica em *BRCA1* com quimioterapia combinada a iniparibe, um agente inibidor da polimerase poli ADP-ribose [PARP – do inglês, *poly (adenosine diphosphate–ribose) polymerase*], proteína essa que também está envolvida na regulação de mecanismos de reparo do DNA. Dessa forma o tratamento com inibidor de PARP induziria uma letalidade sintética nas células mutadas em *BRCA1*. Foi observada uma sobrevida global de 52% dos pacientes tratados com a terapia combinada contra uma taxa de 32% para as que receberam tratamento padrão, sugerindo que os inibidores da PARP podem trazer benefícios clínicos significativos no tratamento do tumor de mama TN (O'SHAUGHNESSY et al. 2011), a depender do status da mutação do gene *BRCA1* nessas pacientes. No entanto, ainda há controvérsias sobre a utilização do iniparibe como inibidor de PARP, uma vez que um estudo de fase III falhou em demonstrar superioridade desse tratamento, provavelmente pelo fato deste fármaco ser um inibidor fraco de PARP, e atuar mais como um modificador não seletivo de inúmeras proteínas envolvidas em processos como apoptose, estresse oxidativo, ciclo celular e reparo do DNA, o que por sua vez, sensibilizaria a célula aos demais agentes citotóxicos (LIU et al. 2012; MATEO et al. 2013; SHAUGHNESSY et al. 2014). Existem ainda outros inibidores de PARP sendo testados em pacientes portadoras de mutação em *BRCA1/2* e câncer

de mama, entre eles olaparibe, o qual tem demonstrado benefício no tratamento em estudos iniciais (41% de taxa objetiva de resposta) (TUTT et al. 2010). Resultados mais definitivos sobre os benefícios de inibidores da PARP no tratamento das pacientes portadoras de mutação em *BRCA1* – e em tumores TN - são promissores e ansiosamente aguardados.

1.1.2 Aspectos moleculares

Apesar da maioria dos tumores TN serem carcinomas ductais invasivos, uma parcela importante deles apresenta tipos histológicos menos comuns, como o medular, metaplásico e o adenoide cístico. Isso reflete a heterogeneidade molecular dos tumores TN que também é observada no desfecho das pacientes (LIVASY et al. 2006; BERTUCCI et al. 2008). Tendo em mente essa heterogeneidade, Lehmann et al. (2011) analisaram os perfis de expressão gênica de 587 tumores TN e identificaram 6 grupos biologicamente diferentes: *basal-like* 1 e 2, imuno-modulador, *mesenchymal-like*, *mesenchymal stem-like*, e luminal receptor de andrógeno.

Os subtipos *basal-like* 1 e 2 foram caracterizados com expressão aumentada de genes relacionados a ciclo e proliferação celular e resposta de dano ao DNA. Enquanto o *basal-like* 1 mostrou maior envolvimento de vias de resposta a dano de DNA (*BRCA1*), o subtipo *basal-like* 2 apresentou grande expressão de genes relacionados a sinalização de fatores de crescimento (*EGFR*, Wnt/ β -catenina). Além disso, ambos os subtipos demonstraram acentuada proliferação celular, o que foi corroborado pela

boa resposta a agentes anti-mitóticos (taxanos), apresentada pelas pacientes desses grupos (LEHMANN et al. 2011).

O subgrupo imuno-modulador (IM) exibiu genes relacionados com processos de resposta imune celular, como sinalização, citocinas, processamento e apresentação de antígeno e transdução de sinal, além de estar associado a tumores medulares. Boa parte das amostras que foram classificadas como IM foram micro-dissecadas, o que sugere que o padrão de expressão gênica observado deve-se de fato às células neoplásicas e não a presença de infiltrado inflamatório no tumor (LEHMANN et al. 2011).

Já os subtipos *mesenchymal-like* (ML) e *mesenchymal stem-like* (MSL) apresentaram em comum enriquecimento de genes envolvidos em processos de motilidade e diferenciação celular. Contudo, alguns componentes da sinalização de fatores de crescimento foram especificamente associados ao subtipo MSL (incluindo *EGFR*, *PDGF*, *TGF- β*), além de marcadores de transição epitélio-mesênquima e de angiogênese (*VEGF*, entre outros). Ainda, o subtipo MSL demonstrou baixos níveis de expressão de genes de proliferação celular acompanhando de aumento de expressão de genes associados a células-tronco. Curiosamente, tanto os tumores ML quanto MSL mostraram associação com carcinoma metaplásico, de histologia pouco diferenciada. Além disso, o MSL apresentou padrão de expressão gênica semelhantes aos tumores *claudin-low*, que tem baixa expressão de claudinas e citoceratinas, além de enriquecimento de componentes associados à transição epitélio-mesênquima (LEHMANN et al. 2011).

Por fim, o subtipo luminal receptor de andrógeno (LRA) é caracterizado pelo enriquecimento de vias de síntese de esteroides, metabolismo de porfirina e metabolismo de andrógeno/estrógeno, mesmo sendo composto de tumores ER(-). Provavelmente, esse padrão de expressão gênica se deve ao aumento de expressão do receptor de andrógeno, que foi encontrado 9 vezes mais expresso no LRA que nos outros subtipos. Além disso, o subtipo LRA apresenta enriquecimento de genes de padrão luminal, como *FOXA1*, *KRT18* e *XBP1* (LEHMANN et al. 2011).

Estudos de análise de expressão gênica, embora informativos, têm um alto custo, o que limita sua aplicação na clínica. Sendo assim, marcadores de imuno-histoquímica vêm sendo propostos como substitutos às classificações de expressão gênica. A classificação mais usada para definir os tumores basal-like, por exemplo, inclui a negatividade para receptores de estrógeno, progesterona e HER2, positividade para citoceratinas basais (5/6, 14 e 17), EGFR e KIT (NIELSEN et al. 2004; RAKHA et al. 2009). Entretanto, não existe um consenso de um painel de marcadores de imuno-histoquímica para classificar os tumores TN, o que atesta a complexidade molecular desses tumores e a dificuldade de associação dessas características com desfecho das pacientes (FULFORD et al. 2007; JUMPPANEN et al. 2007).

1.1.3 Aspectos genéticos

Dados do projeto Atlas do Genoma do Cancer (TCGA – The Cancer Genome Atlas) integrando diversas abordagens que incluem detecção de variações de número de cópias de DNA genômico, metilação do DNA, sequenciamento de exoma, arranjos de RNA mensageiro, sequenciamento de micro-RNA e arranjos de proteína de fase-reversa têm contribuído para o entendimento das bases moleculares dos tumores TN. A maior parte dos eventos de perda de função está associada a genes envolvidos na maquinaria de reparo de DNA. Por outro lado, eventos de ganho de função mostraram associação com genes envolvidos na via de sinalização de fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (The Cancer Genome Atlas Network et al. 2012). A ativação aberrante dessa última, acontece principalmente por perda de reguladores negativos, como *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*), ou mutações ativadoras na subunidade α de PI3K (*PI3KCA*), entre outros genes da via PI3K/AKT/mTOR (SAAL et al. 2005). Já as alterações na maquinaria de reparo de DNA envolvem perda de função em *TP53*, *RB1* e *BRCA1* (ANDRE et al. 2009; The Cancer Genome Atlas Network et al. 2012).

Estudos têm mostrado que no tumor de mama TN a mutação germinativa do gene *BRCA1* é a mais frequente, seguido de genes como *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*, *PTEN*, *CHECK2* entre outros (FOULKES et al. 2003; SØRLIE et al. 2003; LAKHANI et al. 2005; ATCHLEY et al. 2008; GONZALEZ-ANGULO et al. 2011; LIPS et al. 2013; COUCH et al. 2014). Estima-se que 70% das mulheres portadoras de mutação germinativa em

BRCA1 desenvolvem tumor TN e que, dentre as mulheres portadoras de tumor TN (não selecionadas por idade ou histórico familiar) de 10-20% tenham mutação germinativa em *BRCA1* (GONZALEZ-ANGULO et al. 2011; MAVADDAT et al. 2012; RUMMEL et al. 2013). Evidências mostram, também, que tumores TN apresentam outras alterações genéticas, como alterações em número de cópias gênicas e perda de heterozigidade, de maneira similar aos tumores relacionados à mutação em *BRCA1* (HA et al. 2012; SHAH et al. 2012).

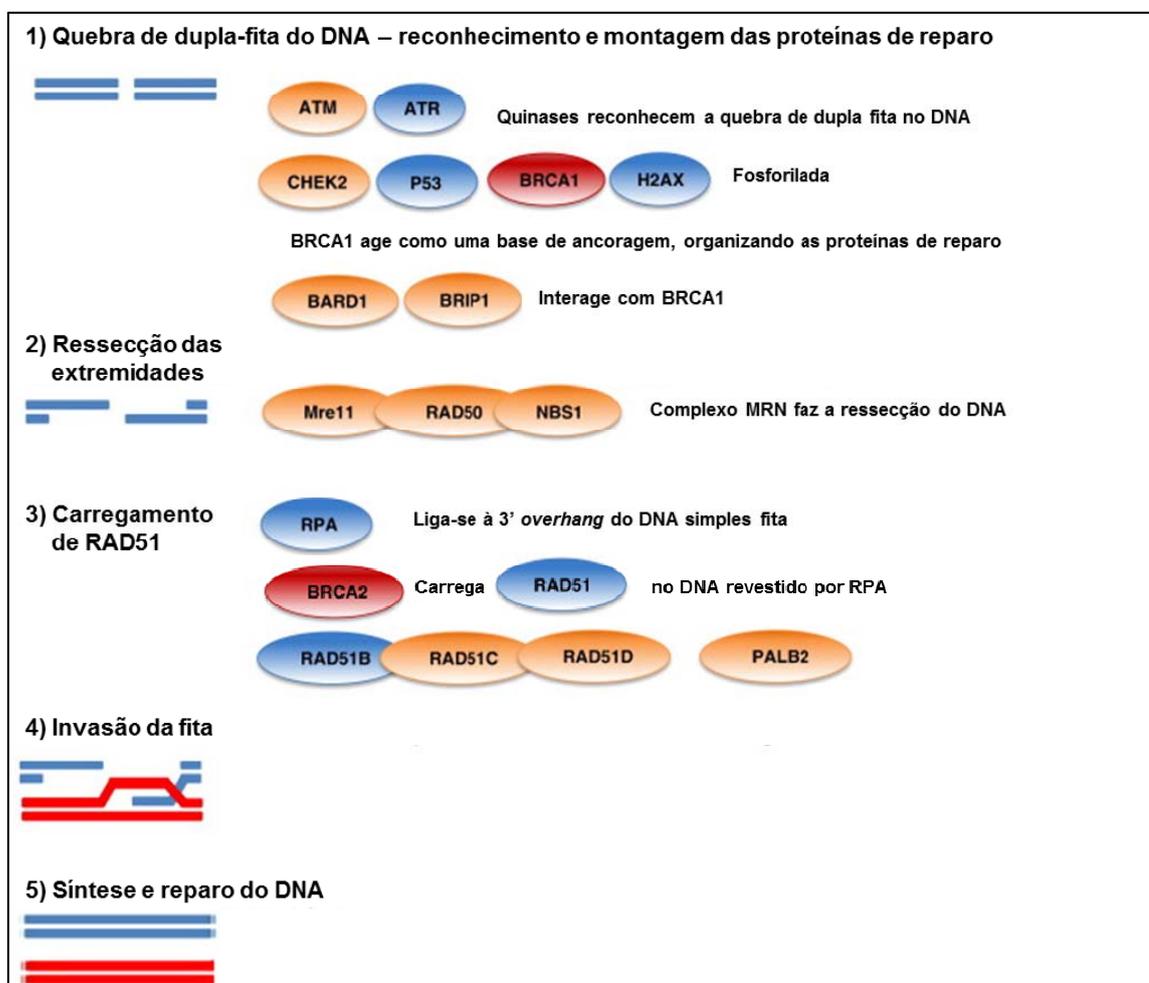
Um estudo do nosso grupo avaliou por sequenciamento os genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* em 54 pacientes com menos de 35 anos e portadoras de câncer de mama. Metade daquelas que foram diagnosticadas com tumor TN eram portadoras de mutação germinativa no gene *BRCA1*. Quando, associado ao diagnóstico de tumor TN, havia história familiar de câncer de mama hereditário houve um aumento na taxa de detecção de mutação para 80% (CARRARO et al. 2013). Os autores sugerem que as mulheres jovens portadoras de tumores TN estão em risco de serem portadoras de mutação germinativa em *BRCA1*, ou seja, diagnóstico de tumor TN em mulheres brasileiras jovens parece ser fator de risco para mutação no gene *BRCA1*.

1.2 O GENE BRCA1

O gene *BRCA1* encontra-se localizado no braço longo do cromossomo 17 e é composto por 24 éxons, sendo que 22 deles são

responsáveis por codificar uma proteína de 1863 aminoácidos (MIKI et al. 1994). A proteína BRCA1 está envolvida em diversas funções celulares, participando da manutenção da integridade cromossômica, regulação transcricional de genes envolvidos no reparo do DNA, controle do ciclo celular e apoptose (YOSHIDA e MIKI 2004). Uma das funções mais importantes de BRCA1 no sistema de reparo do DNA, é o processo de recombinação homóloga. Basicamente, a recombinação homóloga é o principal e mais eficiente recurso utilizado pelas células para reparo de quebra de dupla fita (QDF) do DNA, que é uma lesão muito ameaçadora ao material genético célula, pois ambas as fitas do DNA estão comprometidas ao mesmo tempo, podendo ocasionar rearranjos e instabilidade genômica (CAESTECKER e VAN DE WALLE 2013). Esse processo envolve cinco etapas principais. A primeira é reconhecimento da QDF do DNA, mediado pelas quinases ATM e ATR, que fosforilam e recrutam as proteínas *downstream* da via (CHEK2, TP53, BRCA1, H2AX, entre outras). Há o recrutamento de BRCA1, a qual, por sua vez, é auxiliada por BARD1 e BRIP1 na formação de uma plataforma de ancoramento (*scaffold*) que organiza a montagem das outras proteínas envolvidas no reparo. Na segunda etapa, o complexo MRN (formado por Mre11, RAD50 e NBS1) faz a ressecção das extremidades da QDF. Na terceira etapa, ocorre o carregamento das fitas ressecadas de DNA (agora simples fita) com RAD51. A proteína RPA se liga às extremidades 3' *overhang* da fita simples, revestindo-a. Em seguida, BRCA2, com auxílio de PALB2, recruta RAD51 e faz o carregamento de RAD51 na extremidade revestida, com a participação

de RAD51B, RAD51C e RAD51D. A quarta etapa é a invasão da fita homóloga de DNA, mediada por RAD51, fazendo o pareamento da região danificada com a região complementar íntegra da cromátide-irmã, que serve como molde na quinta e última etapa, que é a síntese e reparo do DNA (WALSH 2015). A Figura 1 representa essa etapas. Dessa forma, BRCA1, através de interações com várias proteínas, orchestra o processo de recombinação homóloga.



Fonte: Adaptado de WALSH (2015)

Figura 1 - Representação do reparo de quebra de dupla fita de DNA por recombinação homóloga.

Sendo assim, alterações na sequência do gene *BRCA1* podem conduzir a uma perturbação das funções normais da proteína, favorecendo instabilidade genômica e mutações em geral, as quais, uma vez acumuladas, podem levar a um quadro patológico, como o câncer. Mutações no gene *BRCA1* têm sido amplamente estudadas visando estabelecer correlações entre essas alterações e câncer de mama e outros tipos (CHENEVIX-TRENCH et al. 2006).

Mutações patogênicas germinativas em *BRCA1* são responsáveis por uma parcela significativa de casos de câncer de mama familiar e de 5-10% dos cânceres de mama como um todo (FORD et al. 1998) e são identificadas ao longo de toda região codificadora do gene. As mutações patogênicas compreendem, em sua maior parte, mutações pontuais (de uma ou poucas bases), sendo que a maioria dessas leva a formação de códon de parada prematuro, e, portanto, a uma proteína truncada. Entretanto, uma parcela significativa das mutações pontuais observadas são alterações que ocasionam a troca de um único aminoácido (mutações *missense*) e que podem ou não apresentar caráter patogênico, diferentemente das mutações *nonsense* ou pequenas inserções e deleções que mudam a matriz de leitura, as quais, em última análise, culminam na geração de uma proteína truncada, e, portanto, são sempre classificadas como patogênicas. A classificação de patogenicidade das alterações *missense* é mais desafiadora e baseia-se em modelos computacionais de predição bem como em ensaios bioquímicos e biológicos para determinação do impacto dessas mutações na proteína

(CHENEVIX-TRENCH et al. 2006; MILLOT et al. 2012; CARVALHO et al. 2014).

