

**INVESTIGAÇÃO DA DINÂMICA MUTACIONAL
EM TUMORES TRIPLO-NEGATIVOS DA MAMA
ATRAVÉS DO SEQUENCIAMENTO DE DNA
TUMORAL CIRCULANTE**

RAFAEL CANFIELD BRIANESE

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para
obtenção do Título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Brianese, Rafael Canfield

Investigação da dinâmica mutacional em tumores triplo-negativos da mama através do sequenciamento de DNA tumoral circulante / Rafael Canfield Brianese - São Paulo, 2019.

102p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. Neoplasias de Mama Triplo Negativas/Triple Negative Breast Neoplasms. 2. Ácidos Nucleicos Livres/Cell-Free Nucleic Acids. 3. BRCA1/ BRCA1. 4. Recombinação Homóloga/Homologous Recombination. 5. Biópsia Líquida/Liquid Biopsy. 6. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala/High-Throughput Nucleotide Sequencing. 6. Mutação/Mutation

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, força e sabedoria para enfrentar os desafios diários.

Agradeço especialmente às mulheres que participaram dessa pesquisa, concordando em compartilhar um momento difícil de suas histórias para que esse trabalho fosse realizado, sem interesse em benefício próprio, mas tocadas pela vontade de que o melhor cuidado seja proporcionado para todas as pessoas. Tive um grande aprendizado pessoal, tendo a oportunidade de acompanhar os dramas e vitórias na batalha travada contra o câncer, que ainda é uma doença difícil de ser enfrentada. Por isso, sou grato.

Agradecimentos também às muitas pessoas envolvidas na realização desse estudo, a começar pela minha orientadora Dra. Dirce Maria Carraro, pela confiança e mentoria no desenvolvimento desse trabalho, e aos membros do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, especialmente Dra. Giovana T. Torrezan, Dra. Claudia A. A. de Paula e Dra. Karina M. Santiago, que tiveram participação direta na execução do trabalho, e também aos demais integrantes e ex-integrantes pela parceria e bons momentos: Dra. Adriana M. Nakahata, MsC Ana C. Miguez, Ana C. Araújo, Bianca B. Niitsuma, Dra. Bruna D. F. Barros, Dra. Carolina M. Berra, Debora Andrade, Dra. Eliana Vanina Elias, Dr. Felipe Fidalgo, MsC Isabella T. J. Meira, Julia S. Oliveira, Juliana Neves, Juliano Chinoca, Dra. Kivvi D. M Nakamura, MsC. Paulo H. B. Pineda, Dr. Pablo de Nicola, Natalia de Angelis, MsC. Sara I. O Silva, Dra. Vanessa K. Sá.

Agradeço ainda a parceria da Carla Curi (enfermeira do Departamento de Mastologia) e Ananda Lopez (mestranda, orientação Dr. Kenneth Gollob) que foram fundamentais para o recrutamento e coletas de amostras das pacientes. Agradeço ainda a equipe médica dos diversos departamentos que nos auxiliaram na realização do trabalho: Dra. Fabiana B. A. Makdissi em nome da equipe do departamento de

Mastologia, Dr. Vladimir C. C. Lima em nome do Departamento de oncologia Clínica, Dr. Maria Nirvana C. Formiga em nome do Departamento de Oncogenética, Dra. Marina de Brot em nome do Departamento de Anatomia Patológica.

Agradeço também a Jennice Oliveira pela assistência administrativa e bons momentos no CIPE. Agradecimentos também para a equipe do Banco de Macromoléculas fundamentais para a qualidade das amostras do estudo: MsC Ana Paula Suenaga, Dra. Eloisa H. R. Olivieri, Dra. Fernanda Monteiro, Germana Mavignier, Louise D. C. Mota. Em nome da pós-graduação, agradeço também Luciana Pitombeira e demais funcionários da secretaria, fundamentais nessa etapa. Também agradeço a Suely Francisco, em nome da equipe de apoio ao aluno, pelo suporte na elaboração desse trabalho, e a todos os demais colaboradores do A.C.Camargo Cancer Center.

Agradeço aos meus familiares, principalmente minha mãe Damaris, meu pai Raul e irmãos (Raul e Ellen), pela rede de amor e suporte tão importantes para mim. Sou grato também a Aline pelo amor e companheirismo ao longo dessa caminhada de vida.

Por fim agradeço a CAPES, CNPq, FAPESP e Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON) pelo fomento financeiro.

Muito obrigado!

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), do Programa Nacional de Atenção de Apoio a Atenção Oncológica (PRONON) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) através de auxílio à Pesquisa - processo FAPESP número 2013/23277-8; processo CNPq 305464/2013-2; processo PRONON 2500.055.121\2015-12; CAPES bolsa de doutorado.

RESUMO

Brianese RC. **Investigação da dinâmica mutacional em tumores triplo-negativos da mama através do sequenciamento de DNA tumoral circulante**. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer de mama de imunofenótipo triplo-negativo (TN) é considerado um subtipo agressivo correspondendo a 10-20% dos casos. 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). Sendo assim, as terapias hormonais e moleculares efetivas em outros subtipos de câncer de mama, não têm efeito nesses tumores. A quimioterapia sistêmica neoadjuvante é o tratamento mais utilizado nesse subtipo de tumor de mama, sendo que para as pacientes que obtêm resposta patológica completa (RPC) observa-se um excelente prognóstico, entretanto no subgrupo com neoplasia residual observa-se prognóstico ruim. Isso ilustra a heterogeneidade clínica do tumor TN, com um subgrupo de tumores significativamente sensíveis à quimioterapia e outro resistente. Perda de função no gene *BRCA1* tem sido frequentemente reportada em tumores TN de mama, seja por mecanismos genéticos ou epigenéticos. Há evidências de que tumores com deficiência de *BRCA1* apresentam boas respostas a determinadas modalidades terapêuticas, como por exemplo, sais de platina e inibidores de PARP. Assim, a investigação mais detalhada no mecanismo de resposta ao tratamento, em mulheres acometidas com tumores TN, no contexto de deficiência de *BRCA1*, é de grande importância. A detecção de DNA tumoral circulante (ctDNA) tem surgido como uma estratégia pouco invasiva capaz de refletir as mutações presentes nas neoplasias, permitindo um acompanhamento do comportamento tumoral ao longo do tempo com promissor valor preditivo e prognóstico. Dessa forma, esse projeto objetivou investigar a dinâmica mutacional durante o tratamento quimioterápico, antes e após a cirurgia, através da análise de DNA tumoral circulante (ctDNA) como biópsia líquida em plasma de pacientes com tumores TN classificados em hereditários e esporádicos. Investigamos de forma ampla as características genéticas dos tumores TN