Alteração em número de cópias do gene *BRCA1* também é um evento genômico que pode levar a uma perda de função da proteína, o que por sua vez, predispõe ao surgimento de câncer de mama (MAZOYER 2005). Embora seja um evento mais raramente observado, diversos pesquisadores têm relatado grandes rearranjos genômicos que levam a variações na dosagem gênica de *BRCA1* em mulheres portadoras de câncer de mama (LIM et al. 2007; PYLKÄS et al. 2008; FACHAL et al. 2014; RUDNICKA et al. 2014; SEONG et al. 2014; VILLARREAL-GARZA et al. 2015).

Embora na maior parte das populações as mutações patogênicas sejam encontradas ao longo do gene, mutações específicas foram reportadas com incidência elevada em certos grupos étnicos e/ou geográficos, denominadas mutações fundadoras, e que conferem um risco elevado de desenvolvimento de câncer nos portadores. Um exemplo são as mutações c.3450delCAAG e c.5382insC, associadas com a população de judeus Ashkenazi e também observadas em mulheres brasileiras diagnosticadas com câncer de mama (LOURENÇO et al. 2004; DA COSTA et al. 2008; EWALD et al. 2011; DILLENBURG et al. 2012; ASHTON-PROLLA e VARGAS 2014; SILVA et al. 2014).

No Brasil, o número de estudos sobre câncer de mama hereditário que estudaram mutação germinativa em *BRCA1* não é grande e as frequências de mutação patogênica observadas diferem significativamente. Essa divergência reside principalmente pelos diferentes critérios de inclusão

e pela metodologia utilizados em cada estudo. DUFLOCH et al. (2005) estudaram uma coorte brasileira de 31 pacientes diagnosticados com câncer de mama e com histórico familiar positivo utilizando o ensaio de conformação de polimorfismo em filamento único (SSCP, do inglês, *Single-strand conformation polymorphism*) seguido de sequenciamento Sanger nas amostras alteradas e observaram que 13% dos pacientes eram portadores de mutação germinativa em *BRCA1* (éxons 2, 3, 5, 11 e 20).

Outro estudo brasileiro realizou o rastreamento de mutações germinativas em *BRCA1* em mais de 600 pacientes referidos como de médio e alto risco para o desenvolvimento de câncer de mama e ovário, entretanto empregando uma combinação do Teste de Proteína Truncada (PTT) e sequenciamento Sanger para avaliar toda a região codificante do gene. Os pesquisadores encontraram uma prevalência de mutação germinativa em *BRCA1* de apenas 2,9% nesses pacientes (ESTEVEZ et al. 2009). GOMES et al. (2007) analisaram através de uma mistura de técnicas (Rapid multiplex PCR para mutações fundadoras, PTT para exon 11 e sequenciamento completo Sanger para pacientes com forte histórico familiar e negativos para mutações nas técnicas anteriores) outra coorte brasileira de 402 pacientes diagnosticados com câncer de mama, porém não selecionados por histórico familiar ou risco, e verificou que apenas 1,5% dos pacientes tinha mutação germinativa em *BRCA1*. O PTT, usado nos dois estudos anteriores, não tem sensibilidade para detectar mutações patogênicas *missenses*, podendo somente identificar mutações que induzem a formação de códon de parada

premature, sendo esta, provavelmente uma das razões para a baixa frequência de mutação patogênica detectada nas duas análises.

Um recente estudo do grupo, um dos mais informativos em termos da sensibilidade das abordagens usadas, também rastreou mutações germinativas nesse gene em mulheres brasileiras que preenchem critério para a Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário (HBOC). O sequenciamento das regiões codificadoras do gene e dos limites éxon e intron detectou mutação patogênica em *BRCA1* em 16,5% (20/120) das pacientes. Ainda neste estudo, SILVA et al. (2014) avaliaram a dosagem gênica em *BRCA1* e reportaram a ocorrência de variação em número de cópias em 2 (1,6% - 2/120) casos de mulheres que preenchem critérios para HBOC: uma deleção envolvendo exon 16 e 17 e outra amplificação do exon 24. Dessa forma, esse dados sugerem que mulheres com critérios clínicos que demonstram risco de terem mutação em *BRCA1* devem ser testadas para mutação pontual e também para rearranjos nesse gene. Outro estudo do grupo, o único que levou em consideração o imunofenótipo dos tumores desenvolvidos por pacientes brasileiras ou a prevalência de mutações somáticas, foi realizado em pacientes diagnosticadas com câncer de mama em idade inferior a 35 anos. Nesse estudo foi usado somente sequenciamento passível de identificar mutações pontuais e encontrou-se uma prevalência de 13% (7/54) de mutação germinativa em *BRCA1* (CARRARO et al. 2013) e quando analisadas somente as pacientes imunofenótipo TN essa taxa foi de 50% (5/10). Para uma melhor caracterização da ocorrência de mutação em *BRCA1*, seja ela de ordem

germinativa ou somática, na população brasileira são necessários mais estudos nos diferentes subtipos de tumores de mama.

Além disso, silenciamento do gene *BRCA1* através da metilação da região promotora está presente em 13-25% dos casos de cânceres de mama esporádicos como um todo (ESTELLER et al. 2000; XU et al. 2013) e de 21-37% nos tumores TN ou *basal-like* (MATROS et al. 2005; LIPS et al. 2013; XU et al. 2013).

Dada a grande associação entre mutação em *BRCA1* e tumores do subtipo triplo-negativo, grande interesse tem sido demonstrado por vários grupos na melhor caracterização desta associação (FOULKES et al. 2003; GONZALEZ-ANGULO et al. 2011; HARTMAN et al. 2012; GREENUP et al. 2013). Recentemente, LIPS et al. (2013) avaliaram uma coorte de 377 pacientes holandesas diagnosticadas com tumores de mama triplo-negativo e constataram que 24% das pacientes portavam mutação germinativa no gene *BRCA1*. Ainda, este estudo constatou que os tumores com outras alterações genéticas e epigenéticas nesse gene - como alteração de número de cópias e metilação de região promotora – se assemelhavam aos tumores relacionados à mutação germinativa no gene *BRCA1*, apresentando características clinico-patológicas semelhantes, como menor idade ao diagnóstico e grau histológico 3. Dessa forma, este estudo ressalta a importância de avaliarmos a prevalência de mutação em *BRCA1* em tumores de mama TN em diferentes idades na população brasileira, além de verificar possíveis associações com características demográficas e clínicas das pacientes na nossa população.

2 OBJETIVOS

2.2 OBJETIVO GERAL

Investigar a prevalência de mutações somática e germinativa no gene *BRCA1* em mulheres portadoras de tumores TN e associar a presença de mutação com características demográficas, clínicas e de resposta às terapias.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a prevalência de mutação no gene *BRCA1* em amostras de DNA de tumores TN, utilizando sequenciamento paralelo massivo por *Target sequencing*, comparando as plataformas Ion PGM Torrent e 454 GS Junior.
2. Avaliar a prevalência de mutações germinativas em amostras de DNA extraído de leucócitos ou do tecido normal adjacente, nos casos positivos para mutação no tecido tumoral.
3. Associar mutações em *BRCA1* com informações demográficas, clínicas e de resposta terapêutica das pacientes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LEVANTAMENTO DE AMOSTRAS

Esse projeto teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center (Nº1746/13B – Anexo 9) e está vinculado ao projeto temático aprovado pela FAPESP processo nº2013/23277-8. As amostras foram levantadas a partir de busca no portal Biobank, disponível na intranet do A.C.Camargo Cancer Center. Para a triagem inicial utilizou-se os critérios “amostra de DNA”, “tecido congelado”, “neoplasia maligna de mama (CID10, C50)”, “tumor primário”, diagnosticadas entre os anos 2000-2014. Após essa etapa, as amostras foram checadas individualmente em prontuário eletrônico, disponível nas ferramentas MV2000 e H²TC da instituição, para confirmação do subtipo tumoral nos laudos anatomopatológicos das respectivas pacientes. Foram excluídos casos de câncer de mama masculino, casos em que a informação do imunofenótipo não estava disponível e aquelas pacientes para as quais não havia amostras ou DNA de tecido tumoral congelado disponível no banco de tumores. Foram incluídas no estudo amostras para as quais os laudos indicavam negatividade completa (0%) de marcação das células neoplásicas por imuno-histoquímica tanto para os receptores hormonais (HR) - receptor de estrógenos (ER) como progesterona (PR) - e com score 0+/1+ para HER2. Para as HR(-) e HER2 score 2+ foram incluídas somente aquelas com razão

de amplificação do gene *HER2* por FISH <2,2. Assim, somente as amostras negativas para os três marcadores foram incluídas. A identificação de todas as pacientes levantadas foi encaminhada para um patologista da área (Dr. Victor Piana de Andrade) para que fosse feita uma revisão dos casos. Dados clínicos foram coletados a partir dos prontuários eletrônicos e serão apresentados adiante nesse trabalho. As amostras de DNA foram extraídas do tecido tumoral/não-neoplásico congelado pelo banco de macromoléculas do A.C.Camargo Cancer Center.

Em um primeiro momento foram analisadas as amostras de DNA de tecido tumoral em busca de mutações. Confirmada a mutação no tumor, esta foi validada por sequenciamento capilar e avaliada na amostra de DNA purificada do tecido mamário não neoplásico ou de leucócitos, visando categorizá-la como mutação germinativa ou somática.

O fluxograma abaixo apresenta as etapas do projeto com detalhes.

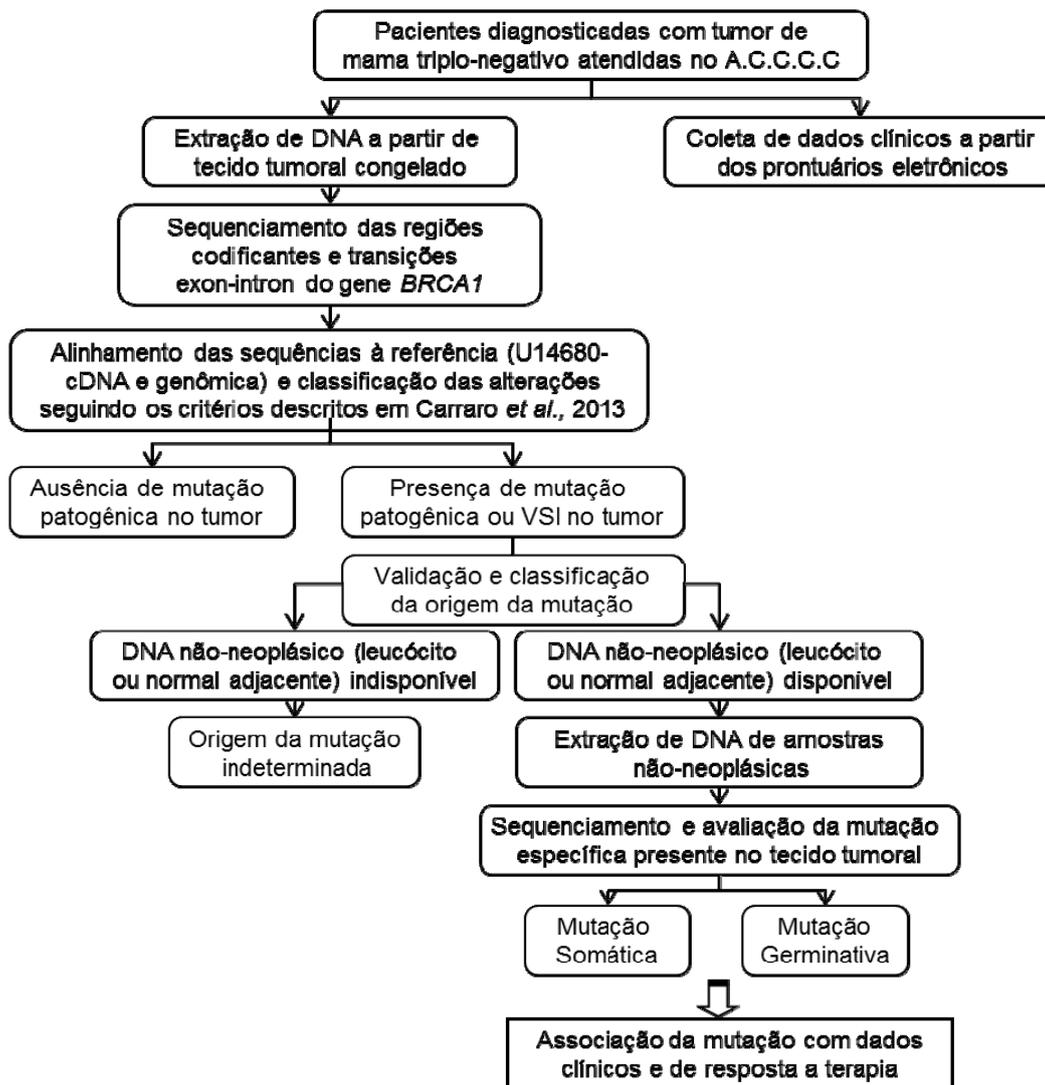


Figura 2 - Delineamento do estudo. A.C.C.C.C= A.C. Camargo Cancer Center; VSI= Variante de Significado Incerto.

3.2 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES ALVO E CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECA PARA SEQUENCIAMENTO EM LARGA ESCALA

Nesse projeto avaliamos algumas estratégias de sequenciamento paralelo de múltiplos alvos (*Target sequencing*) disponíveis comercialmente. A captura das sequências alvo pode ser feita através de amplificação por multiplex (Ampliseq™ da Life Technologies® ou GeneRead™ da Qiagen®) ou captura por sonda (Haloplex™ da Agilent®). Esses métodos foram avaliados comparativamente a fim de estabelecer qual o mais adequado para ser utilizado como metodologia padrão do projeto. A comparação dos métodos considerou aspectos como porcentagem de cobertura dos alvos e o tempo e praticidade no preparo das amostras.

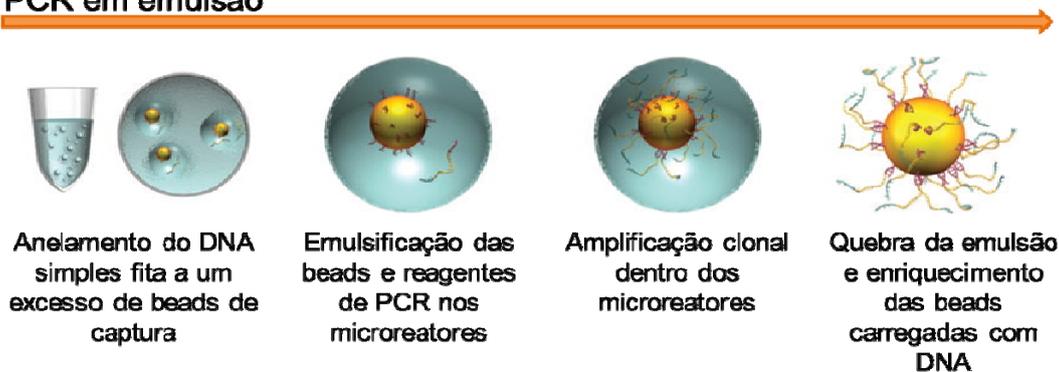
Os sistemas Ampliseq™ e GeneRead™ baseiam se em PCR multiplex, na qual há um pool de *primers* que possibilitam a amplificação de sequências alvo múltiplas a partir da amostra de DNA. Em seguida, é necessária a inserção de moléculas adaptadoras e de *barcodes* que identificam as sequências que serão analisadas no sequenciamento, etapa denominada de confecção de biblioteca de amplicons. Os experimentos foram feitos seguindo as recomendações dos fabricantes (Ion AmpliSeq™ Library Preparation User Guide, Publication Part Number MAN0006735, Revision 4.0 para o kit Ampliseq; e GeneRead DNAseq Gene Panel Handbook 11/2012, com adaptações descritas em “Anexo 1” para o kit GeneRead)

Já no sistema HaloPlex™ ocorre a fragmentação do DNA da amostra com enzimas de restrição e subsequente desnaturação. Em seguida, são adicionadas sondas previamente desenhadas que hibridizam especificamente nas sequências alvo, formando estruturas circulares de DNA. As sondas são biotinizadas e os fragmentos alvo podem ser recuperados através de *beads* de estreptavidina magnéticas que separam somente as sequências circulares, as quais contêm a região alvo. A seguir, ocorre a reação de ligação, específica para sequências perfeitamente hibridizadas. Por fim, ocorre a amplificação das sequências alvo circulares, fornecendo produtos de amplificação enriquecidos e marcados por *barcodes* prontos para o sequenciamento. Todas essas etapas foram feitas conforme o manual do fabricante (HaloPlex Target Enrichment System-ION, versão D.4, maio 2013)

Após o preparo da biblioteca pelos diferentes kits apresentados acima, foi realizada a PCR em emulsão. Nessa etapa, *beads* microscópicas contendo fragmentos de fita simples complementares aos adaptadores inseridos no preparo de biblioteca são adicionadas a uma solução oleosa, formando uma emulsão, que também contém os demais reagentes da PCR. Nessa solução, ocorre a formação de microgotículas contendo cada uma delas idealmente apenas uma *bead* ligada a uma única sequência de DNA. Essas gotículas formam o micro-reator onde ocorre a reação de amplificação, gerando uma *bead* com centenas de sequências fixadas a ela ao final do processo (Figura 3). Com a finalidade de evitar que mais de um fragmento de DNA seja inserido em uma mesma *bead* - gerando *beads*

policlonais – é utilizada uma quantidade de *beads* muito superior à quantidade de DNA. Assim, grande parte das *beads* permanece “vazia” durante a PCR e, portanto, é necessário realizar o enriquecimento das amostras para selecionar apenas as *beads* que contêm DNA ligado, deste modo aperfeiçoando o desempenho da reação de sequenciamento.

PCR em emulsão



Fonte: Adaptado de MARDIS (2008)

Figura 3 - Representação da PCR em emulsão.

3.3 SEQUENCIAMENTO

Para o sequenciamento, utilizamos na fase inicial uma estratégia combinada entre as plataformas Ion PGM Torrent™ da Life Technologies® e 454-GS Junior™ da Roche®. Essa abordagem em paralelo entre as duas plataformas permite uma validação adjacente das informações encontradas, bem como uma análise do desempenho das duas plataformas. Na plataforma Ion PGM Torrent é possível realizar um sequenciamento com menor custo, entretanto erros na detecção, principalmente de deleções e inserções, são passíveis de ocorrer. O sequenciamento na plataforma 454-

GS Junior, embora seja um processo mais oneroso, garante uma maior confiabilidade na sequência gerada. Dessa forma, mutações putativas nas sequências detectadas em ambas as plataformas podem ser confirmadas com grande acuidade.

3.3.1 Sequenciamento de Alto Desempenho na Plataforma Ion PGM Torrent™ (Life Technologies®)

Para o sequenciamento na plataforma Ion PGM Torrent™ utilizamos o *Ion Sequencing 200 Kit* (Life Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante, que permite o sequenciamento de fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases. A reação de sequenciamento é feita em chips, Ion 314™, Ion 316™ e Ion 318™ Chips, capazes de gerar uma quantidade de dados de até 100 Mb, 1GB e 2GB de sequências respectivamente. O sequenciador baseia-se na detecção de alterações no pH da solução para realizar o sequenciamento, uma vez que quando há a incorporação de uma base, uma molécula de hidrogênio é liberada, alterando assim, o pH da solução.

3.3.2 Sequenciamento de Alto Desempenho na plataforma GS Junior™ (Roche®)

Com a finalidade de evitar custos elevados ao estudo desenvolvemos um método para adaptar a biblioteca desenhada para o sequenciamento na plataforma Ion PGM Torrent permitindo que ela seja sequenciada na plataforma 454 GS Junior, evitando assim a necessidade de preparar 2

bibliotecas para a mesma amostra. A técnica consiste em inserir a sequência dos adaptadores do 454 nas sequências contendo adaptadores específicos do Ion PGM Torrent por meio de uma PCR, utilizando-se *primers* específicos fusionados: o *primer* 454A-P1tr contém a sequência do adaptador 454-A seguida de sequência complementar ao adaptador Ion-P1 e o *primer* 454B-A contém a sequência do adaptador 454-B seguida de sequência complementar ao adaptador Ion-A (Quadro 1). Após 8 ciclos de PCR, os fragmentos preparados inicialmente para sequenciamento na plataforma Ion PGM Torrent podem ser encaminhados para a PCR em emulsão e serem sequenciados na plataforma GS Junior (Figura 4).

Quadro 1 - Sequência dos *primers* fusionados adaptados para a plataforma 454 GS Junior

<i>Primer</i>	Sequência
Ion A	5'-ccatctcatccctgctgtctccgactcag 3'
Ion P1	5'-cctctctatgggcagtcggtgat 3'
454A-P1tr	5' <i>cg</i> tatcgctccctcgcgccatcag cctctctatgggcagtcggtgat 3'*
454B-A	5' <i>ctatg</i> cgcttgccagcccgctcag ccatctcatccctgctgtctccgactcag 3'*

* Os nucleotídeos em negrito correspondem à região de complementariedade dos *primers* 454 aos adaptadores Ion. Os nucleotídeos em itálico correspondem a sequência dos adaptadores 454 que são inseridos à biblioteca.

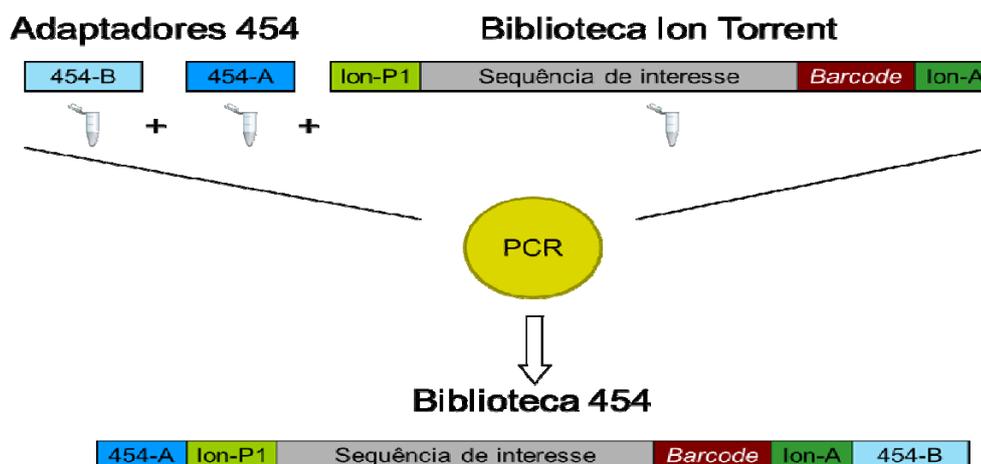


Figura 4 - Construção de biblioteca para 454 GS Junior adaptada a partir da biblioteca Ion Torrent.

Esse processo permite a reamplificação dos fragmentos gerados pelos kits de preparo de biblioteca para o Ion com inserção do adaptador do 454 para posterior sequenciamento e validação de alterações constatadas entre as plataformas. Dessa forma, artefatos das reações de sequenciamento podem ser descartados garantindo boa acuidade dos dados. Sequenciamos bibliotecas adaptadas de 8 pacientes em uma única corrida obtendo uma cobertura média de 180x por paciente, com a possibilidade de ampliar para 10 pacientes por corrida com profundidade de cobertura satisfatória (superior a 100x).

3.3.3 Validação das alterações pontuais

Mutações pontuais detectadas em amostras tumorais nos sequenciadores de nova geração foram validadas por sequenciamento automático por eletroforese capilar no equipamento ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems), utilizando-se o método dideoxi com o kit BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Fragmentos correspondentes às regiões com a variante foram amplificados por PCR e aqueles verificados em banda única por eletroforese em gel de agarose 1% seguiram para as reações de purificação (Exo-Sap) e sequenciamento (para maiores detalhes dessa metodologia, ver “Anexos 2-4”). Uma vez confirmada a mutação no tecido tumoral, o próximo passo foi o sequenciamento da mesma região empregando-se essa metodologia em amostras de DNA provenientes de tecido não neoplásico (leucócitos ou tecido normal adjacente) para determinação da origem da mutação, somática ou germinativa.

3.4 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

As análises das sequências geradas foram realizadas através do programa *CLC Genomics Workbench 6.5* (CLCBio), que permite analisar sequências provenientes dos equipamentos GS Junior e Ion PGM Torrent, possibilitando análises comparativas das duas plataformas, além da comparação com as sequências referências do gene *BRCA1* (U14680). Num primeiro momento as leituras produzidas pelo sequenciamento são carregadas no programa que faz a remoção das sequências (trimagem) dos adaptadores específicos do Ion Torrent e a identificação das amostras de acordo com o *barcode* presente. Para as bibliotecas adaptadas do Ion Torrent para o 454 GS Junior é necessária uma etapa extra de remoção dos adaptadores específicos do 454 antes desse processo. A próxima etapa é o alinhamento entre as sequências obtidas da amostra do paciente e a sequência genômica disponível no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), etapa essa que é chamada mapeamento ou alinhamento (Referências U14680 e NG_005905.2, sequências do cDNA e gene completo respectivamente). Em seguida é feita a busca de alterações, sendo as principais variações esperadas as alterações de base, promovendo alteração de aminoácido, e inserções ou deleções, que alteram o quadro de leitura. Para a chamada de variantes foram utilizadas regiões do gene representadas por pelos menos 20 leituras, sendo que a variante deveria corresponder a pelo menos 5% das

leituras para aquela posição, bem como estar representadas em leituras das 2 direções.

Recentemente, a Life Technologies® lançou o software Ion Reporter 4.2™, o qual inclui algoritmos para chamada de variantes otimizados para sequências produzidas a partir da tecnologia Ion Torrent. Uma das vantagens seria o aperfeiçoamento das análises para fins diagnósticos, diminuindo a dificuldade de interpretação dos dados, principalmente para laboratórios de que executam testes genéticos. Com a finalidade de testar a confiabilidade desse software comparamos as análises feitas no CLC Genomics Workbench com as geradas no Ion Reporter, analisando a concordância entre as chamadas de variantes executadas para o gene *BRCA1* e levando em consideração aspectos como rapidez, sensibilidade e especificidade, além de uma interface amigável.

3.5 ANÁLISE DE CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS

Os dados referentes ao *status* mutacional das pacientes foram correlacionados com as características clínico-patológicas das pacientes e seus tumores segundo os seguintes critérios: idade, história familiar, tamanho do tumor, número de linfonodos axilares acometidos, invasão vascular, linfática e perineural, grau nuclear, grau histológico de Scarff-Bloom-Richardson (SBR), TNM (Tumor-Nódulo-Metástase), além das citoceratinas 5, 6 e 14, expressão de EGFR, e status de p53 e p63.

As pacientes também foram avaliadas quanto à presença de recidiva e metástase, realizando-se a análise de sobrevida global (intervalo entre o diagnóstico patológico e a ocorrência de óbito por qualquer causa - as pacientes vivas foram censuradas no último seguimento) e sobrevida livre de recorrência (intervalo entre diagnóstico patológico e ocorrência de recidiva locorregional ou à distância - as pacientes que faleceram sem recorrência foram censuradas no último seguimento), sendo que as pacientes com metástase ao diagnóstico foram analisadas separadamente, avaliando-se sobrevida livre de progressão em substituição à sobrevida livre de recorrência (intervalo entre o diagnóstico da metástase e a ocorrência de morte por qualquer causa ou progressão de doença - as pacientes vivas e sem progressão de doença foram censuradas no último seguimento). Com a colaboração do Dr. Vladimir Claudio Cordeiro de Lima, do departamento de Oncologia Clínica, analisamos, ainda, o tipo de terapia adotada, como quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante e radioterapia.

Para o teste de associação entre variáveis categóricas foi utilizado o método estatístico X^2 ou teste exato de Fischer. As curvas de sobrevida foram calculadas conforme método de Kaplan-Meier, utilizando o teste de Log-rank para avaliação do impacto das variáveis analisadas nas sobrevidas. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO DE AMOSTRAS

Na etapa de busca de amostras tumorais identificamos 131 tumores de mama do subtipo triplo-negativo dentre as 1620 amostras de tumores de mama do A.C.Camargo Cancer Center pesquisadas, sendo portanto considerado um estudo com amostras de conveniência de uma única instituição. As amostras são referentes às pacientes diagnosticadas entre os anos de 2000-2014. Amostras cujas pacientes foram inicialmente diagnosticadas em outros serviços oncológicos, suas biopsias foram analisadas em relação a morfologia e classificação imunofenotípica no departamento de Anatomia Patológica no A.C.Camargo Cancer Center, como parte da rotina da instituição. Sendo assim, vieses relacionados a diferenças de protocolos e análise dos ensaios de imuno-histoquímica foram minimizados, pois todos os casos foram analisados conforme o padrão do departamento. A figura 5 ilustra a seleção das amostras que foram incluídas nesse estudo.

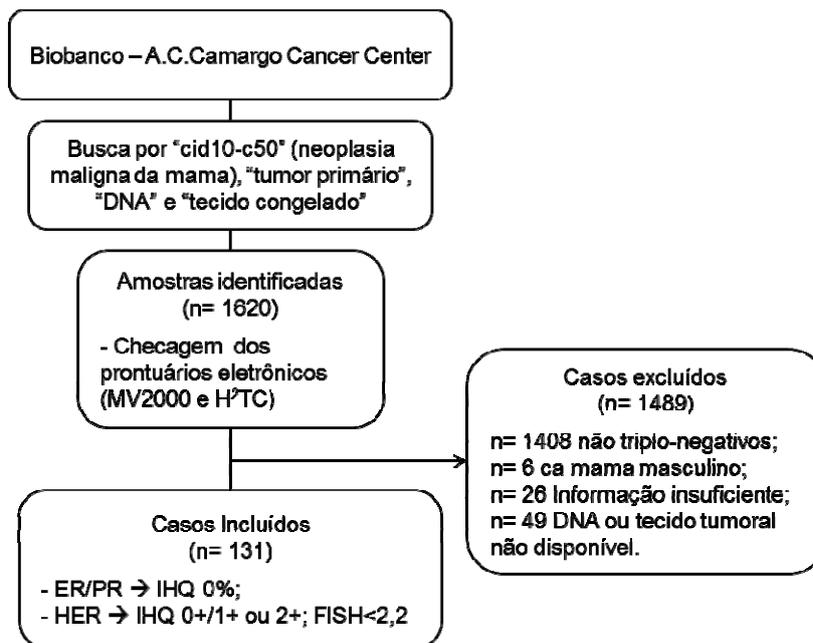


Figura 5 - Seleção das amostras incluídas no estudo. Foram incluídas amostras cujos laudos anatomopatológicos indicavam 0% de marcação das células neoplásicas para receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR) e marcação para HER2 indicada como score 0+ ou 1+. Casos com score 2+ foram incluídos quando o teste por FISH mostrou uma razão <2,2. Todos os casos foram encaminhados para revisão por patologista da área.

A Tabela 1 representa a caracterização da casuística de acordo com as variáveis clínicas e demográficas das pacientes incluídas nesse estudo.

Tabela 1 - Caracterização clínico-demográfica das pacientes com tumor imunofenótipo triplo-negativo

Variável	N	%
Tipo Histológico		
CDI	101	77,1%
CLI	4	3,1%
Medular	14	10,7%
Metaplásico	6	4,6%
Outro	6	4,6%
Idade		
≤ 40 anos	32	24,4%
>40 e ≤50	39	29,8%
> 50 anos	60	45,8%

Cont/Tabela 1

Variável	N	%
Histórico Familiar		
Positivo	33	34,4%
Negativo	63	65,6%
NA	35	
Cor		
branca	70	82,4%
não-branca	15	17,6%
NA	46	
Grau SBR		
3	109	86,5%
< 3	17	13,5%
NA	5	
Grau Nuclear		
3	122	95,3%
< 3	6	4,7%
NA	3	
Tamanho do tumor		
≤ 2cm	33	26,2%
>2 e ≤ 5 cm	74	58,7%
>5 cm	19	15,1%
NA	5	
Acometimento linfonodal		
Negativo	56	44,8%
Positivo	69	55,2%
NA	6	
Invasão vascular sanguínea		
Presente	6	4,7%
Ausente	123	95,3%
NA	2	
Invasão vascular linfática		
Presente	37	28,7%
Ausente	92	71,3%
NA	2	
Invasão perineural		
Presente	19	14,8%
Ausente	109	85,2%
NA	3	
Necrose		
Presente	93	73,8%
Ausente	33	26,2%
NA	5	

Cont/Tabela 1

Variável	N	%
Infiltrado Inflamatório		
Ausente ou discreto	50	38,8%
Moderado	51	39,5%
Intenso	28	21,7%
NA	2	
Desmoplasia		
Ausente ou discreta	30	23,6%
Moderada	66	52,0%
Intensa	31	24,4%
NA	4	
IHQ p53		
Positivo	78	71,6%
Negativo	31	28,4%
NA	22	
IHQ ki-67		
<15	5	6,2%
≥15	76	93,8%
NA	50	
IHQ EGFR		
Positivo	39	56,5%
Negativo	30	43,5%
NA	62	
IHQ ck5		
Positivo	70	70,7%
Negativo	29	29,3%
NA	32	
IHQ ck14		
Positivo	40	48,2%
Negativo	43	51,8%
NA	48	
IHQ p63		
Positivo	23	28,4%
Negativo	58	71,6%
NA	50	

4.2 MÉTODOS DE *TARGET SEQUENCING*

Inicialmente foi realizada uma avaliação da acuidade do sequenciamento paralelo, usando as plataformas Ion PGM Torrent (Life Technologies) e 454-GS Junior (Roche) usando amostras previamente testadas para *BRCA1* pelo método de eletroforese capilar em outro estudo do grupo (MIC 146 e MJ 2021), além de novas amostras. Construiu-se a biblioteca para 8 amostras (incluindo as 2 previamente testadas) usando o kit Ampliseq para sequenciamento no Ion PGM Torrent e com posterior inserção de adaptadores do 454 nessa biblioteca, conforme já citado anteriormente, para sequenciamento no 454 GS Junior. Os dados encontram-se esquematizados na Tabela 2. Em ambas as plataformas a cobertura da região alvo foi de 100% para todas as amostras com uma profundidade média de 180x no 454 e 1380x no PGM. Todas as alterações identificadas nas amostras rastreadas por sequenciamento capilar foram também reportadas por ambas plataformas de sequenciamento massivo paralelo. As variantes detectadas em amostras sequenciadas pela primeira vez também foram detectadas pelos dois sequenciadores. A plataforma 454 GS Junior apresentou menos erros de sequenciamento, porém com menor cobertura comparada ao Ion PGM Torrent. (Figura 6). Visto que a capacidade de geração de sequências no 454 GS Junior é menor com um custo maior por corrida optou-se por utilizar nesse trabalho a plataforma Ion PGM Torrent, que produz uma maior quantidade de dados a preços menores, e, mesmo sendo mais propensa a pequenos erros de

sequenciamento, principalmente inserções e deleções, com os aprimoramentos que foram realizados nos algoritmos de chamada de variantes, as versões atuais geram resultados com excelente qualidade.