e das pacientes em associação com as características clínicas e de resposta a tratamento. Quarenta e três pacientes com tumores TN foram recrutadas para o estudo e submetidas a teste genético para avaliar mutações germinativas patogênicas em genes de predisposição a câncer de mama. Com isso, classificamos 21% dos tumores em hereditários e 79% em esporádicos, onde 7 (16,3%) foram de pacientes portadoras de mutações germinativas em *BRCA1*, uma (2,3%) em *BRCA2*, uma (2,3%) em *TP53*. Além disso, 25 foram portadoras de variantes de significado incerto (58,1%) e 9 (20,9%) casos foram negativos. Desse total, 34 pacientes já foram avaliadas quanto à resposta ao tratamento neoadjuvante, sendo que 18 (53%) pacientes apresentaram doença residual e 16 (47%) evoluíram com RPC. A investigação do tecido tumoral foi possível para 23 casos. Desses, 3 tumores (13%) foram classificados com alta carga mutacional. Ainda, para 18 tumores foi possível identificar variantes somáticas nos painéis utilizados com uma média de 2 variantes/tumor. O gene mais frequentemente mutado foi o *TP53* (65%) seguido de *SYNE1* (16,7%) e outros menos frequentes. Não houve associação entre genes preferencialmente mutados e a classificação dos tumores em hereditários ou esporádicos. Para 17 das 18 pacientes com mutações somáticas detectadas no tumor foi realizada a investigação no DNA circulante no plasma antes do início do tratamento (baseline). Um total de 10 pacientes (58,8%) foi positivo para ctDNA. Observou-se uma tendência de maiores níveis de ctDNA nos casos que evoluíram com doença residual em relação aos que obtiveram resposta patológica completa, sugerindo uma associação entre a quantidade de DNA tumoral e ctDNA. Durante o monitoramento, foi observada que para 7 (41%) casos houve persistência de ctDNA, a qual antecipou achados clínicos como, progressão local e metástase. Nesse trabalho, reforça-se a associação entre inativação de *BRCA1* e os tumores TN e é demonstrado o potencial do monitoramento de ctDNA em amostras de plasma para antecipar progressão da doença mostrando uma ferramenta de grande potencial para monitoramento de pacientes submetidos à quimioterapia.

Descritores: Neoplasias de Mama Triplo Negativas. Ácidos Nucleicos Livres. *BRCA1*. Recombinação Homóloga. Biópsia Líquida. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala. Mutação.

SUMMARY

Brianese RC. **[Investigation of mutational dynamics in triple-negative breast cancer through circulating tumor DNA sequencing]**. São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Triple-negative breast cancer (TNBC) is considered an aggressive breast cancer subtype corresponding to 10-20% of cases. It is characterized by the absence of estrogen (ER) and progesterone (PR) hormonal receptors and lack of overexpression/amplification of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). Thus, hormonal and molecular therapies effective in other breast cancer subtypes have no effect on these tumors. Neoadjuvant systemic chemotherapy is the most widely used treatment for TNBC, and patients with pathological complete response (pCR) have an excellent prognosis, whereas in the subgroup with residual disease, a poor prognosis is observed. This illustrates the clinical heterogeneity of TNBC, with one subset of tumors being sensitive to chemotherapy and one resistant. Loss of function in the *BRCA1* gene has often been reported in TNBC, either by genetic or epigenetic mechanisms. There is evidence that *BRCA1*-deficient tumors have good responses to certain therapeutic modalities, such as platinum salts and PARP inhibitors. Thus, a more detailed investigation of the mechanism of response to treatment in women with TNBC in the context of *BRCA1* deficiency is of great importance. The detection of circulating tumor DNA (ctDNA) has emerged as a noninvasive strategy capable of reflecting the mutations present in the neoplasms, allowing the monitoring of tumor behavior over time with promising predictive and prognostic value. Thus, this project aimed to investigate the mutational dynamics during chemotherapy treatment, before and after surgery, through the analysis of ctDNA as a liquid biopsy in plasma of patients with hereditary and sporadic TNBC. We have broadly investigated the genetic characteristics of TNBC and patients in association with clinical and treatment response characteristics. Forty-three patients with TNBC were recruited to the study and underwent genetic testing to evaluate pathogenic germline mutations in breast cancer predisposing genes. We classified 21%

of tumors as hereditary and 79% as sporadic, where 7 (16.3%) were from patients with germline mutations in *BRCA1*, one (2.3%) in *BRCA2* and one (2.3%) in *TP53*. In addition, 25 (58.1%) had variants of uncertain significance and 9 (20.9%) cases were negative. Of this total, 34 patients have already been evaluated for response to neoadjuvant treatment, and 18 (53%) patients had residual disease and 16 (47%) evolved with pCR. Investigation of tumor tissue was possible for 23 cases. Of these, 3 tumors (13%) were classified with high mutational load. Furthermore, for 18 tumors it was possible to identify somatic variants in the panels used with an average of 2 variants per tumor. The most frequently mutated gene was *TP53* (65%) followed by *SYNE1* (16.7%) and other less frequent genes. There was no association between preferentially mutated genes and tumor classification in hereditary or sporadic. For 17 of the 18 patients with somatic mutations detected in the tumor, circulating plasma DNA was investigated before treatment (baseline). A total of 10 patients (58.8%) were positive for ctDNA. There was a trend for higher levels of ctDNA in cases that evolved with residual disease than in those with pCR, suggesting an association between the amount of tumor DNA and ctDNA. During the monitoring, it was observed that 7 (41%) cases were persistent for ctDNA, which anticipated clinical findings such as local progression and metastasis. In this study, the association between *BRCA1* inactivation and TNBC is reinforced and it is demonstrated the potential of monitoring ctDNA in plasma samples for the anticipation in the identification of disease progression, providing a tool of great potential for monitoring residual disease in patients undergoing chemotherapy.

Key words: Triple Negative Breast Neoplasms. Cell-Free Nucleic Acids. *BRCA1*. Homologous Recombination. Liquid Biopsy. High-Throughput Nucleotide Sequencing. Mutation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática das etapas e proteínas envolvidas no reparo de quebra de fita dupla no DNA por recombinação homóloga .	10
Figura 2	Delineamento do estudo.....	22
Figura 3	Estratégia para remoção das variantes germinativas para identificação de variantes somáticas exclusivas do tecido tumoral.....	33
Figura 4	Representação geral do número de casos para cada resultado gerado	39
Figura 5	Avaliação Germinativa das pacientes diagnosticadas com câncer de mama TN	40
Figura 6	Representação das frequências alélicas das variantes somáticas identificadas em tumor de mama triplo-negativo	63
Figura 7	Índice de carga mutacional dos tumores triplo-negativos da mama de acordo com o status de mutação patogênica germinativa.....	67
Figura 8	Média dos níveis de ctDNA (frequência alélica das variantes somáticas) detectados em amostras de plasma para as pacientes que evoluíram com resposta patológica completa (RPC) e pacientes com tumor residual ($RCB \geq 1$)	68

LISTA DE TABELAS E QUADRO

Tabela 1	Classificação das variantes germinativas identificadas em pacientes diagnosticadas com câncer de mama triplo-negativo.....	42
Tabela 2	Avaliação <i>in silico</i> das variantes germinativas identificadas em pacientes diagnosticadas com câncer de mama triplo-negativo.....	45
Tabela 3	Avaliação somática das pacientes diagnosticadas com tumor triplo-negativo da mama	51
Tabela 4	Avaliação de DNA tumoral circulante (ctDNA) em amostras de DNA de plasma.....	54
Tabela 5	Associação das variáveis clínicas das pacientes com câncer de mama triplo-negativo	64
Tabela 6	Caracterização das pacientes com câncer de mama triplo-negativo ...	69
Quadro 1	Critérios para identificação de variantes genéticas em cfDNA.....	36

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AC-T	regime quimioterápico incluindo antraciclina, ciclofosfamida e taxano
AKT1	AKT serine/threonine kinase 1
ALK	ALK receptor tyrosine kinase
APC	adenomatosis polyposis coli
ATM	ataxia telangiectasia mutated
AURKA	aurora kinase A
AURKB	aurora kinase B
AURKC	aurora kinase C
BAM	binary alignment map
BARD1	BRCA1 associated RING domain 1
BRCA1	Breast Cancer 1, early onset
BRCA2	Breast Cancer 2, early onset
BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
BUB1B	Budding Uninhibited By Benzimidazoles 1 Homolog Beta
CDH1	cadherin 1 (E-cadherin)
CDH2	cadherin 2 (N-cadherin)
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
cfDNA	cell-free DNA
CHEK2	checkpoint kinase 2
CMTN	câncer de mama triplo-negativo
CSMD1	CUB and Sushi multiple domains 1
CSMD3	CUB and Sushi multiple domains 3
ctDNA	circulating tumor DNA
DCC	deleted in colorectal carcinoma (DCC netrin 1 receptor)
DDB2	damage specific DNA binding protein 2
DR	doença residual
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPHA3	EPH receptor A3
EPHA7	EPH receptor A7

<i>EPHB1</i>	EPH receptor B1
ER	estrogen receptor
<i>ERCC2</i>	excision repair cross-complementation group 2
<i>ERCC3</i>	excision repair cross-complementation group 3
<i>FANCD2</i>	Fanconi anemia complementation group D2
<i>FANCF</i>	Fanconi anemia complementation group F
<i>FANCM</i>	Fanconi anemia complementation group M
FDA	Food and Drug Administration
<i>GRM8</i>	glutamate receptor, metabotropic 8
<i>H2AX</i>	H2A histone family, member X
HBOC	Hereditary Breast and Ovarian Cancer
HER2	Human Epithelial growth factor Receptor 2
HGVS	Human Genome Variation Society
IHQ	imunoistoquímica
indel	inserção/deleção
<i>ITGB2</i>	integrin subunit beta 2
<i>KDR</i>	kinase insert domain receptor
<i>KIT</i>	KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
LOH	Loss-of-heterozygosity
<i>LRP1B</i>	low density lipoprotein receptor-related protein 1B
<i>MET</i>	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
METABRIC	Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium
<i>MRE11</i>	MRE11 homolog, double strand break repair nuclease
MRN	Mre11-RAD51-Nbs1
<i>MSH6</i>	mutS homolog 6
<i>mTOR</i>	mechanistic target of rapamycin kinase
<i>MYD88</i>	myeloid differentiation primary response 88
<i>NBN</i>	nibrin
<i>NCOA1</i>	nuclear receptor coactivator 1
<i>NF1</i>	neurofibromin 1
NGS	next-generation sequencing
<i>NOTCH2</i>	notch receptor 2

<i>NUP98</i>	nucleoporin 98
P	patogênica
<i>PALB2</i>	Partner and localizer of BRCA2
PARP	poli adenosina difosfato-ribose polimerase
PCR	polymerase chain reaction
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
<i>PIK3CA</i>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
<i>PKHD1</i>	polycystic kidney and hepatic disease 1 (autosomal recessive)
<i>PMS1</i>	post meiotic segregation increased 1
<i>PMS2</i>	Post meiotic segregation increased 2
PP	provavelmente patogênica
<i>PPARG</i>	peroxisome proliferator activated receptor gamma
PR	progesterone receptor
<i>PTCH1</i>	patched 1
<i>PTEN</i>	phosphatase and tensin homolog
PTP	Painel tumoral personalizado
<i>PTPRD</i>	protein tyrosine phosphatase receptor type D
<i>RAD51C</i>	RAD51 paralog C
<i>RAD51D</i>	RAD51 paralog D
RCB	Residual Cancer Burden
<i>RECQL4</i>	RecQ like helicase 4
RH	recombinação homóloga
<i>RNF213</i>	ring finger protein 213
RPA	Replication protein A
RPC	resposta patológica completa
<i>SAMD9</i>	sterile alpha motif domain containing 9
SBR	Scarf-Bloom-Richardson
<i>SMAD4</i>	SMAD family member 4
<i>SMARCA4</i>	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4
<i>SMUG1</i>	single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1

SNV	single nucleotide variant
STK1	cyclin dependent kinase 7
STK11	serine/threonine kinase 11
SYNE1	spectrin repeat containing nuclear envelope protein 1
TAF1L	TATA-box binding protein associated factor 1 like
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
THBS1	thrombospondin 1
TN	triplo-negativo
TP53	tumor protein p53
TSC2	TSC complex subunit 2
UBAM	unmapped binary alignment map
VCF	variant call format
VEGF	vascular endothelial growth factor
VUS	do ingles, <i>Variant of Uncertain Significance</i>
XPC	xeroderma pigmentosum, complementation group C

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Tumor de Mama Triplo-Negativo.....	3
1.1.1	Aspectos Clínicos Gerais.....	3
1.1.2	Aspectos Moleculares e Genéticos.....	5
1.1.1.2	BRCA1 e outros genes associados à deficiência de recombinação homóloga.....	9
1.1.3	Tratamento dos Tumores TN.....	12
1.2	DNA Tumoral Circulante.....	16
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivos Específicos.....	20
3	METODOLOGIA.....	21
3.1	Pacientes e Amostras Biológicas.....	23
3.1.1	Pacientes.....	23
3.1.2	Amostras Biológicas.....	24
3.2	Plataformas e Painéis para Sequenciamento de nova Geração.....	25
3.2.1	Painéis para investigação de mutações germinativas.....	27
3.2.2	Painel para investigação de mutações somáticas.....	30
3.2.3	<i>Deep-Amplicon Sequencing</i>	34
3.4	Estatística.....	36
4	RESULTADOS.....	38
4.1	Pacientes Recrutadas para o Estudo.....	38
4.2	Investigação de Mutações Germinativas.....	40
4.3	Investigação de Mutações Somáticas no Tumor e Percentual de Resposta....	48
4.4	Investigação de Marcas Tumorais em DNA do Plasma.....	53
4.5	Associação dos Achados Moleculares com as Variáveis Clínicas.....	64