Tabela 2 - Comparação entre as plataformas de sequenciamento massivo paralelo 454 GS Junior e Ion PGM Torrent

Amostra	454 GS Junior		Ion PGM Torrent		Concordância entre técnicas*
	Cobertura média obtida	Nº de variantes identificadas	Cobertura média obtida	Nº de variantes identificadas	
MIC 146	157x	8	1541x	8	100%
MJ 2021	190x	10	1513x	10	100%
MIC 175	190x	7	1551x	7	100%
MIC177	213x	9	1684x	9	100%
MIC 180	183x	7	1205x	7	100%
MIC 183	178x	7	1249x	7	100%
MIC 189	129x	7	835x	7	100%
MIC 224	196x	9	1470x	9	100%
TOTAL	179,5x	64	1381x	64	100%

* Concordância entre as variantes identificadas utilizando as plataformas de sequenciamento 454 GS Junior e Ion PGM Torrent. Para as amostras MIC 146 e MJ 2021 a concordância levou em conta também a identificação de variantes por sequenciamento capilar.

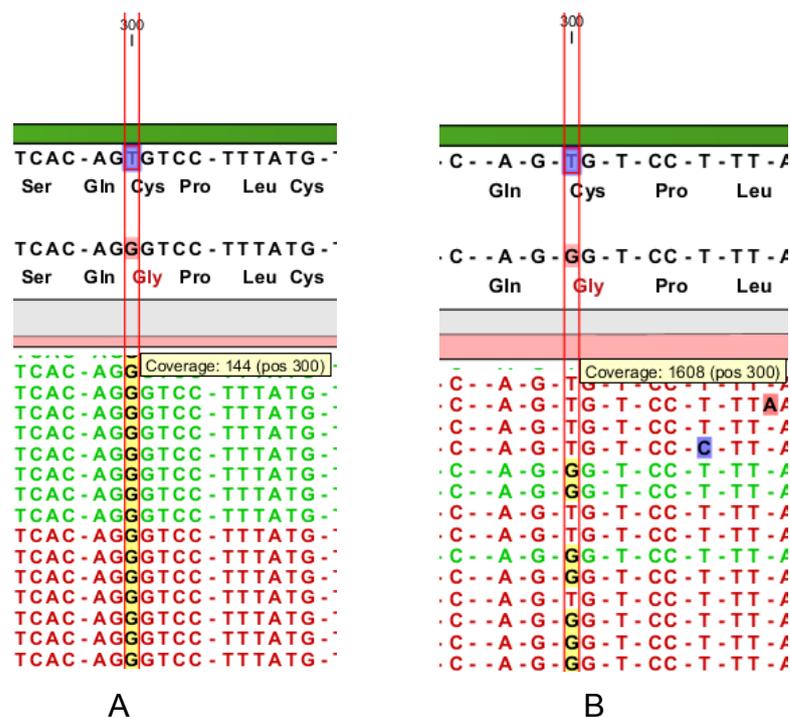


Figura 6 - Representação do alinhamento das sequências referentes à amostra MJ 2021 ressaltando a região da mutação deletéria c.300T>G; p.C61G. (A) Sequências geradas pelo sequenciador 454 GS Junior. Variante foi reportada em 46,8% das reads. (B) Sequências geradas pelo sequenciador Ion PGM Torrent. Variante reportada em 49,9% das reads.

Assim os resultados mostraram que as duas plataformas geraram resultados confiáveis e poderiam ser utilizadas para rastreamento de *BRCA1*.

O segundo passo foi a análise das diferentes abordagens de *Target sequencing* a partir dos 3 kits disponíveis comercialmente (Ampliseq, GeneRead e Haloplex). Para isso, analisamos aspectos como porcentagem de cobertura das regiões alvo e dificuldade no preparo da biblioteca, levando em consideração a rapidez e quantidade de etapas do protocolo. Foram preparadas bibliotecas de 8 pacientes com o kit Ampliseq; 12 com o Generead e 11 com o kit Haloplex, para essa análise preliminar. As amostras foram sequenciadas até uma profundidade média de 1000x. O kit Ampliseq da Life Technologies demonstrou ser o mais adequado às

necessidades do projeto, mostrando uma boa cobertura de toda a região codificante do gene *BRCA1*, com um bom custo-benefício e, portanto, foi escolhido como o método de preparo de biblioteca utilizado para o restante das amostras. A Tabela 3 mostra a comparação entre as diferentes estratégias. Vale notar que o painel Haloplex foi desenhado de forma a cobrir 17 genes relacionados a Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário (*ATM, BRCA1, BRCA2, CDKN2A, CHEK2, CTNNB1, CDH1, BRIP1, MLH1, MSH2, MSH6, NBN, PALB2, PTEN, RAD50, RAD51, TP53*). A maior quantidade de DNA inicial necessária para esse kit se deve ao maior número de alvos contemplados em comparação ao outros (Ampliseq e Generead), os quais foram desenhados apenas para os genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Tabela 3 - Comparação das abordagens de *Target Sequencing*

Método	Princípio da técnica	Cobertura esperada da região alvo	Cobertura obtida da região alvo	Quantidade inicial de DNA por amostra	Rapidez e menor quantidade de etapas	Custo por amostra (US\$)*
Ampliseq	PCR Multiplex	100%	100%	30ng	**	103,38
Generead	PCR Multiplex	95,33%	95,33%	80ng	**	132,18
Haloplex	Captura por sondas	100%	100%	225ng	*	220,52

* Valores na cotados na época da compra os kits (2012/2013). Maiores informações em Anexos

4.3 CLASSIFICAÇÃO E PREVALÊNCIA DE MUTAÇÃO EM *BRCA1*

As sequências obtidas foram avaliadas nos softwares CLCBio Genomics Workbench 6.5 e IonReporter 4.0 e 4.2. As amostras que não apresentaram variações na sequência de nucleotídeos em comparação com a sequência referência ou apresentaram variações sem substituição de aminoácidos foram classificadas como selvagem. As variações do tipo *missense*, que levam a substituição de aminoácidos, foram submetidas ao banco de dados do Breast Information Core (BIC - <http://research.nhgri.nih.gov/bic>) e classificadas como selvagens (aquelas classificadas como “sem importância clínica”) ou como patogênicas (aquelas classificadas como “cl clinicamente importante”). As variantes não descritas e/ou de significância clínica desconhecida no BIC foram submetidas ao banco de dados LOVD-IARC para a classificação segundo este banco. Variantes nível 1 e 2 foram classificadas como selvagens e as indicadas como níveis 4 e 5 nesse banco classificadas como mutações patogênicas. As alterações de nucleotídeos do tipo *missense* não descritas no LOVD-IARC ou aquelas classificadas como nível 3 foram categorizadas como Variantes de Significância Incerta (VSI). Alterações do tipo inserção, deleção ou substituição de nucleotídeo que resultaram em códon de terminação prematuro antes do aminoácido 1853 foram classificadas como patogênicas. Alterações em sítios de *splice* também foram consideradas patogênicas. Os critérios utilizados para classificar as alterações observadas foram os

mesmos descritos em outros trabalhos do grupo (CARRARO et al. 2013).

A Tabela 4 relaciona o status do gene *BRCA1* nas amostras testadas (ver tabela em “Anexo 5” para maiores detalhes).

Tabela 4 - Status de mutação de pacientes portadoras de tumores de mama imunofenótipo triplo-negativo

Identificação	Idade ao diagnóstico	Status/origem	Cobertura média obtida (Ion PGM Torrent)
4956	66	Selvagem	407
5228	56	Selvagem	453
17755	54	Selvagem	737
17791	51	VSI (2641G>A; p.R841Q) - Germinativa	1532
18030	87	Selvagem	813
19064	58	Selvagem	439
19088	42	Selvagem	481
M7	40	Selvagem	1810
M15	46	Selvagem	625
M32	34	Selvagem	639
M255	73	Selvagem	1287
M256	37	Mutada (c.120A>G; p.M1V) - Germinativa	1091
M257	60	Selvagem	886
M259	54	Selvagem	1549
M260	57	Selvagem	976
M261	69	Selvagem	1037
M262	81	Selvagem	1131
M263	65	Selvagem	1460
M264	57	Selvagem	791
M265	44	Selvagem	1114
M266	54	Selvagem	1554
M267	63	Selvagem	772
M268	59	VSI (c.3475C>G; p.T1119S) - Germinativa	1402
M269	29	Selvagem	1519
M274	35	Selvagem	1351
M275	36	Selvagem	683
M276	40	Mutado (c.300T>G; p.C61G) - Germinativa	1009
M277	45	Selvagem	849
M278	41	Selvagem	696
M280	36	Mutado (c.1242delC; p.Leu375fs/1243T>A; p.Leu375Gln) - Germinativa	882

Cont/ Tabela 4

Identificação	Idade ao diagnóstico	Status/origem	Cobertura média obtida (Ion PGM Torrent)
M281	32	Selvagem	811
M282	38	Mutado (c.2524delTG; p. V801fs) - Germinativa	924
M283	42	Selvagem	428
M284	44	Selvagem	968
M285	36	Mutado (c.5622C>T; p.Arg1835*) - Somática	605
M286	39	Selvagem	630
M287	44	Mutado (4302C>T; p.Gln1395*) - Germinativa	1681
M288	35	Selvagem	3523
M290	31	Selvagem	1488
M291	50	Selvagem	1293
M292	34	Mutado (c.4215+1G>A; <i>splice donor variant</i>) - Germinativa	448
M293	47	Selvagem	463
M298	38	Selvagem	1147
M299	38	Selvagem	1135
M300	41	Selvagem	1013
M302	61	Selvagem	1058
M303	41	Mutado (c.4603G>T; p.Arg1495Met) - Germinativa	1057
M304	70	Selvagem	1243
M305	42	Mutado (c.330A>G; p.Arg71Gly) - Somática	1221
M308	59	Selvagem	1066
M309	64	Selvagem	504
M310	46	Selvagem	2368
M311	51	Selvagem	572
M312	48	Selvagem	1076
M313	30	Selvagem	1038
M314	87	Selvagem	952
M315	58	Mutado (c.808delAGAC; p.Glu230fs) - Germinativa	690
M316	62	Selvagem	1181
M319	48	Selvagem	616
M320	65	Selvagem	1587
M321	78	Selvagem	419
M322	83	Selvagem	3136
M323	77	Selvagem	2626
M324	52	Selvagem	2670
M325	32	Selvagem	1367
M326	30	Selvagem	1454

Cont/ Tabela 4

Identificação	Idade ao diagnóstico	Status/origem	Cobertura média obtida (Ion PGM Torrent)
M340T	75	Selvagem	1280
M341T	76	Selvagem	1379
M343T	39	Selvagem	1534
M344T	65	Selvagem	1618
M345T	67	Selvagem	1220
M346T	79	Selvagem	1474
M347T	44	Selvagem	1435
M348T	46	Selvagem	1242
M349T	35	Selvagem	935,9
M350T	44	Selvagem	1004
M351T	47	Selvagem	1459
M352T	52	Selvagem	1020
M355T	43	Mutado (c.300T>G; p.Cys61Gly) - Germinativa	756,7
M356T	48	Selvagem	1231
M357T	36	Selvagem	1587
M358T	47	Selvagem	1198
M360T	70	Selvagem	1870
M361T	73	Selvagem	2141
M362T	42	Selvagem	2382
M363T	77	Selvagem	2579
M364T	50	Selvagem	2334
M365T	50	Selvagem	336,8
M366T	34	Selvagem	1983
M367T	56	Selvagem	2391
M368T	79	Selvagem	2550
M369T	50	Mutado (c.5382insC; p.Ser1755fs) ^b	3203
M370T	48	VSI (c.5227A>G; p.Tyr1703Cys) - Germinativa	2868
M371T	70	Selvagem	2424
M372T	54	Selvagem	919,3
M373T	44	Selvagem	2505
M374T	56	Selvagem	2959
M376T	70	Selvagem	2357
M377T	46	Selvagem	1185
M378T	65	Selvagem	1176
M379T	32	Selvagem	1062
M380T	51	Selvagem	1178
M381T	83	Selvagem	1096
M382T	39	Selvagem	1026
M384T	51	Selvagem	1202
M385T	33	Selvagem	1159
M386T	49	Selvagem	1085

Cont/ Tabela 4

Identificação	Idade ao diagnóstico	Status/origem	Cobertura média obtida (Ion PGM Torrent)
MIC20	50	Selvagem	570
MIC21	43	Selvagem	534
MIC25	54	Selvagem	645
MIC68	47	Selvagem	661
MIC82	51	Selvagem	4358
MIC134	37	Selvagem	439
MIC137T	44	Selvagem	1152
MIC141T	61	Selvagem	1225
MIC142	58	Selvagem	616
MIC144T	64	VSI (c.3942A>G; p.Ile1275Val) - Germinativa	1182
MIC146 ^a	18	Selvagem	1541
MIC175	41	Selvagem	1551
MIC177	43	Selvagem	1684
MIC180	64	Selvagem	1205
MIC183	40	Selvagem	1249
MIC185	52	Selvagem	1279
MIC189	53	Selvagem	835
MIC191	48	Selvagem	473
MIC218	71	Selvagem	1099
MIC224	47	Selvagem	1470
MIC228	64	Selvagem	649
MIC234	56	Mutado (c.307T>A; p.L63*) - Germinativa	1132
MJ2021 ^a	27	Mutado (c.300T>G; p.C61G) - Germinativa	1513
SM95	40	Mutado (c.4406C>A; p.T1429*) - Germinativa	2887

^a pacientes avaliadas previamente em outro estudo por sequenciamento capilar e utilizadas como controle de detecção de variantes por métodos de *Target Sequencing* nesse trabalho.

^b paciente sem amostra de DNA de tecido não-neoplásico disponível, portanto não sendo possível determinar origem da mutação.

A Figura 7 ilustra o status dos tumores nas pacientes segundo a classificação proposta. Grande parte dos tumores testados para mutações em *BRCA1* (85,5% - 112/131) foi classificada como selvagem, enquanto que 15 pacientes (11,45% - 15/131) eram portadoras de tumores com mutações patogênicas e em apenas 4 (3,05% - 4/131) foi constatada uma Variante de Significado Incerto (VSI). A análise de origem da mutação mostrou que,

entre as 15 amostras TN mutadas, doze (85,7% - 12/14) dessas pacientes eram também portadoras de mutação germinativa em *BRCA1*, duas delas (14,3% - 2/14) portadoras de mutação somática e para apenas 1 a origem da mutação não pode ser determinada, por não existir amostra de DNA não neoplásico ou mesmo tecido e/ou sangue no biobanco do ACCCC. Além disso, todas as VSI (4/4) foram também classificadas como germinativas.

A média de idade ao diagnóstico das pacientes portadoras de tumores TN *BRCA1*-mutados foi de 41 anos, enquanto que para aquelas diagnosticadas com tumores TN *BRCA1*-selvagem essa média foi de 53 anos. Para as pacientes cujos tumores apresentaram uma VSI a média de idade ao diagnóstico foi de 56 anos.