5	DISCUSSÃO.....	71
6	CONCLUSÃO	84
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

APÊNDICES

Apêndice 1 Painel de Genes para Sequenciamento de Nova Geração

Apêndice 2 Painéis Tumorais Personalizados (PTP) para *Deep-Amplicon Sequencing*

Apêndice 3 Abordagens Metodológicas Utilizadas nas Amostras do Estudo

Apêndice 4 Amostras Biológicas

Apêndice 5 Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Aplicado as Pacientes Recrutadas no Estudo

1 INTRODUÇÃO

Segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais prevalente no Brasil e o mais frequente entre mulheres, excluindo-se os casos de câncer de pele não melanoma. Dados para o biênio de 2018-19 estimaram uma incidência de cerca de 59.700 novos casos anuais no Brasil com mais de 13 mil mortes por essa neoplasia (Ministério da Saúde 2018). O principal fator de risco para esse tipo de neoplasia maligna é a idade, sendo que o risco aumenta à medida que a mulher envelhece. Fatores de risco englobam ainda estilo de vida, obesidade, consumo de álcool e tabaco, exposição à radiação, desenvolvimento prévio de doença benigna de mama, uso de contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal, além do histórico familiar (MCPHERSON et al. 2000).

Estima-se que 10% dos casos de câncer de mama são causados por alterações genéticas nas linhagens germinativas (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. Os genes mais importantes associados com esta síndrome são *BRCA1* e *BRCA2*. Mulheres com variantes germinativas patogênicas nesses genes apresentam um risco de 10-30 vezes maior de desenvolver câncer de mama em relação à população em geral, com uma penetrância de 40-80% (ANTONIOU et al. 2003; FACKENTHAL e OLOPADE 2007; KUCHENBAECKER et al. 2017), embora mais recentemente, inativação do gene *PALB2* também tenha sido associada à HBOC (ANTONIOU et al.

2014; EASTON et al. 2015; COUCH et al. 2017). Outros genes com menor prevalência de variantes patogênicas, mas que conferem um risco aumentado ao câncer de mama, também são descritos, como os genes *TP53*, *PTEN*, *STK11*, *CDHI* associados com as síndromes de Li-Fraumeni, Cowden, Peutz Jeghers e câncer gástrico difuso hereditário, respectivamente (NELEN et al. 1997; PHAROAH et al. 2001; OLIVIER et al. 2003; LIM et al. 2004; PILARSKI 2009), além de genes como, *ATM*, *BRIP1*, e *CHEK2* dentre outros (ZHANG et al. 2011; LIM et al. 2004; SEAL et al. 2006; BUYS et al. 2017; COUCH et al. 2017). No Brasil, estudos indicam que variantes germinativas patogênicas no gene *BRCA1* são os eventos mais frequentemente associados ao câncer de mama e ovário hereditário (ESTEVES et al. 2009; CARRARO et al. 2013; SILVA et al. 2014; FERNANDES et al. 2016; ALEMAR et al. 2017; DE SOUZA TIMOTEO et al. 2018). As variantes patogênicas em *BRCA1/2* são bastante heterogêneas, entretanto a presença de variantes recorrentes em *BRCA1/2* sugere que pode haver efeito fundador em determinadas regiões geográficas do país (PALMERO et al. 2018). Além disso, recentemente novos genes têm sido investigados como genes potencialmente associados ao câncer de mama hereditário na população brasileira, incluindo genes de reparo de DNA (*ERCC1* e *SXL4*) e outros genes relacionados a câncer (*NOTCH2*, *ERBB2*, *MST1R* e *RAF1*) (TORREZAN et al. 2018).

O câncer de mama é uma doença heterogênea em termos de biologia tumoral, progressão e resposta às terapias. Diferentes estratégias, baseadas no perfil de expressão gênica e imunofenótipo dos tumores, têm sido usadas na classificação do câncer de mama (PEROU et al. 2000; SØRLIE et al. 2001, 2003; SEONG et al. 2014). A mais usual e adotada na prática clínica é a classificação proposta pelo Consenso

Internacional de Especialistas de Saint Gallen, a qual se baseia em marcadores de imunistoquímica (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, hiperexpressor de HER2 e triplo-negativo (GOLDHIRSCH et al. 2013). Outras classificações têm sido sugeridas baseadas em estudos de expressão gênica (HERSCHKOWITZ et al. 2007; CURTIS et al. 2012), entretanto, ainda existe pouca aplicação clínica para essas divisões.

1.1 TUMOR DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO

1.1.1 Aspectos Clínicos Gerais

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 e progesterona, além da não expressão e/ou amplificação do gene para o receptor 2 do fator de crescimento epitelial humano (HER2/neu - do inglês, *Human Epithelial growth factor Receptor 2*) (CAREY et al. 2006; BAUER et al. 2007; RAKHA et al. 2007). Assim, esses tumores não apresentam os alvos moleculares para as terapias hormonal e molecular que são efetivas nos outros subtipos e, dessa forma, não há uma terapia específica para esses tumores. Sendo assim, o tratamento é feito através de quimioterapia. Além disso, esses tumores tendem a ser maiores ao diagnóstico que os de outros subtipos e frequentemente são carcinomas invasivos de alto grau (CAREY et al. 2006). Os

tumores TN demonstram grande agressividade, um padrão metastático com predileção por órgãos sólidos (principalmente pulmão e cérebro) e recorrência 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 na porcentagem de pacientes que sobrevivem nos primeiros 3-5 anos (74-76% para CMTN versus 89-93% para não-CMTN), 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).

Evidências recentes têm mostrado que tumores de mama do subtipo TN apresentam maior percentual de tumores hereditários em relação aos outros subtipos, ou seja, gerados por variantes patogênicas germinativas em genes de predisposição ao câncer de mama, principalmente ao gene *BRCA1* (CARRARO et al. 2013; BUYS et al. 2017; BRIANESE et al. 2018). Estima-se que 8 a 30% dos tumores TN sejam associados a variantes germinativas em *BRCA1* e *BRCA2*, dependendo da população investigada (GREENUP et al. 2013; COUCH et al. 2014), o que sugere um componente hereditário importante para esses tumores, discutido em mais detalhes adiante. Além disso, os tumores TN, apesar de classificados em uma categoria única, são heterogêneos com relação às características moleculares e evolução clínica das pacientes, conforme mencionado a seguir.

1.1.2 Aspectos Moleculares e Genéticos

Apesar da maioria dos tumores TN serem carcinomas ductais invasivos (ou carcinomas mamários invasivos de subtipo não especial), uma parcela importante deles apresenta tipos histológicos menos comuns, como o medular, metaplásico e o adenoide cístico, os quais estão associados a prognósticos distintos. Tendo em mente essa heterogeneidade, LEHMANN et al. (2011) analisaram o perfil de expressão gênica de 587 tumores TN e identificaram 6 grupos biologicamente diferentes com possíveis implicações em termos de tratamento quimioterápico e drogas-alvo: *basal-like 1* e 2, imuno-modulador, *mesenchymal-like*, *mesenchymalstem-like*, e luminal receptor de andrógeno. O subtipo *basal-like 1* é caracterizado pela expressão elevada de genes relacionados ao ciclo celular e resposta a dano no DNA, enquanto que o *basal-like 2* é enriquecido para sinalização de receptores de crescimento e marcadores mioepiteliais. O subtipo imuno-modulador é composto por antígenos imunológicos e genes envolvidos com citocinas e vias centrais de transdução de sinal imunológico. Ambos os subtipos *mesenchymal-like* e *mesenchymalstem-like* compartilham uma alta expressão de genes envolvidos na transição epitélio-mesênquima e vias de fatores de crescimento, entretanto, o *mesenchymalstem-like* apresenta expressão reduzida de genes relacionados à proliferação celular. Por fim, o luminal receptor de andrógeno é um subtipo caracterizado pela expressão de genes luminiais e é modulado pelo receptor de andrógeno. Além disso, disso linhagens representativas desses subtipos demonstram sensibilidades diferentes a quimioterapias e drogas-alvo (LEHMANN et al. 2011). Sendo assim, esses dados refletem a complexidade molecular dos tumores TN.

Em relação aos aspectos genéticos germinativos associados ao desenvolvimento dos tumores TN, estudos têm mostrado que no tumor de mama TN as variantes patogênicas germinativas no gene *BRCA1* são as mais frequentes, seguidas de genes como *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*, *PTEN*, *CHECK2*, *ATM*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BARD1* entre outros (COUCH 2014; BUYS et al. 2017; COUCH et al. 2017; ELLSWORTH et al. 2019). Estima-se que 70%-90% das mulheres portadoras de variantes patogênicas germinativas em *BRCA1* e que desenvolvem câncer, desenvolvem tumor TN e que, dentre as mulheres portadoras de tumor TN (não selecionadas por idade ou histórico familiar) de 8-30% tenham variante patogênica germinativa em *BRCA1* (GONZALEZ-ANGULO et al. 2011; MAVADDAT et al. 2012; GREENUP et al. 2013; RUMMEL et al. 2013; COUCH et al. 2014). Evidências mostram, também, que tumores TN esporádicos apresentam outras alterações genéticas, como variantes patogênicas em outros genes da via de recombinação homóloga, alterações em número de cópias gênicas e perda de heterozigosidade, de maneira similar aos tumores relacionados às variantes patogênicas germinativas em *BRCA1* (HA et al. 2012; SHAH et al. 2012). As características clínicas compartilhadas por esses tumores levaram TURNER et al. (2004) a propor o termo “*BRCAness*” para definir os tumores esporádicos que, apesar da ausência de variantes patogênicas germinativas em *BRCA1* e *BRCA2*, apresentam comportamento clínico semelhante a esses casos hereditários.

Nosso grupo tem trabalhado no entendimento dos componentes hereditários de tumores e em um estudo foi avaliada a presença de variantes germinativas em mulheres jovens diagnosticadas com câncer de mama, considerando os subtipos tumorais e informações clínico-patológicas (CARRARO et al. 2013). Neste trabalho, os genes

BRCA1, *BRCA2* e *TP53* foram rastreados por sequenciamento, e foi identificada uma alta taxa (50%) de variantes patogênicas germinativas em *BRCA1* em pacientes diagnosticados com tumor TN em idade jovem (≤ 35 anos) independente do status de história familiar (CARRARO et al. 2013). Para refinar esse percentual e ampliar a confiança destes dados em uma casuística maior, em um novo estudo do nosso grupo, rastreamos 131 tumores TN em diferentes idades e encontramos uma taxa de 12% de variantes patogênicas em *BRCA1*, subindo para 26% entre as diagnosticadas até 40 anos. Além disso, a maior parte das variantes patogênicas (93%) era germinativa. Ainda, foi avaliado o status de metilação de *BRCA1* e constatou-se que 21% dos tumores exibiam hipermetilação do promotor, com essa taxa subindo para 28% em pacientes diagnosticadas até 40 anos. Curiosamente, nenhum dos tumores *BRCA1*-mutados apresentou hipermetilação do promotor. Sendo assim, 55% dos tumores TN diagnosticados em mulheres jovens apresentaram perda de função do reparo de DNA por recombinação homóloga, quer seja por variantes patogênicas germinativas em *BRCA1* ou hipermetilação do promotor de *BRCA1*, reforçando a associação entre inativação desse gene e tumores TN.

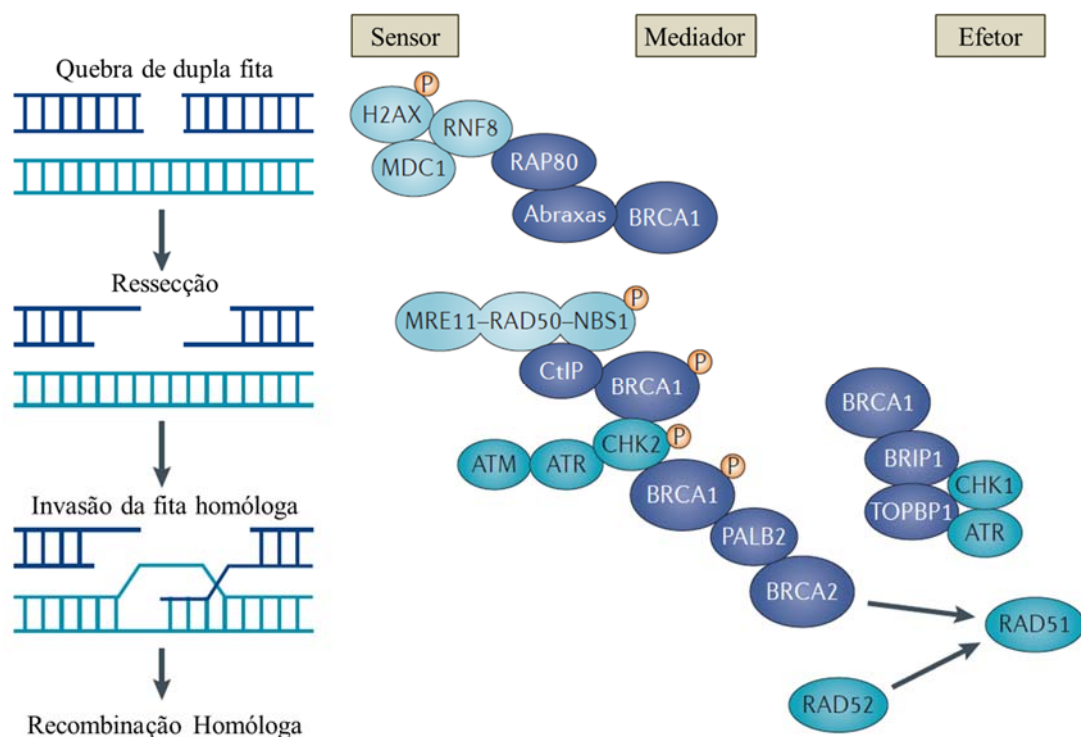
Em outro contexto, existem as alterações específicas do tecido tumoral (somáticas) associadas a perdas e ganhos de função em proteínas relacionadas à tumorigênese (HANAHAN e WEINBERG 2011). A maior parte dos eventos somáticos de perda de função está associada a genes envolvidos na maquinaria de reparo de DNA, como *TP53* e *RBI* (ANDRE et al. 2009; The Cancer Genome Atlas Network et al. 2012). Em contrapartida, eventos somáticos de ganho de função mostraram associação com genes envolvidos na via de sinalização de fosfatidilinositol-3-quinase (*PI3K*), entre outros genes da via PI3K/AKT/mTOR