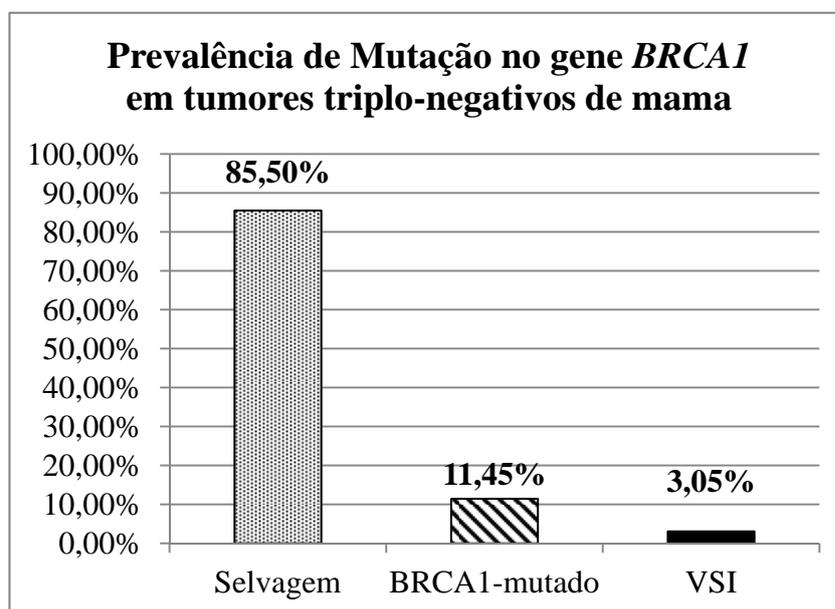


Figura 7 - Prevalência de mutação no gene *BRCA1* em tumores imunofenótipo triplo-negativo.

A Figura 8 relaciona a localização das mutações patogênicas em relação aos domínios da proteína BRCA1. Os pontos verdes representam mutações patogênicas *missense*, que alteram um único aminoácido. Mutações que determinam uma proteína truncada (inserções e deleções com alteração da matriz de leitura ou troca de nucleotídeo com geração de códon de parada prematuro) estão representadas pelos pontos vermelhos e o ponto cinza ilustra uma alteração do tipo *splice-site*. A mutação mais frequentemente encontrada foi a c.300T>G; p.C61G, detectada em 3 (20% - 3/15) pacientes. As demais mutações foram reportadas apenas uma vez.

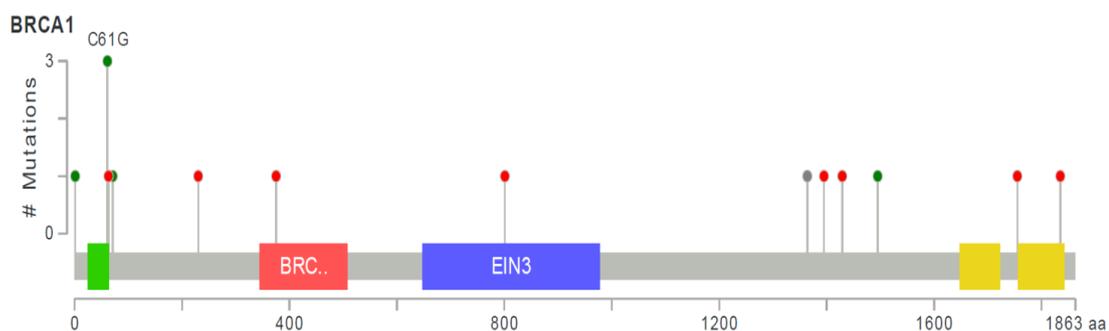


Figura 8 - Representação esquemática da proteína BRCA1 e das alterações patogênicas encontradas nesse estudo. O retângulo verde representa o domínio amino-terminal RING (*Zn-finger*); em vermelho, o domínio rico em serina associado a BRCT; o domínio *Ethylene Insensitive 3*, representado em azul e os dois domínios BRCT c-terminal esquematizados em amarelo. Ponto verde = mutação patogênica do tipo *missense*; Ponto vermelho = mutação patogênica que determina uma proteína truncada (inserção, deleção ou alteração *missense* com inserção de códon de parada prematuro); Ponto cinza = mutação patogênica do tipo *splice-site*. (http://www.cbioportal.org/public-portal/mutation_mapper.jsp)

4.4 VARIÁVEIS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS

Para os 131 casos de tumores TN inclusos nesse estudo a idade ao diagnóstico variou de 18 a 87 anos com uma média de 51 anos, dado que é similar aos achados do METABRIC (*Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*) para pacientes TN, que foi de 52,7 anos ($p=0,2477$), e menor do que a idade média de 54,2 anos ($p=0,027$), reportados pelo TCGA (*The Cancer Genome Atlas Network*), ambos, projetos colaborativos internacionais com grande casuística de tumores de mama (STEPHENS et al. 2012; The Cancer Genome Atlas Network et al. 2012). Quando analisada a distribuição da idade em relação ao status de mutação em *BRCA1*, observou-se que os tumores mutados em *BRCA1* foram diagnosticados em idade mais jovem (41 anos) quando comparados àqueles classificados como selvagem (53 anos) (teste de Mann-Whitney $p=0,0028$), com uma maior proporção deles diagnosticados abaixo dos 40 anos (53,3% mutados vs 21,4% selvagens - teste qui-quadrado, $p=0,0101$). A Figura 9 ilustra a distribuição da idade ao diagnóstico das portadoras de tumor TN com relação ao status de mutação em *BRCA1* nessas amostras. Além disso, se analisarmos somente os tumores TN diagnosticados até os 40 anos observamos uma proporção de 25% (8/32) deles como sendo *BRCA1*-mutados. Por outro lado, entre os diagnosticados após os 40 anos apenas 7,4% (7/95) apresentaram mutação nesse gene, indicando fortemente que diagnóstico de tumor TN em idade jovem é um fator de risco para presença de mutação patogênica germinativa em *BRCA1*.

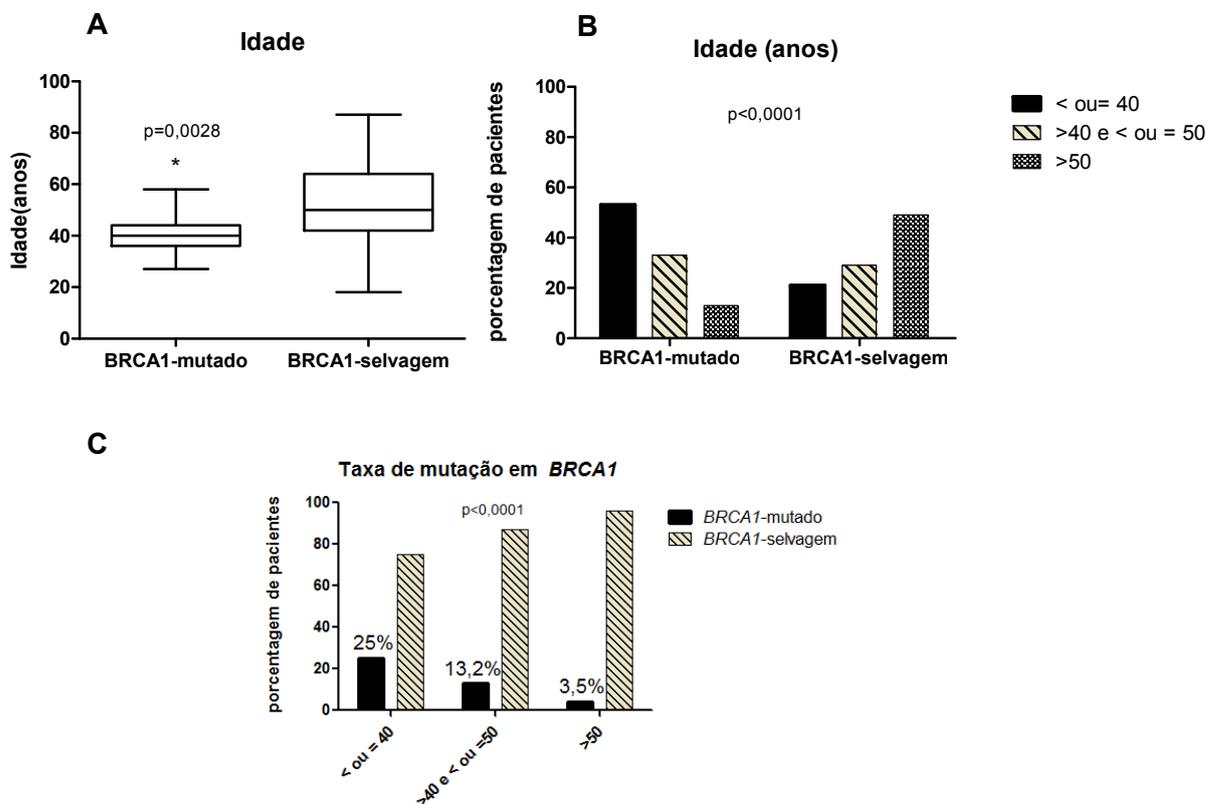


Figura 9 - Distribuição da idade ao diagnóstico das portadoras de tumor TN. A) Distribuição de idade ao diagnóstico entre as pacientes TN *BRCA1*-mutados e *BRCA1*-selvagens. (Teste de Mann-Whitney, $p=0,0022$); B) Proporção de tumores TN diagnosticados em cada faixa etária de acordo com o status de mutação em *BRCA1* (Teste qui-quadrado $p<0,0001$); C) Taxa de mutação em *BRCA1* em tumores TN em diferentes faixas etárias.

Ainda, para os tumores *BRCA1*-mutados foi mais frequente a história de casos de câncer de mama na família ($p=0.0008$) nessas pacientes que em relação aos selvagens. Se, então, analisadas as pacientes diagnosticadas antes dos 40 anos e que reportaram algum caso de câncer de mama na família tem-se que 60% (6/10) delas apresentaram tumores *BRCA1*-mutados. Por outro lado, essa taxa é bem menor (21,7% – 5/23) se avaliadas as pacientes com mais de 40 anos e caso de câncer de mama na família, como mostra a figura 10.

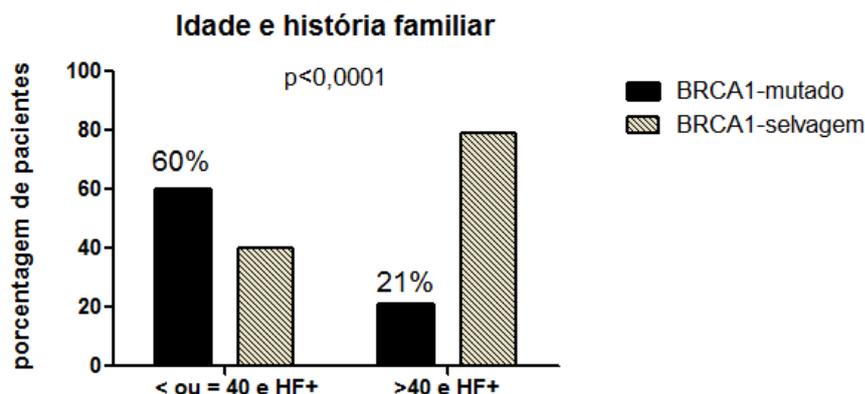


Figura 10 - Taxa de tumores com mutação em *BRCA1* em mulheres diagnosticadas com 40 anos ou menos e com histórico familiar de câncer de mama.

As demais variáveis apresentaram variações sem significância estatística quando comparada ao status de mutação em *BRCA1*. A Tabela 5 apresenta a associação entre status de mutação em *BRCA1* nos tumores TN e as características clínicas e demográficas.

Tabela 5 - Características clínicas e demográficas de pacientes com tumores de imunofenótipo triplo-negativo de acordo com a presença de mutação no gene *BRCA1*.

Variável	<i>BRCA1</i> -mutadas			<i>BRCA1</i> -Selvagens			p valor (χ^2 ; Fischer)
	N	↓%	→%	N	↓%	→%	
Tipo Histológico							
CDI	12	(80%)	(12%)	85	(76%)	(88%)	(p = 1,000)
Outro	3	(20%)	(10%)	27	(24%)	(90%)	
Histórico Familiar							
Positivo	11	(73%)	(34%)	21	(26%)	(66%)	(p = 0,0008)*
Negativo	4	(27%)	(6%)	61	(74%)	(94%)	
NA				30			
Idade							
≤ 40 anos	8	(53%)	(25%)	24	(21%)	(75%)	(p = 0,0101)*
> 40 anos	7	(47%)	(7%)	88	(79%)	(93%)	

Cont/Tabela 5

Variável	BRCA1-mutadas		BRCA1-Selvagens			p valor (X ² ; Fischer)
Grau SBR						
< 3	0 (0%)	(0%)	17 (16%)	(100%)		(p = 0,2139)
3	14 (100%)	(13%)	91 (84%)	(87%)		
NA	1		2			
Grau Nuclear						
< 3	0 (0%)	(0%)	7 (6%)	(1%)		(p = 0,5971)
3	15 (100%)	(13%)	103 (94%)	(87%)		
NA			4			
Tamanho do tumor						
≤ 2cm	4 (27%)	(12%)	30 (28%)	(88%)		(p = 0,6115)
>2 e ≤ 5 cm	10 (67%)	(14%)	61 (56%)	(86%)		
>5 cm	1 (6%)	(6%)	17 (16%)	(94%)		
NA			4			
Acometimento linfonodal						
Negativo	5 (33%)	(9%)	49 (46%)	(91%)		(p = 0,4140)
Positivo	10 (67%)	(15%)	57 (54%)	(85%)		
NA			6			
Invasão vascular sanguínea						
Presente	1 (7%)	(0,2%)	4 (4%)	(0,8%)		(p = 0,4781)
Ausente	14 (93%)	(12%)	106 (96%)	(88%)		
NA			2			
Invasão vascular linfática						
Presente	2 (13%)	(6%)	32 (29%)	(94%)		(p = 0,3523)
Ausente	13 (87%)	(14%)	78 (71%)	(86%)		
NA			2			
Invasão perineural						
Presente	3 (20%)	(17%)	15 (14%)	(83%)		(p = 0,4562)
Ausente	12 (80%)	(11%)	94 (86%)	(89%)		
NA			3			
Necrose						
Presente	12 (80%)	(13%)	78 (73%)	(87%)		(p = 0,7570)
Ausente	3 (20%)	(9%)	29 (27%)	(91%)		
NA			5			
Infiltrado Inflamatório						
Discreto ou moderado	12 (80%)	(12%)	85 (77%)	(88%)		(p = 1,000)
Intenso	3 (20%)	(11%)	25 (23%)	(89%)		
NA			2			
Desmoplasia						
Discreta ou moderada	12 (80%)	(13%)	83 (76%)	(87%)		(p = 1,000)
Intensa	3 (20%)	(10%)	26 (24%)	(90%)		
NA			3			

Cont/Tabela 5

Variável	BRCA1-mutadas		BRCA1-Selvagens		p valor (X ² ; Fischer)
IHQ p53					
Positivo	8 (57%)	(11%)	67 (73%)	(89%)	(p = 0,3431)
Negativo	6 (43%)	(19%)	25 (27%)	(81%)	
NA	1		20		
IHQ ki-67					
<15	0 (0%)	(0%)	5 (7%)	(100%)	(p = 1,000)
>15	11 (100%)	(15%)	63 (93%)	(85%)	
NA	4		44		
IHQ EGFR					
Positivo	5 (46%)	(14%)	32 (57%)	(86%)	(p = 0,5226)
Negativo	6 (54%)	(20%)	24 (43%)	(80%)	
NA	4		56		
IHQ ck5					
Positivo	10 (83%)	(14%)	60 (72%)	(86%)	(p = 0,5079)
Negativo	2 (17%)	(8%)	23 (28%)	(92%)	
NA	3		29		
IHQ ck14					
Positivo	6 (54%)	(15%)	34 (49%)	(85%)	(p = 1,000)
Negativo	5 (46%)	(13%)	35 (51%)	(87%)	
NA	4		43		
IHQ p63					
Positivo	4 (40,0%)	(17%)	19 (27%)	(83%)	(p = 0,4655)
Negativo	6 (60,0%)	(11%)	50 (73%)	(89%)	
NA	5		43		

CDI= Carcinoma ductal invasivo; NA= não avaliado; Grau SBR= grau histológico de Scarff-Bloom-Richardson; IHQ= imuno-histoquímica. Pacientes cujos tumores apresentaram variante de significado incerto foram excluídas dessas análises.

4.4.1 Análise de sobrevida

Foi observada uma tendência de melhor sobrevida global em 5 anos para as pacientes cujos tumores apresentavam mutação em *BRCA1*, independente da origem germinativa ou somática, quando comparadas com pacientes com tumores TN sem mutação em *BRCA1*, entretanto essa diferença não foi estatisticamente significativa (p=0,4017) (Figura 11).

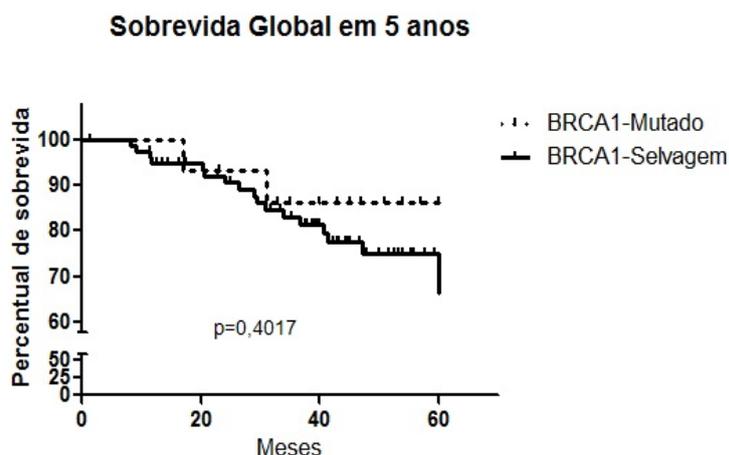


Figura 11- Sobrevida global em 5 anos (60 meses). Comparação entre pacientes portadoras de tumor imunofenótipo triplo-negativo mutados em *BRCA1* e selvagens (log-rank; $p=0,4017$).

Da mesma forma observou-se uma tendência de melhor sobrevida livre de recorrência em 5 anos para as pacientes com tumores *BRCA1*-mutados quando comparadas com *BRCA1*-selvagens, porém sem significância estatística ($p=0,4250$) (Figura 12).

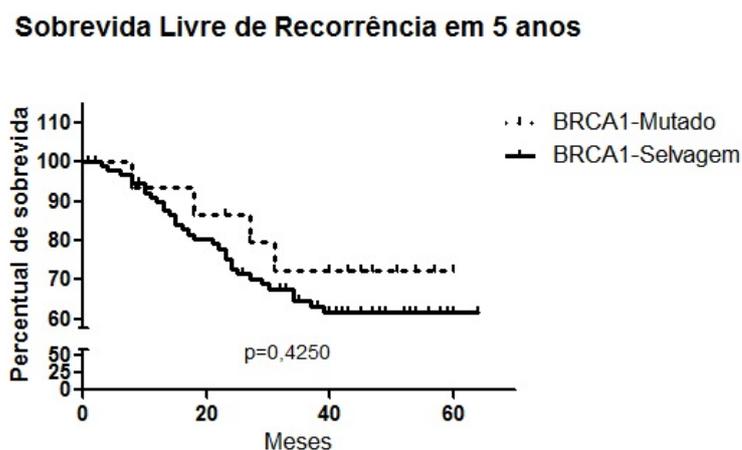


Figura 12 - Sobrevida livre de recorrência em 5 anos (60 meses). Comparação entre pacientes portadoras de tumor imunofenótipo triplo-negativo com mutação em *BRCA1* e selvagens (log-rank; $p=0,4250$).

Observou-se que o tratamento baseado em antraciclinas (com ou sem adição de taxanos), constituiu a principal linha de tratamento tanto para as pacientes portadoras de tumores *BRCA1*-mutados (100%) quanto para os selvagens (90,7%). Entre as 15 pacientes portadoras de tumores com mutação em *BRCA1*, seis (40%) receberam tratamento quimioterápico pré-operatório e as 9 restantes (60%) receberam quimioterapia adjuvante. Já para as 100 portadoras de tumores selvagens para as quais havia informação sobre esquema de tratamento, vinte e sete (27%) foram tratadas com quimioterapia neoadjuvante e 73 (73%) com quimioterapia adjuvante. Não houve diferença na indicação de quimioterapia adjuvante *versus* neoadjuvante entre as pacientes portadoras de tumores *BRCA1*-mutados e *BRCA1*-selvagens (teste exato de Fischer, $p=0.3656$).

Comparou-se, então, a sobrevida global e a sobrevida livre de recorrência para as pacientes com tumores *BRCA1*-mutados e selvagens tratadas pré- ou pós-cirurgia e não foi constatada diferença na sobrevida entre os dois grupos de pacientes (Figuras 13 e 14).

Demais tratamentos diferentes do esquema baseado em antraciclinas em combinação ou não com taxanos não foram analisados devido ao número limitado de pacientes com tratamento diferente desses esquemas, o que inviabiliza o tratamento estatístico. Da mesma forma, não foram consideradas pacientes metastáticas ao diagnóstico para as análises de sobrevida.

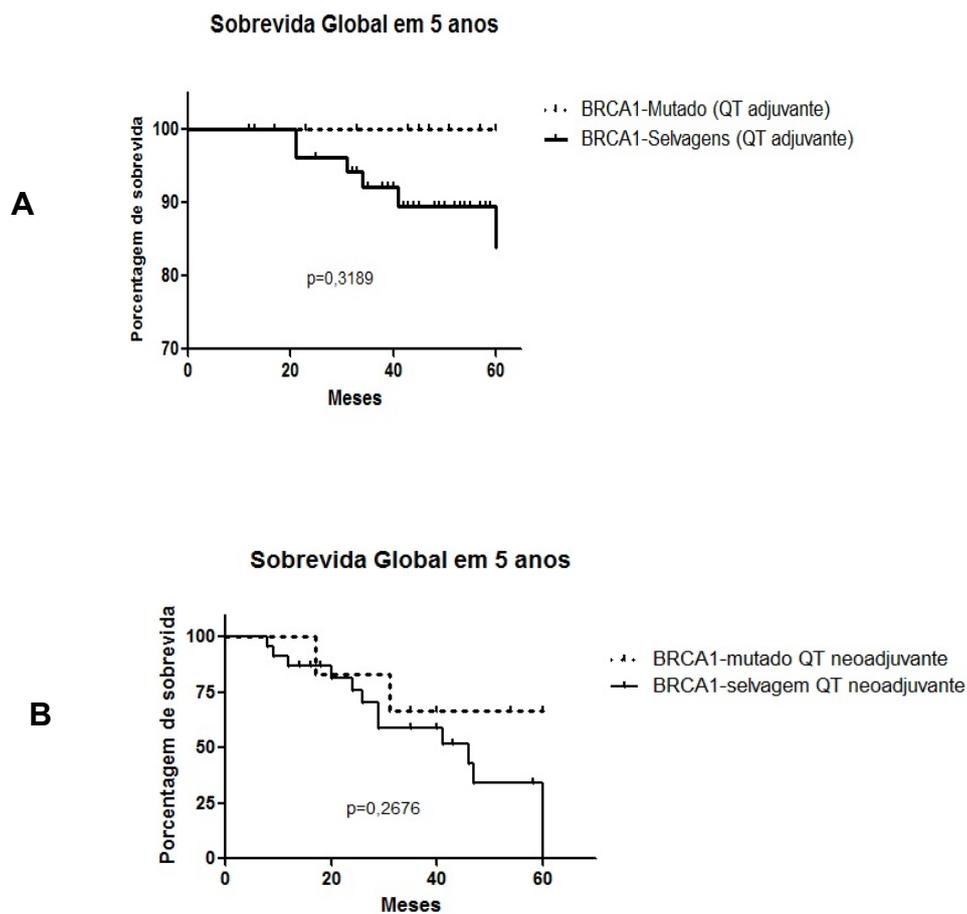


Figura 13 - Curva de sobrevida global em cinco anos em pacientes portadoras de tumor TN. A) Curva de sobrevida comparando pacientes com tumores *BRCA1*-mutados vs *BRCA1*-selvagem tratadas com quimioterapia adjuvante (log-rank; $p=0,3189$). B) Curva de sobrevida comparando pacientes com tumores *BRCA1*-mutados vs *BRCA1*-selvagens tratadas com quimioterapia neoadjuvante (log-rank; $p=0,2676$)

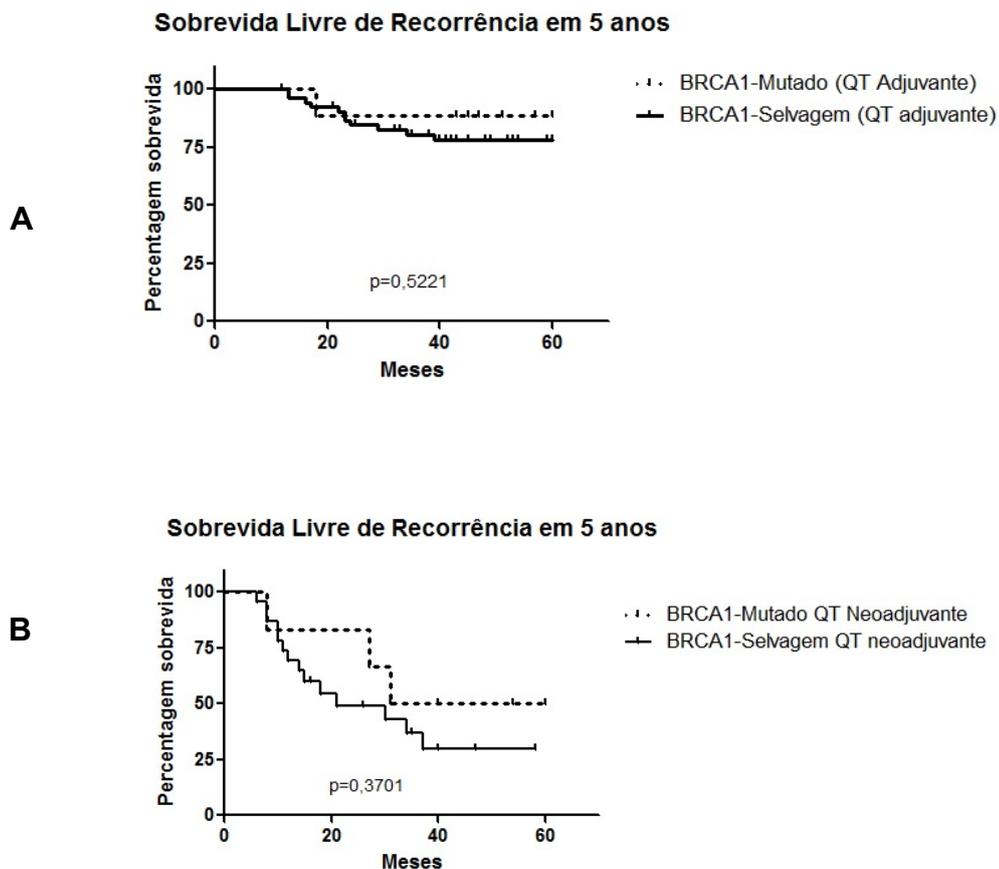


Figura 14 - Curva de sobrevivida livre de recorrência em cinco anos em pacientes portadoras de tumor TN. A) Curva de sobrevivida comparando pacientes com tumores *BRCA1*-mutados vs *BRCA1*-selvagem tratadas com quimioterapia adjuvante (log-rank; $p=0,5221$). B) Curva de sobrevivida comparando pacientes com tumores *BRCA1*-mutados vs *BRCA1*-selvagens tratadas com quimioterapia neoadjuvante (log-rank; $p=0,3701$).

É interessante reforçar que, ainda que nenhuma das comparações de sobrevivida em grupos TN mutados e não mutados em *BRCA1* tenha apresentado diferença significativa, uma tendência de maior sobrevivida nas pacientes com TN *BRCA1*-mutado foi observada.

A indicação do tratamento neoadjuvante mostrou associação com as variáveis clínicas idade, dimensão do tumor e estágio clínico. Pacientes

diagnosticadas em idade jovem, portadoras de tumores de tamanho aumentado e aquelas em estágio clínico avançado (III/IV) foram mais propensas a receber tratamento neoadjuvante ($p=0,0236$; $p=0,0081$; $p<0,0001$; respectivamente). Não houve associação entre prescrição de tratamento pré-cirurgia e comprometimento de linfonodo e presença de mutação em *BRCA1* ($p=0,1503$ e $p=0,3656$; respectivamente).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a prevalência de mutação em *BRCA1* nos tumores triplo-negativos (TN) da mama, que são caracterizados pela ausência de expressão dos receptores de estrógeno e progesterona e pela não amplificação/super-expressão do fator de crescimento HER-2 e correspondem a cerca de 15% de todos os tumores de mama (CAREY et al. 2006). Grande parte desses tumores (cerca de 80%) é classificada como *basal-like*, ou seja, apresentam padrão de expressão de marcadores semelhante às células basais/mioepiteliais, como, por exemplo, positividade por imuno-histoquímica para citoceratinas 5, 6, 14 e 17, EGFR, KIT e p63 (PEROU et al. 2000; NIELSEN et al. 2004; RAKHA et al. 2006). Nossos dados corroboram com achados de outros autores quanto às características anatomopatológicas: os tumores TN são em sua maioria carcinomas ductais invasivos (77%) com alto grau histológico (86,5% grau 3 SBR), e basalóides (83,5% com positividade para ck5/6, 14, EGFR ou p63), com altos níveis de expressão do marcador de proliferação celular ki-67 (94% com marcação em mais de 15% das células neoplásicas) (KORSCHING et al. 2002; NIELSEN et al. 2004; RAKHA et al. 2006).

Estudos têm mostrado que entre 60-80% dos tumores que surgem em mulheres portadoras de mutação germinativa em *BRCA1* são tumores TN ou *basal-like* (BERTUCCI et al. 2008; CURTIS et al. 2012; MAVADDAT et al. 2012; COUCH et al. 2014). Além disso, baixos níveis de expressão de

BRCA1 – seja por hipermetilação do promotor do gene ou por regulação negativa - estão associados com o desenvolvimento de tumores basal-like (TURNER et al. 2007; WEN et al. 2012). Ainda, existem evidências de que os tumores *basal-like* apresentam padrão de variação em número de cópias gênicas semelhante a tumores *BRCA1*-mutados (JOOSSE et al. 2011). Esses dados sugerem uma associação entre alterações de perda de função em *BRCA1* e desenvolvimento de tumores TN. De fato, LIPS et al. (2013) observaram a associação entre tumores TN e tumores *BRCA1*-mutados e constaram que aproximadamente 20% das pacientes TN eram portadoras de mutações germinativas em *BRCA1*; quase 70% apresentaram um padrão de variações em número de cópias gênicas semelhante aos tumores relacionados a *BRCA1* e em cerca de 30% deles a hipermetilação da região promotora de *BRCA1* estava presente. Essas informações reforçam a ideia de que existe um comprometimento da via de *BRCA1* nos tumores TN.

Um estudo prévio do nosso grupo analisou um pequeno número de pacientes diagnosticadas com câncer de mama em idade jovem e constatou que entre as pacientes TN com história familiar positiva para câncer de mama havia uma alta prevalência de mutação em *BRCA1* (4/6). Para as pacientes TN sem história familiar positiva essa taxa foi de 5 em 10 (CARRARO et al. 2013). Nós, então, objetivamos analisar o status de mutação em *BRCA1* em uma coorte maior de pacientes TN não selecionadas por idade ou histórico familiar e detectamos uma prevalência de mutação de 11,45% (15/131). Embora esse dado seja menor que o reportado inicialmente, estudos recentes indicam que 8-30% nos tumores TN

apresentam mutação em *BRCA1*, a depender da metodologia de detecção de mutação e dos critérios usados como margem de corte para positividade dos marcadores de imuno-histoquímica (EVANS et al. 2011; FOSTIRA et al. 2012; PERN et al. 2012; ROBERTSON et al. 2012; GREENUP et al. 2013; LIPS et al. 2013; RUMMEL et al. 2013; COUCH et al. 2014; LI et al. 2014; PALOMBA et al. 2014; VILLARREAL-GARZA et al. 2015). Além disso, quando avaliadas as pacientes TN jovens (<40 anos), há um aumento significativo na prevalência de mutação nesse gene (25% - 8/32). Dessa forma, nossos dados corroboram com os achados recentes de outros autores quanto a prevalência de mutação em *BRCA1* nos tumores TN.

Mutações adquiridas em *BRCA1* parece ser um evento pouco comum nas pacientes diagnosticadas com tumor TN (GONZALEZ-ANGULO et al. 2011). Nesse estudo identificamos 12 pacientes portadoras de mutação germinativa (85,7%), duas portadoras de mutação somática (14,3%) e apenas uma de origem indeterminada, devido a falta de material não neoplásico disponível para a determinação da origem.

O tratamento padrão para os tumores TN é baseado em quimioterapia sistêmica, visto que esses tumores são mais quimiosensíveis que os tumores ER(+), embora não se beneficiem do tratamento endócrino ou anti-HER2 (BERRY et al. 2006). Os principais esquemas de tratamento para os tumores TN são baseados em antraciclinas ou antraciclinas-taxanos, pois tem mostrado maior benefício para essas pacientes (ROUZIER et al. 2005; CAREY et al. 2007). Nesse estudo, observamos que 90% (82/91) delas foi submetida a essas linhas de tratamento, com 31% tendo recebido o

tratamento neoadjuvante e 69%, adjuvante. Contudo, não foi observado impacto da presença de mutação nas curvas de sobrevida global e livre de recorrência nesses dois grupos.