(SAAL et al. 2005; The Cancer Genome Atlas Network 2012). Em tumores esporádicos, o status de metilação da região promotora de *BRCA1* também é um processo importante. Evidências indicam que a hipermetilação do promotor está associada ao silenciamento do gene, com consequente comprometimento de reparo de quebras de dupla fita pelo mecanismo de recombinação homóloga, em especial no tumor TN (ESTELLER et al. 2000; MATROS et al. 2005; LIPS et al. 2013; XU et al. 2013; POLAK et al. 2017). Colaborando nesse sentido, nosso grupo tem investigado esses tumores e demonstrado que uma parcela significativa dos tumores TN (~30%) apresenta deficiência em reparo de DNA por recombinação homóloga, seja por variantes patogênicas germinativas em *BRCA1* ou hipermetilação somática do promotor gênico de *BRCA1*, fenômeno que é acentuado (~60%) em mulheres jovens (BRIANESE et al. 2018). Ainda nesse contexto, em outro trabalho recente do grupo, foram avaliados tumores TN hereditários associados a *BRCA1* e tumores TN esporádicos (negativos para *BRCA1/2*) por sequenciamento de exoma. Nessa avaliação, foi observado que, para o grupo de tumores esporádicos, havia uma maior proporção de variantes somáticas com alta frequência alélica classificadas como “drivers”, sugerindo que, comparados aos tumores TN *BRCA1* hereditários, os tumores esporádicos requerem um acúmulo maior de eventos somáticos para desencadear o processo tumorigênico (FERREIRA et al. 2019). Esses dados sugerem que diferentes eventos na mesma via biológica (variante germinativa e hipermetilação somática) estão envolvidos na tumorigênese dos tumores TN (BRIANESE et al. 2018). De fato, evidências recentes suportam a hipótese de que diferentes mecanismos levam a perda de recombinação homóloga e que essa perda é um evento frequente em tumores TN, quer seja por eventos germinativos ou somáticos (POLAK et al. 2017).

1.1.1.2 *BRCA1* e outros genes associados à deficiência de recombinação homóloga

O gene *BRCA1* está localizado no braço longo do cromossomo 17 e codifica uma proteína de 1863 aminoácidos (MIKI et al. 1994) que, através dos seus diversos domínios, interage com inúmeras proteínas, colaborando para o controle do ciclo celular e manutenção da estabilidade genômica, especialmente por seu papel no reparo de DNA mediado pelo mecanismo de recombinação homóloga (HUEN et al. 2010). A recombinação homóloga (RH) é o principal e mais acurado mecanismo celular utilizado para a restauração da quebra de fita dupla do DNA, que é uma lesão muito ameaçadora ao material genético da célula, pois ambas as fitas do DNA estão comprometidas ao mesmo tempo, podendo ocasionar rearranjos e instabilidade genômica (CAESTECKER e VAN DE WALLE 2013). Nesse tipo de reparo, o segmento homólogo de DNA da cromátide-irmã é utilizado como molde para o reparo da quebra de fita dupla. A RH é um processo complexo onde proteínas sensores realizam o reconhecimento da lesão e proteínas mediadoras recrutam ou ativam proteínas efetoras que reparam o DNA e controlam o ciclo celular. *BRCA1* interage com inúmeras proteínas e forma vários complexos que são cruciais para a resposta ao dano no DNA. Na etapa inicial, o complexo *BRCA1*-*abraxas*-*RAP80* associa-se aos locais de dano ao DNA; esse processo é dependente da fosforilação da histona *H2AX* (γ *H2AX*) e de *MDC* e *RNF8*. Em seguida, o complexo *BRCA1*-*CtIP* se associa ao complexo *MRN* (*Mre11*-*RAD51*-*Nbs1*), que reconhece a quebra de dupla fita, e é responsável pela ressecção da extremidade 5' da quebra, através da exonuclease *EXO1*. Já o complexo *BRCA1*-*PALB2*-*BRCA2* é importante para a função de *RAD51* que promove a invasão da fita homóloga com consequente pareamento da região danificada com a região complementar íntegra da cromátide-irmã, que serve como

molde para a síntese e reparo do DNA. A fosforilação de BRCA1 dependente de CHK2 também parece ser importante para a função efetora do complexo BRCA1-PALB2-BRCA2 e RH mediada por RAD51. Já o complexo BRCA1-BRIP1-TOPBP1 está associado com o reparo do DNA durante a replicação e pode auxiliar a sinalização mediada por ATR-CHK1. O reconhecimento da quebra de dupla fita também pode ser realizado pelas quinases ATR e ATM, que fosforilam BRCA1, além de outras proteínas relacionadas à BRCA1 e p53 e fazem a mediação para a construção de outros complexos proteicos e ativação de pontos de checagem do ciclo celular (ROY et al. 2012). A Figura 1 representa essas etapas. Dessa forma, BRCA1, através de interações com várias proteínas, orchestra o processo de recombinação homóloga.



Fonte: Adaptado de ROY et al (2012)

Figura 1 - Representação esquemática das etapas e proteínas envolvidas no reparo de quebra de fita dupla no DNA por recombinação homóloga

Conforme comentado anteriormente, existem evidências indicando uma forte inter-relação entre deficiência na via de reparo de DNA por RH, principalmente associada a *BRCA1*, e tumores TN, o que tem despertado bastante interesse em expandir essa caracterização, dado o potencial de explorar essa deficiência para obter melhores resposta a tratamentos com sais de platina e inibidores de PARP, por exemplo, conforme abordado posteriormente. Existem outros genes envolvidos na via de RH que parecem contribuir para a deficiência desse mecanismo. O estudo de BUYS et al. (2017) mostrou que pacientes com tumores TN que apresentaram mutações patogênicas, quase 25% dessas variantes ocorreram em outros genes da via de RH (*ATM, BARD1, BRIP1, CHEK2, NBN, PALB2*), além de *BRCA1* e *BRCA2*, os quais corresponderam a quase 70% das variantes patogênicas detectadas em tumores TN. Vale ressaltar que nesse trabalho apenas 25 genes foram investigados. Análises de dados de sequenciamento do genoma de tumores de mama, incluindo alterações como substituições de base, indels e rearranjos, identificaram padrões de assinaturas associadas à deficiência de *BRCA1/2* (DAVIES et al. 2017). Interessantemente, POLAK et al. (2017) exploraram as assinaturas mutacionais em dados de sequenciamento de exoma de tumores de mama esporádicos e hereditários e identificaram que outros eventos, como por exemplo, mutações em *PALB2*, hipermetilação do promotor de *BRCA1* e de *RAD51C*, estão associados a uma assinatura mutacional inicialmente atribuída a tumores com mutação germinativa em *BRCA1/2* (assinatura 3) (ALEXANDROV et al. 2013), indicando que além de mutações em *BRCA1* outros eventos levam à deficiência de RH de forma significativa nos tumores TN.