Nosso estudo tem algumas limitações para análise do desfecho clínico e sobrevida de pacientes portadoras de tumores TN. Por exemplo, existem evidências de que pacientes com tumor TN que atingem resposta patológica completa (RPC) após quimioterapia neoadjuvante apresentam uma ótima sobrevida, enquanto que aquelas com doença residual evoluem mal (LIEDTKE et al. 2008). Além disso, tumores *BRCA1*-mutados tendem a responder melhor a agentes alquilantes e sais de platina (BYRSKI et al. 2009; SILVER et al. 2010). Nossa análise concentrou-se em amostras tumorais provenientes de peças cirúrgicas e dessa forma as pacientes que obtiveram RPC foram excluídas do rastreamento de mutação, devido ao fato de não haver neoplasia para ser analisada. Além disso, para a maioria das pacientes com RPC não havia disponibilidade de amostra proveniente de biópsia, o que inviabiliza o estudo. Sendo assim, isso pode ter influenciado a prevalência de mutação em *BRCA1* detectada bem como o fato não termos constatado diferença em sobrevida quando comparadas pacientes mutadas *versus* selvagens. Por outro lado, viés de representatividade do tumor foi minimizado, pois não foram utilizadas amostras provenientes de biópsias e sim áreas da peça cirúrgica selecionadas por patologista como sendo de maior representatividade da neoplasia.

Nossos dados, em conjunto com observações feitas por outros pesquisadores (ROBERTSON et al. 2012; CARRARO et al. 2013), indicam

que mulheres diagnosticadas com tumor TN apresentam um risco aumentado de serem portadoras de mutações em *BRCA1* e por esse motivo devem ser rastreadas para mutações, especialmente se existe histórico familiar de câncer de mama associado. Dessa forma, essa informação poderá auxiliar ao direcionamento de uma terapia mais personalizada, propiciando um melhor cuidado para as pacientes portadoras de tumores TN.

6 CONCLUSÃO

A prevalência de mutação patogênica no gene *BRCA1* nos tumores da mama imunofenótipo triplo-negativo (TN) neste estudo foi de 11,45%, conforme avaliado por sequenciamento paralelo massivo da região codificadora e transição entre éxon e íntron desse gene. Dentre as mutações patogênicas detectadas, 85,7% eram mutações presentes na linhagem germinativa e os 14,3% restantes, mutações somáticas ou adquiridas.

Mulheres que desenvolvem tumores TN com mutação patogênica em *BRCA1* são diagnosticadas com a doença em idade mais jovem (média de 41 anos) do que aquelas cujos tumores não apresentam mutação neste gene (média de 53 anos). Além disso, 25% das pacientes diagnosticadas com tumor TN antes dos 40 anos tinham tumor *BRCA1*-mutado, contra apenas 7,4% com esses tumores nas diagnosticadas acima dos 40 anos. Ainda, mulheres com tumores TN *BRCA1*-mutados apresentam com mais frequência casos de câncer de mama na família.

Essas mulheres também tendem a ter uma melhor sobrevida que as pacientes TN *BRCA1*-selvagens, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa neste estudo. Da mesma forma, a presença de mutação não foi associada com uma melhora ou piora na resposta ao tratamento quimioterápico mais comum (antraciclinas e taxanos) para tumores TN da mama.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alba E, Chacon JI, Lluch A et al. A randomized phase II trial of platinum salts in basal-like breast cancer patients in the neoadjuvant setting. Results from the GEICAM/2006-03, multicenter study. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 136:487-93

Andre F, Job B, Dessen P, et al. Molecular characterization of breast cancer with high-resolution oligonucleotide comparative genomic hybridization array. **Clin Cancer Res** 2009; 15:441-51.

Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. **Am J Hum Genet** 2003; 72:1117-30.

Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T, et al. Breast-Cancer Risk in Families with Mutations in PALB2. **N Engl J Med** 2014; 371:497-506.

Ashton-Prolla P, Vargas FR. Prevalence and impact of founder mutations in hereditary breast cancer in Latin America. **Genet Mol Biol** 2014; 37:234-40.

Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, et al. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26:4282-8.

Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise C A, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. **Cancer** 2007; 109:1721-8.

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

Bernard PS, Parker JS, Mullins M, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **J Clin Oncol** 2009; 27:1160-7.

Berry DA, Cirincione C, Henderson IC, et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. **JAMA** 2006; 295:1658-67.

Bertucci F, Finetti P, Cervera N, et al. How basal are triple-negative breast cancers? **Int J Cancer** 2008; 123:236-40.

Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:1310-6.

Byrski T, Huzarski T, Dent R, et al. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 115:359-63.

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.

Cameron D, Brown J, Dent R, et al. Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2013; 14:933-42

Carey LA, Dees EC, Sawyer L, et al. The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. **Clin Cancer Res** 2007; 13:2329-34.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA** 2006; 295:2492-502.

Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, et al. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. **J Clin Oncol** 2012; 30:2615-23.

Carraro DM, Koike Folgueira MAA, Garcia Lisboa BC, 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 RS, Abreu RB V., Velkova A, et al. Probing structure-function relationships in missense variants in the carboxy-terminal region of BRCA1. **PLoS One** 2014; 9:e97766.

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.

Colleoni M, Cole BF, Viale G, et al. Classical cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy is more effective in triple-negative, node-negative breast cancer: Results from two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:2966-73.

Couch FJ, Hart SN, Sharma P, et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. **J Clin Oncol** 2014; 33:304-11.

Curtis C, Shah SP, Chin S-F, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature** 2012; 486:346-52.

Da Costa ECB, Vargas FR, Moreira A S, et al. Founder effect of the BRCA1 5382insC mutation in Brazilian patients with hereditary breast ovary cancer syndrome. **Cancer Genet Cytogenet** 2008; 184:62-6.

De Ronde JJ, Hannemann J, Halfwerk H, et al. Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 119:119-26.

Dent R, Hanna WM, Trudeau M, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 115:423-8.

Dillenburg CV, Bandeira IC, Tubino TV, et al. Prevalence of 185delAG and 5382insC mutations in BRCA1, and 6174delT in BRCA2 in women of Ashkenazi Jewish origin in southern Brazil. **Genet Mol Biol** 2012; 35:599-602.

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

Esteller M, Silva JM, Dominguez G, et al. Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:564-9.

Esteves VF, Thuler LCS, Amêndola LC, et al. 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; 42:453-7.

Evans DG, Howell A, Ward D, Lalloo F, Jones JL, Eccles DM. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in triple negative breast cancer. **J Med Genet** 2011; 48:520-2.

Ewald IP, Izetti P, Vargas FR, et al. 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; 9:12.

Fachal L, Blanco A, Santamariña M, Carracedo A, Vega A. Large genomic rearrangements of BRCA1 and BRCA2 among patients referred for genetic analysis in Galicia (NW Spain): Delimitation and mechanism of three novel BRCA1 rearrangements. **PLoS One** 2014; 9:e93306.

Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. **Lancet** 1994; 343:692-5.

Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. 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; 62:676-89.

Fostira F, Tsiplaidou M, Papadimitriou C, et al. Prevalence of BRCA1 mutations among 403 women with triple-negative breast cancer: implications for genetic screening selection criteria: a Hellenic Cooperative Oncology Group Study. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 134:353-62.

Foulkes WD, Smith IE, Reis-filho JS, Ph D. Triple-negative breast cancer. **N Engl J Med** 2010; 363:1938-48.

Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:1482-5.

Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. **Breast Cancer Res** 2007; 9:R4.

Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. **Ann Oncol** 2013; 24:2206-23.

Gomes MCB, 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-Angulo AM, Timms KM, Liu S, et al. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. **Clin Cancer Res** 2011; 17:1082-9.

Greenup R, Buchanan A, Lorizio W, et al. Prevalence of BRCA mutations among women with triple-negative breast cancer (TNBC) in a genetic counseling cohort. **Ann Surg Oncol** 2013; 20:3254-8.

Griffiths CL, Olin JL. Triple negative breast cancer: a brief review of its characteristics and treatment options. **J Pharm Pract** 2012; 25:319-23.

Ha G, Roth A, Lai D, et al. Integrative analysis of genome-wide loss of heterozygosity and monoallelic expression at nucleotide resolution reveals disrupted pathways in triple-negative breast cancer. **Genome Res** 2012; 22:1995-2007.

Hartman A-R, Kaldate RR, Sailer LM, et al. Prevalence of BRCA mutations in an unselected population of triple-negative breast cancer. **Cancer** 2012; 118:2787-95.

Hayes DF, Thor AD, Dressler LG, et al. HER2 and response to paclitaxel in node-positive breast cancer. **N Engl J Med** 2007; 357:1496-506.

Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol** 2007; 8:R76.

Joosse SA, Brandwijk KIM, Mulder L, Wesseling J, Hannemann J, Nederlof PM. Genomic signature of BRCA1 deficiency in sporadic basal-like breast tumors. **Genes Chromosom Cancer** 2011; 50:71-81.

Jumppanen M, Gruvberger-Saal S, Kauraniemi P, et al. Basal-like phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptor-negative breast cancers. **Breast Cancer Res** 2007; 9:R16.

Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, et al. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. **Lab Invest** 2002; 82:1525-33.

Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. **Clin Cancer Res** 2005; 11:5175-80.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **J Clin Invest** 2011; 121:2750-67.

Li YT, Ni D, Yang L, Zhao Q, Ou JH. The prevalence of BRCA1/2 mutations of triple-negative breast cancer patients in Xinjiang multiple ethnic region of China. **Eur J Med Res** 2014; 19:35.

Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26:1275-81.

Lim W, Olschwang S, Keller JJ, et al. Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers. **Gastroenterology** 2004; 126:1788-94.

Lim YK, Iau PTC, Ali AB, et al. Identification of novel BRCA large genomic rearrangements in Singapore Asian breast and ovarian patients with cancer. **Clin Genet** 2007; 71:331-42.

Lips EH, Mulder L, Oonk A, et al. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. **Br J Cancer** 2013; 108:2172-7.

Liu X, Shi Y, Maag DX, et al. Iniparib nonselectively modifies cysteine-containing proteins in tumor cells and is not a Bona Fide PARP inhibitor. **Clin Cancer Res** 2012; 18:510-23.

Livasy C A, Karaca G, Nanda R, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Mod Pathol** 2006; 19:264-71.

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

Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 2008; 9:387-402.

Mateo J, Ong M, Tan DSP, Gonzalez M A, De Bono JS. Appraising iniparib, the PARP inhibitor that never was--what must we learn? **Nat Rev Clin Oncol** 2013; 10:688-96.

Matros E, Wang ZC, Lodeiro G, Miron A, Iglehart JD, Richardson AL. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: Relationship to gene expression profiles. **Breast Cancer Res Treat** 2005; 91:179-86.

Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2012; 21:134-47.

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

Mcpherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases: breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. **BMJ** 2000; 321:624-8.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-eidens D, et al. Strong candidate for the breast and ovarian cancer. **Science** 1994; 266:66-71.

Miller K, Wang M, Gralow J, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. **N Engl J Med** 2007; 357:2666-76.

Millot GA, Carvalho MA, Caputo SM, et al. A guide for functional analysis of BRCA1 variants of uncertain significance. **Hum Mutat** 2012; 33:1526-37.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2014/ incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

Nelen MR, Van Staveren WCG, Peeters EAJ, et al. Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. **Hum Mol Genet** 1997; 6:1383-7.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res** 2004; 10:5367-74.

O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, et al. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. **N Engl J Med** 2011; 364:205-14.

Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. **Cancer Res** 2003; 63:6643-50.

Palomba G, Budroni M, Olmeo N, et al. Triple-negative breast cancer frequency and type of BRCA mutation: clues from sardinia. **Oncol Lett** 2014; 7:948-52.

Pern F, Bogdanova N, Schürmann P, et al. Mutation analysis of BRCA1, BRCA2, PALB2 and BRD7 in a Hospital-Based Series of German Patients with Triple-Negative Breast Cancer. **PLoS One** 2012; 7:e47993.

Perou CM, Sùrlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 533:747-52.

Pharoah PD, Guilford P, Caldas C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. **Gastroenterology** 2001; 121:1348-53.

Pharoah PDP, Antoniou A, Bobrow M, Zimmern RL, Easton DF, Ponder BAJ. Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. **Nat Genet** 2002; 31:33-6.

Pilarski R. Cowden syndrome: A critical review of the clinical literature. **J. Genet Couns** 2009; 18:13-27.

Pylkäs K, Erkkö H, Nikkilä J, Sólyom S, Winqvist R. Analysis of large deletions in BRCA1, BRCA2 and PALB2 genes in Finnish breast and ovarian cancer families. **BMC Cancer** 2008; 8:146.

Rakha E A, El-Sayed ME, Green AR, Lee AHS, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. **Cancer** 2007; 109:25-32.

Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, et al. Triple-negative breast cancer: Distinguishing between basal and nonbasal subtypes. **Clin Cancer Res** 2009; 15:2302-10.

Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. **J Pathol** 2006; 208:495-506.

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.

Rodríguez-Pinilla SM, Sarrío D, Honrado E, et al. Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas. **Clin Cancer Res** 2006; 12:1533-9.

Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clin Cancer Res** 2005; 11:5678-85.

Rudnicka H, Masojc B, Van de Wetering T, et al. First recurrent large genomic rearrangement in the BRCA1 gene found in Poland. **Cancer Epidemiol** 2014; 38:382-5.

Rummel S, Varner E, Shriver CD, Ellsworth RE. Evaluation of BRCA1 mutations in an unselected patient population with triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2013; 137:119-25.

Saal LH, Holm K, Maurer M, et al. PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. **Cancer Res** 2005; 65:2554-9.

Seal S, Thompson D, Renwick A, et al. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. **Nat Genet** 2006; 38:1239-41.

Seong M-W, Cho S, Kim K, et al. A multi-institutional study of the prevalence of BRCA1 and BRCA2 large genomic rearrangements in familial breast cancer patients. **BMC Cancer** 2014; 14:645.

Shah SP, Roth A, Goya R, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. **Nature** 2012; 486:395-9.

Shaughnessy JO, Schwartzberg L, Danso MA, et al. Phase III study of iniparib plus gemcitabine and carboplatin versus gemcitabine and carboplatin in patients with metastatic triple-negative breast cancer. **J Clin Oncol** 2014; 32:3840-7.

Silva FC, Lisboa BC, Figueiredo MC, et al. Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. **BMC Med Genet** 2014; 15:55.

Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, et al. Efficacy of neoadjuvant cisplatin in triple-negative breast cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:1145-53.

Sikov WM, Berry DA, Perou CM, et al. Impact of the Addition of Carboplatin and/or Bevacizumab to Neoadjuvant Once-per-Week Paclitaxel Followed by Dose-Dense Doxorubicin and Cyclophosphamide on Pathologic Complete Response Rates in Stage II to III Triple-Negative Breast Cancer: CALGB 40603 (Alliance). **J Clin Oncol** 2014, 33:13-21.

Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:10869-74.

Sørli T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:8418-23.

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

The Cancer Genome Atlas Network, Koboldt DC, Fulton RS, et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2012; 490:61-70.

Tischkowitz M, Brunet J-S, Bégin LR, et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. **BMC Cancer** 2007; 7:134.

Turner NC, Reis-Filho JS, Russell A M, et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. **Oncogene** 2007; 26:2126-32.

Tutt A, Robson M, Garber JE, et al. Oral Poly (ADP-ribose) Polymerase Inhibitor Olaparib in Patients with BRCA1 or BRCA2 Mutations and Advanced Breast Cancer: a Proof-of-concept Trial. **Lancet** 2010; 376:235-44.

Villarreal-Garza C, Alvarez-Gómez RM, Pérez-Plasencia C, et al. Significant clinical impact of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexico. **Cancer** 2015; 121:372-8.

von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. **Lancet Oncol** 2014; 15:747-56

Walsh CS. Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy. **Gynecol Oncol** 2015, S0090-8258:657

Wen YH, Ho A, Patil S, et al. Id4 protein is highly expressed in triple-negative breast carcinomas: Possible implications for BRCA1 downregulation. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 135:93-102.

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.

Xu Y, Diao L, Chen Y, et al. Promoter methylation of BRCA1 in triple-negative breast cancer predicts sensitivity to adjuvant chemotherapy. **Ann Oncol** 2013; 24:1498-505.

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.

Zhang B, Beeghly-Fadiel A, Long J, Zheng W. Genetic variants associated with breast-cancer risk: Comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. **Lancet Oncol** 2011; 12:477-88.