Assim, esforços têm sido feitos no sentido de identificar os tumores de mama, especialmente os TN negativos para mutação germinativa em *BRCA1/2*, com indícios de deficiência de RH. As principais estratégias para a detecção de tumores com deficiência de RH envolvem a identificação de aberrações genômicas de larga escala (cicatrizes genômicas), assinaturas mutacionais ou identificação de mutações de ponto em painéis de genes envolvidos em RH por NGS (PELLEGRINO et al. 2019). Testes comerciais como o myChoice HRD (Myriad Genetics) e FoundationFocus CD_XBRCA LOH (Foundation Medicine) são exemplos de testes usados em ensaios clínicos que identificam amostras com alto escore de deficiência de RH. Entretanto, a aplicabilidade desses testes como um fator preditivo de melhores taxas de resposta à platina e inibidores de PARP ainda é uma questão em aberto (PELLEGRINO et al. 2019). Recentemente, foi demonstrado que cerca de 60-70% dos tumores TN apresentam deficiência de RH, dos quais 60-70% eram negativos para mutação de *BRCA1* (LOIBL et al. 2018; STAAF et al. 2019). Contudo, apesar dos tumores de mama e ovário com deficiência de RH terem maiores taxas de resposta à platina e inibidores de PARP, pacientes com tumores sem evidência de deficiência de RH também parecem se beneficiar desses tratamentos (LOIBL et al. 2018; PELLEGRINO et al. 2019).

1.1.3 Tratamento dos Tumores TN

Conforme mencionado inicialmente, tumores TN apresentam prognóstico ruim e o único tratamento é quimioterapia. Curiosamente, apesar de apresentarem recorrência em intervalos menores, pacientes com tumor TN apresentam melhor resposta a quimioterapia que as pacientes ER+ (CAREY et al. 2007; LIEDTKE et al.

2008; COLLEONI et al. 2010), indicando que existe uma parcela consideravelmente sensível ao tratamento. Dessa forma, o tratamento com quimioterapia neoadjuvante se tornou o tratamento padrão para pacientes com tumores TN, e os principais regimes incluem antraciclinas e ciclofosfamida \pm taxanos (AC/ AC-T) (CARAMELO et al. 2019; WAKS e WINER 2019). Além disso, observa-se que aquelas pacientes que evoluem com resposta patológica completa (ausência de tumor na mama e linfonodos) após quimioterapia neoadjuvante apresentam melhor sobrevida quando comparadas às pacientes que apresentam doença residual após a cirurgia (LIEDTKE et al. 2008; CORTAZAR et al. 2014). Entretanto, menos da metade das pacientes com tumores TN que recebem quimioterapia neoadjuvante apresentam resposta patológica completa (LIEDTKE et al. 2008; CORTAZAR et al. 2014), e para a maior parte ainda são necessárias melhores opções de tratamento.

Nesse sentido, benefícios no tratamento de tumores TN com cisplatina e carboplatina estão sendo avaliados, visto que boa parte dos tumores TN apresenta deficiência no reparo de DNA e esses agentes, em última análise, induzem danos ao material genético (DNA-*crosslinking*), os quais não sendo reparados levariam as células tumorais à morte. Os resultados são promissores e mostram que a adição de carboplatina à quimioterapia neoadjuvante aumenta as taxas de resposta patológica completa no momento da cirurgia (VON MINCKWITZ et al. 2014; SIKOV et al. 2015). Entretanto, a extrapolação dessas taxas de resposta em termos de benefícios em sobrevida livre de progressão e sobrevida global ainda não foi demonstrada de forma robusta, e o papel dos sais de platina no tratamento dos tumores TN ainda é incerto (CARAMELO et al. 2019; WAKS e WINER 2019). Estudos avaliando especificamente as pacientes TN portadoras ou não de variantes patogênicas em

BRCA1, como o INFORM (NCT01670500) em andamento, são necessários para melhor categorização do grupo com maior potencial para esse tipo de tratamento. Além disso, a avaliação de outros mecanismos associados à perda de função de *BRCA1* ou outros genes envolvidos no reparo de DNA se mostram necessários para a melhor classificação de sensibilidade desses tumores a esses agentes.

Ainda em relação ao potencial de se explorar os mecanismos de reparo de DNA nos tumores TN, existem os inibidores de poli ADP-ribose polimerase [PARP - do inglês, *poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase*], proteína essa que está envolvida no reparo de lesões de fita simples do DNA. Essa linha de pesquisa propõe o tratamento de pacientes diagnosticadas com tumor TN com variantes patogênicas germinativas em *BRCA1* com quimioterapia combinada a um agente inibidor de PARP. O bloqueio da atividade de PARP durante a quimioterapia induziria um acúmulo de lesões de fita simples que evoluem para quebras de fita dupla, as quais não sendo reparadas nas células deficientes em RH (*BRCA1/2* mutadas) levariam a morte celular. Assim, o tratamento com inibidor de PARP combinado a outro agente de dano ao DNA induziria uma letalidade sintética nas células mutadas em *BRCA1*, podendo trazer benefícios clínicos significativos no tratamento do tumor de mama TN, dependendo do status da mutação do gene nessas pacientes (TUTT et al. 2010; O'SHAUGHNESSY et al. 2011, 2014). O inibidor de PARP Olaparibe (Lymparza - Astra Zeneca) foi aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de câncer de ovário avançado em pacientes portadoras de variantes patogênicas germinativas em *BRCA1* (LEDERMANN et al. 2012, 2014; OZA et al. 2015) e mais recentemente também para tratamento de câncer de mama metastático e HER2(-), após observar-se que o tratamento aumentou a sobrevida livre de progressão

nessas pacientes. (ROBSON et al. 2017). Recentemente, o FDA aprovou também outro inibidor de PARP, Talazoparibe (Talzenna, Pfizer), para pacientes com variantes patogênicas germinativas em *BRCA1/2* e câncer de mama HER2 (-) localmente avançado ou metastático (LITTON et al. 2018). Resultados definitivos sobre os benefícios dos inibidores da PARP no tratamento das pacientes diagnosticadas com câncer de mama em estádios iniciais e portadoras de variantes patogênicas em *BRCA1* são promissores e ansiosamente aguardados.

Existem ainda estudos que investigam outras vias frequentemente relacionadas ao câncer no tumor de mama TN, como a via do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR - do inglês, *epidermal growth factor receptor*) (CAREY et al. 2012) e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF - do inglês, *vascular endothelial growth factor*) (MILLER et al. 2007; CAMERON et al. 2013; EARL et al. 2017). Contudo os resultados mostraram melhora apenas discreta entre as pacientes que receberam terapia anti-EGFR e anti-VEGF e, atualmente, não é claro o benefício da adição desses compostos no tratamento de pacientes com tumores TN.

Mais recentemente, outra modalidade terapêutica que vem sendo ativamente investigada em tumores TN é a imunoterapia, uma vez que a presença de linfócitos infiltrando o tumor e a expressão de moléculas de evasão de resposta imune, como PD-1/PD-L1, têm sido frequentemente reportadas nesses tumores e relacionadas à melhor prognóstico (MITTENDORF et al. 2014; LOI et al. 2019). Estudo recente utilizando o inibidor de checkpoint imunológico atezolizumabe, mostrou resultados bastante positivos em termos de sobrevida, o que levou o FDA a aprovar recentemente o uso desse inibidor no tratamento de tumores TN metastáticos (SCHMID et al. 2018). Além disso, dados preliminares mostraram que pacientes com tumores TN tratadas na

neoadjuvância com outro inibidor de checkpoint imunológico (pembrolizumabe) mostraram um aumento na taxa de resposta patológica completa para as pacientes tratadas (NANDA et al. 2017). Assim, a imunoterapia pode ser uma alternativa valiosa para o tratamento dos tumores TN, em particular aqueles relacionados à inativação de *BRCA1*, uma vez que há evidência de que esses tumores apresentam uma maior formação de neoantígenos e perfil imunogênico (WEN e LEONG 2019). Nessa direção, um trabalho prévio do nosso grupo demonstrou um maior número de variantes somáticas em baixa frequência alélica nos tumores TN hereditários associados a variantes germinativas patogênicas em *BRCA1*, o que, provavelmente, contribui com a maior formação de neoantígenos e imunogenicidade (FERREIRA et al. 2019). De fato, a associação de mutação de perda de função em *BRCA1* e maior formação de neoantígenos e consequente sensibilidade a imunoterapia é alvo de investigação atual e os benefícios da incorporação de inibidores de checkpoint imunológico ao tratamento dos tumores TN podem ser bastante promissores.

1.2 DNA TUMORAL CIRCULANTE

Há várias décadas cientistas demonstraram a existência de moléculas de DNA livre de células, ou cfDNA, presentes na circulação sanguínea (MANDEL e METAIS 1948). Mais recentemente, identificou-se que, em pacientes diagnosticados com câncer, uma parcela muito variável (0,01-93%) dessas moléculas é proveniente do tumor, denominadas DNA tumoral circulante ou ctDNA (JAHR et al. 2001; DIEHL et al. 2008). Postula-se que o ctDNA é principalmente proveniente de processos celulares passivos como, necrose e apoptose, visto que o ctDNA apresenta-se frequentemente

fragmentado (160-180pb), mas também pode ser oriundo de liberação ativa de moléculas de DNA pelas células neoplásicas como uma forma de sinalização celular e indução de transformação maligna em sítios à distância (JAHR et al. 2001; MOULIERE et al. 2011). Sabe-se ainda, que existe uma correlação diretamente proporcional entre a quantidade de ctDNA no plasma ou soro e a carga tumoral dos pacientes, ou seja, quanto maior o tamanho do tumor maior a quantidade de ctDNA (MOULIERE et al. 2011).

Para fins de diagnóstico, a amostra de tecido tumoral ainda é considerada o padrão-ouro para avaliação e detecção de alterações moleculares. Recentemente, têm sido demonstradas limitações, como a questão de representatividade tumoral da biópsia em um tumor sólido, uma vez que as células neoplásicas são heterogêneas intratumoralmente (GERLINGER et al. 2012; VOGELSTEIN et al. 2013). No entanto, mesmo nesse cenário, não se cogita a utilização de ctDNA para fins diagnósticos. Por outro lado, para monitoramento da dinâmica mutacional durante um tratamento, a aquisição de biópsias teciduais seria inadequada uma vez que são procedimentos invasivos e que podem ocasionar complicações clínicas. Assim, nesse cenário, a avaliação de ctDNA é indiscutivelmente um método ideal, permitindo o monitoramento de resposta ao tratamento pela avaliação da dinâmica das alterações genéticas que ocorrem no tumor durante a exposição a um agente, além de ser um método ideal para antecipar recidiva, geralmente detectada primariamente por exames clínicos e de imagem (OLSSON et al. 2015; DE FIGUEIREDO BARROS et al. 2018).

Estudos têm mostrado que o perfil de mutações somáticas observadas no ctDNA é bastante representativo daquele detectado no tumor, indicando que o monitoramento de ctDNA proporciona um excelente retrato do quadro tumoral do

paciente (HIGGINS et al. 2012; DE MATTOS-ARRUDA et al. 2013; MURTAZA et al. 2013; THIERRY et al. 2014). A avaliação genética do DNA livre no plasma pode ser realizada por vários métodos incluindo sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *Next-Generation Sequencing*). NGS pode ser aplicado para cfDNA em diferentes níveis de abrangência, desde avaliação do exoma completo, de painéis de genes ou mutações específicas. Isso permite que o tumor seja monitorado levando em conta aspectos como a presença de doença residual, resposta a terapia, dinâmica da expansão clonal somática e evolução tumoral frente a tratamentos específicos (SHAW et al. 2012; MURTAZA et al. 2013).

Assim, de forma geral, a análise de ctDNA como biópsia líquida pode ser uma ferramenta em potencial no monitoramento de resposta a terapia e de recidiva, pois é um procedimento pouco invasivo com virtualmente nenhuma complicação para o paciente, capaz de captar a heterogeneidade tumoral refletida pelas alterações da arquitetura genética do tumor pela expansão e retração clonal que as células neoplásicas sofrem durante o tratamento quimioterápico. Ainda, é possível obter diversas amostras de plasma ou soro durante diferentes momentos do tratamento para monitorar as alterações moleculares de forma dinâmica, ao invés de realizar uma análise estática através da biópsia tecidual (JAHR et al. 2001).

Dessa forma, a caracterização dos aspectos moleculares dos tumores triplo-negativos da mama, levando em consideração o forte componente hereditário desses tumores, principalmente relacionados à inativação de *BRCA1* (e outros eventos da via de reparo de DNA por recombinação homóloga), é de grande importância, tendo em vista que, apesar dos últimos avanços (sais de platina e inibidores de PARP) as opções de tratamento para esse subtipo de tumor de mama ainda são bastante limitadas. Além

disso, o monitoramento de ctDNA por biópsia líquida durante o tratamento desses tumores pode fornecer informações importantes a respeito da dinâmica mutacional, auxiliando na melhoria do manejo das pacientes acometidas por essa neoplasia e no desenvolvimento da medicina personalizada.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a dinâmica do padrão mutacional durante o tratamento pela avaliação de ctDNA em plasma de pacientes diagnosticadas com tumor de mama TN classificados em esporádicos e hereditários.