Anexo 1 - Adaptação para preparo de biblioteca usando o kit GeneRead Mix-n-Match

O preparo de biblioteca utilizando o kit GeneRead foi feito conforme indicado no manual do fabricante (GeneRead DNaseq Gene Panel Handbook 11/2012) até a etapa de purificação, que sucede a PCR multiplex de enriquecimento das regiões-alvo, indicada na página 18 do manual. Na sequência, o reparo das extremidades foi feito conforme indicado nas páginas 24-28 do kit Ion Xpress™ Plus Fragment Library Preparation User Guide corrigindo a proporção dos reagentes para 25uL (ao invés de 79uL indicado no protocolo). A purificação foi feita mantendo a proporção de 1,8x de Ampure beads, conforme indica o protocolo. Após essa etapa, seguiu-se a ligação dos adaptadores e barcodes com nova purificação, quando então, voltamos a seguir as orientações do protocolo GeneRead na página 22 para seleção dos tamanhos dos amplicoms da biblioteca e purificação, sem a necessidade de fazer a ligação de adaptadores, referenciada nas páginas 23 e 24 desse manual.

Anexo 2 - Condições de PCR para validação por sequenciamento por eletroforese capilar de mutações detectadas por sequenciamento massivo paralelo

Reagente	Volume (uL)	Ciclagem		
		temperatura	tempo	nº ciclos
DNA (~50ng)	2,0	94°C	2 min	1
Taq Platinum HF Buffer 10x	2,0	94°C	45 seg	35
MgSO4 50mM	0,8	Anelamento*	45 seg	35
dNTP 10mM	0,4	68°C	1 min 45s	35
Primer forward	0,4	68°C	10 min	1
Primer reverse	0,4	4°C	infinito	
Taq Platinum HF	0,1			
H2O	13,9			
volume final	20,0			

* Temperaturas de anelamento variam de acordo com o par de *primers* usado (53°-58°C)
 OBS: Volumes de 5uL de produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%

Anexo 3 - Purificação dos fragmentos de PCR

Reagente	Volume (uL)	Ciclagem		
		temperatura	tempo	nº ciclos
SAP buffer	0,3	37°C	30 min	1
Exonuclease I	0,3	80°C	15 min	1
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	1,0	4°C	infinito	
H2O	1,4			
Produto de PCR	15			

Anexo 4 - Reação de sequenciamento por terminação de cadeia

Reagente	Volume (uL)	Ciclagem		
		temperatura	tempo	nº ciclos
BigDye Terminator	1	95°C	2 min	1
BigDye Buffer 5x	1,5	95°C	18 seg	40
Primer	0,5	52°C	18 seg	40
Produto de PCR purificado	3	60°C	4 min	40
H2O	4	4°C	infinito	

Os fragmentos de DNA após a reação de sequenciamento passaram por um processo de precipitação e lavagem. Incubou-se a temperatura ambiente o volume total da reação de sequenciamento com 25uL de álcool absoluto, seguido de centrifugação por 30min a 4000 rpm e a 4°C. Descarta-se o sobrenadante e adiciona-se 35uL de etanol 70% resfriado -20°C e é feita nova centrifugação a 4000 rpm por 20min a 4°C. Foi descartado novamente o sobrenadante e as amostras passaram por secagem a 95°C por 15min, quando então adicionou-se Formamida HD, denaturou-se os fragmentos a 95°C por 3 min e transferiu-se imediatamente para gelo por 2 min adicionais. Por fim, as amostras foram levadas ao equipamento para a eletroforese capilar.

Anexo 5 - Variantes detectadas no gene *BRCA1* em amostras provenientes de pacientes portadoras de tumor imunofenótipo triplo-negativo e suas classificações

Identificação	RGH	Idade ao diagnóstico (anos)	Alteração em BRCA1		Classificação da alteração	Classificação da Paciente
			Tecido Tumoral	Tec. Não-neoplásico		
4956	7010443	66	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
5228	19089	56	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
17755	33863	54	c.2201C>T; p.S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; p.L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; p.E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; p.K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; p.S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; p.S1613G	NA	Sem relevância clínica	
17791	7109640	51	c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	VSI
			c.2641G>A;p.R841Q	ausente	Variante de Significado Incerto	
			ausente	c.2430T>C; p.L771L	Sem relevância clínica	
			ausente	c.2731C>T; p.P871L	Sem relevância clínica	
18030	7036670	87	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
19064	6031846	58	c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
19088	6036449	42	c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	Selvagem

M7	9211070	40	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M15	10228110	46	c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.3537A>G; p.S1140G	NA	Sem relevância clínica	
M32	8311720	34	c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
M255	9108000	73	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
M256	7028990	37	c.120A>G; p.M1V	c.120A>G; p.M1V	Clinicamente relevante	
			c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; p.L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	Mutada (germinativa)
			c.3232A>G; p.E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; p.K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; p.S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; p.S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M257	10325630	60	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; p.L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; p.E1038G	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.3667A>G; p.K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; p.S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; p.S1613G	NA	Sem relevância clínica	

M259	10070640	54	c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M260	10423150	57	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; p.L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; p.E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; p.K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; p.S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; p.S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M261	97004472	69	c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.4158A>G; p.R1347G	NA	Sem relevância clínica	
M262	93019866	81	c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	

M263	10905500	65	c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M264	10908960	57	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M265	11135410	44	c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	

M266	11216100	54	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M267	85048569	63	c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	VSI
M268	11670830	59	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	c.3232A>G; E1038G	Sem relevância clínica	
			c.3475C>G;p.T1119S	c.3475C>G;p.T1119S	Variante de Significado Incerto	
			c.3667A>G; K1183R	c.3667A>G; K1183R	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M269	10418070	29	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M274	7197510	35	sem alterações	NA	(-)	Selvagem

M275	10173900	36	c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M276	7044320	40	c.300T>G; p.C61G	NA	Clinicamente relevante	Mutada
			c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M277	9314150	45	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M278	9336740	41	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M280	10059450	36	c.1242delC; p.L375fs/ c.1243T>A; p.L375Q	c.1242delC; p.L375fs/ c1243T>A; p.Leu375Q	Clinicamente relevante	Mutada (germinativa)
M281	10088190	32	sem alterações	NA	(-)	Selvagem

M282	5051100	38	c.2524delTG; p. V801fs	c.2524delTG; p. V801fs	Clinicamente relevante	Mutada (germinativa)
M283	10166650	42	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
M284	10219410	44	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M285	10291230	36	c.710C>T; p.C196C	NA		Mutada (Somática)
			c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
			c.5622C>T; p.R1835*	ausente	Clinicamente relevante	
M286	10236610	39	c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	

M287	7002378	44	c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	Mutada (germinativa)
			4302C>T; p.Q1395*	4302C>T; p.Q1395*	Clinicamente relevante	
M288	6028373	35	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
M290	10384620	31	c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
M291	7145470	50	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
M292	10219750	34	c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	Mutada (germinativa)
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4215+1G>A; splice donor variant	c.4215+1G>A; splice donor variant	Clinicamente relevante	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4654G>T; S1512I	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M293	10456250	47	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4654G>T; S1512I	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	

M298	10137950	38	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M299	10303960	38	c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
M300	8114360	41	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M302	99027860	61	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	

M303	10717760	41	c.4603G>T; p.R1495M	c.4603G>T; p.R1495M	Clinicamente relevante	Mutada
M304	10814530	70	c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
M305	10924290	42	c.330A>G p.R71G	ausente	Clinicamente relevante	Mutada (Somática)
			c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M308	8395990	59	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
M309	9020070	64	c.3537A>G p.S1140G	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
M310	9107470	46	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M311	10005270	51	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
M312	10016360	48	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
M313	10038180	30	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	

M314	9083700	87	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M315	10157750	58	c.808delAGAC; p.E230fs	c.808delAGAC; p.E230fs	Clinicamente relevante	Mutada (germinativa)
M316	10204730	62	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica				
M319	10303120	48	c.2090A>G; p.Q656Q	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica				
M319	10303120	48	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	

M320	10299060	65	c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
M321	10217840	78	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
M322	9343130	83	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M323	10115830	77	c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M324	8234320	52	c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.4654G>T; p. S1512I	NA	Sem relevância clínica	
M325	11891810	32	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	

M326	11977050	30	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M340T	3020177	75	c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
M341T	4024370	76	c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
M343T	1043293	39	c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M344T	3032973	65	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M345T	3041719	67	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	

M346T	4003624	79	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M347T	4047460	44	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M348T	5012775	46	c.5075G>A; p.M1652I	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
M349T	10272300	35	c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica				

M350T	5028132	44	c.647G>A; p.T175T	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2228A>G; p.T702T	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M351T	6003745	47	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
M352T	6020380	52	c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
M355T	7167270	43	c.300T>G; p.C61G	Indisponível	Clinicamente relevante	Mutada
			c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	
M356T	7186460	48	c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M357T	10385110	36	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	

M358T	10429360	47	c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
M360T	10530470	70	c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M361T	10460200	73	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M362T	10501230	42	c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.3537A>G; p.S1140G	NA	Sem relevância clínica	
M363T	10513290	77	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
			c.5075G>A; p.M1673I	NA	Sem relevância clínica	

M364T	10367820	50	c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M365T	10499620	50	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
M366T	10455980	34	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M367T	10557240	56	c.233G>A; p.K37K	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
M368T	10554540	79	c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	

M369T	10619020	50	c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	Mutada
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3117G>C; p.E1000Q	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
			c.5382insC; p.S1755fs	Indisponível	Clinicamente relevante	
M370T	10587170	48	c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	VSI
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
			c.5227A>G; Y1703C	c.5227A>G; Y1703C	Variante de Significado Incerto	
M371T	10653910	70	c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
M372T	10643530	54	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
M373T	10702100	44	c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M374T	10689180	56	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	

M376T	10815440	70	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
M377T	6016766	46	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M378T	9140070	65	c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M379T	10816040	32	c.2640C>T; p.R841W	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.3238G>A; p.S1040N	NA	Sem relevância clínica	
			c.5236G>C; p.G1706A	NA	Sem relevância clínica	
M380T	10731390	51	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
M381T	11638090	83	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M382T	11910170	39	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
M384T	12048960	51	c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4654G>T; p.S1512I	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	

M385T	12190280	33	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
M386T	12189090	49	c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
MIC20	1023772	50	c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
MIC21	1044621	43	c.2201C>T; p.S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; p.L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; p.E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; p.K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; p.S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; p.S1613G	NA	Sem relevância clínica	
MIC25	1053191	54	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
MIC68	4000137	47	c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
MIC82	5006732	51	c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
MIC134	6029809	37	c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	Selvagem

MIC137T	6038123	44	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
MIC141T	6053840	61	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
MIC142	7015020	58	c.676C>A; p.S186Y	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; S1613G	NA	Sem relevância clínica	
MIC144T	7121810	64	c.1186A>G; Q356R	NA	Sem relevância clínica	VSI
			c.3942A>G; p.I1275V	NA	Variante de Significado Incerto	
MIC146a	8014120	18	c.2201C>T; p.S694S	c.2201C/T; p.S694S	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; p.L771L	c.2430T/C; p.L771L	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	c.2731C>T; p.P871L	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; p.E1038G	c.3232A>G; p.E1038G	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; p.K1183R	c.3667A>G; p.K1183R	Sem relevância clínica	
			c.4158A>G; p.R1347G	c.4158A>G; p.R1347G	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; p.S1436S	c.4427T>C; p.S1436S	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; p.S1613G	c.4956A>G; p.S1613G	Sem relevância clínica	

MIC175	5013755	41	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; p.L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; p.E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; p.K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; p.S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; p.S1613G	NA	Sem relevância clínica	
MIC177	6049419	43	c.1186A>G; p.Q356R	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; p.L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; p.E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; p.K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; p.S1436S	NA	Sem relevância clínica	
MIC180	7012659	64	c.4654G>T; p.S1512I	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.4956A>G; p.S1613G	NA	Sem relevância clínica	
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; p.L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; p.E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; p.K1183R	NA	Sem relevância clínica	
MIC183	7131330	40	c.4427T>C; p.S1436S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.4956A>G; p.S1613G	NA	Sem relevância clínica	
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; p.L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; p.E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; p.K1183R	NA	Sem relevância clínica	
c.4427T>C; p.S1436S	NA	Sem relevância clínica				
c.4956A>G; p.S1613G	NA	Sem relevância clínica				

MIC185	7147710	52	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
MIC189	8074870	53	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; p.L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; p.E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; p.K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; p.S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; p.S1613G	NA	Sem relevância clínica	
MIC191	8107410	48	c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
MIC218	9040450	71	sem alterações	NA	(-)	Selvagem
MIC224	9130860	47	c.1186A>G; p.Q356R	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2196G>A; p.D693N	NA	Sem relevância clínica	
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; p.L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; p.E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; p.K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; p.S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; p.S1613G	NA	Sem relevância clínica	
MIC228	9234410	64	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Selvagem
			c.2430T>C; p.L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; p.E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; p.K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; p.S1436S	NA	Sem relevância clínica	
			c.4956A>G; p.S1613G	NA	Sem relevância clínica	

MIC234	9327140	56	c.307T>A; p.L63*	c.307T>A; p.L63*	Clinicamente relevante	Mutada (germinativa)
			c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; p.L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; p.E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; p.K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4427T>C; p.S1436S	NA	Sem relevância clínica	
c.4956A>G; p.S1613G	NA	Sem relevância clínica				
MJ2021a	4025598	27	c.300T>G; p.C61G	c.300T>G; p.C61G	Clinicamente relevante	Mutada (germinativa)
			c.1186A>G; p.Q356R	c.1186A>G; p.Q356R	Sem relevância clínica	
			c.2196G>A; p.D693N	c.2196G>A; p.D693N	Sem relevância clínica	
			c.2201C>T; S694S	c.2201C>T; S694S	Sem relevância clínica	
			c.2430T>C; p.L771L	c.2430T>C; p.L771L	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	c.2731C>T; p.P871L	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; p.E1038G	c.3232A>G; p.E1038G	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; p.K1183R	c.3667A>G; p.K1183R	Sem relevância clínica	
c.4427T>C; p.S1436S	c.4427T>C; p.S1436S	Sem relevância clínica				
c.4956A>G; p.S1613G	c.4956A>G; p.S1613G	Sem relevância clínica				
SM95	8146090	40	c.2201C>T; S694S	NA	Sem relevância clínica	Mutada (germinativa)
			c.2430T>C; p.L771L	NA	Sem relevância clínica	
			c.2731C>T; p.P871L	NA	Sem relevância clínica	
			c.3232A>G; p.E1038G	NA	Sem relevância clínica	
			c.3667A>G; p.K1183R	NA	Sem relevância clínica	
			c.4406C>A; p.T1429*	c.4406C>A; p.T1429*	Clinicamente relevante	
			c.4427T>C; p.S1436S	c.4427T>C; p.S1436S	Sem relevância clínica	
c.4956A>G; p.S1613G	NA	Sem relevância clínica				

Anexo 6 - Custo de reagente de preparo de biblioteca usando Ion Ampliseq BRCA1/2 Panel

	Valor total (US\$)	Valor por amostra (US\$)
Ampliseq Panel	2.322,90	3,09
Library Kit	19.722,24	98,96
IonXpress Barcode	1.728,00	1,32
Total	21.450,24	103,38

Anexo 7 - Custo de reagente de preparo de biblioteca usando Ion Generead BRCA1/2 Panel

	Valor total (US\$)	Valor por amostra (US\$)
GeneRead Panel	2.022,09	84,25
Library Kit	19.722,24	98,96
IonXpress Barcode	1.728,00	1,32
Total	21.450,24	184,54

* Foi feita uma adaptação no protocolo do fabricante que sugeria um kit que se encontrava indisponível, mas que era baseado no mesmo princípio do kit de preparo de biblioteca do Ampliseq. Em resumo, o enriquecimento da região alvo se deu conforme recomendação do Qiagen com posterior ligação de adaptadores e barcodes conforme o protocolo Ampliseq.

Anexo 8 - Custo de reagente de preparo de biblioteca usando Haloplex Target Enrichment Kit Custom

	Valor total (US\$)	Valor por amostra (US\$)
Library Kit and Panel	10.585,05	220,52

Anexo 9 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 24 de abril de 2013.

A

Dra. Dirce Maria Carraro.

Aluno: Rafael Canfield Brianese (Mestrado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1746/13B

“Avaliação da prevalência de mutação no gene BRCA1 em tumores triplo negativos de mama: Associação da mutação com características clínicas e de resposta terapêutica”.

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 23/04/2013, **tomaram conhecimento e aprovaram** o seguinte documento:

- ✓ Solicitação de dispensa de análise ética e apresentação do projeto acima mencionado (datado de abril de 2013, do aluno de Mestrado Rafael Canfield Brianese), por se tratar de um projeto afiliado ao temático “Aspectos moleculares envolvidos no desenvolvimento e progressão do carcinoma ductal de mama: Investigação da progressão do carcinoma *in situ* e do papel da mutação em BRCA1 no tumor triplo negativo”, aprovado pelo CEP sob nº 1746/13.

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa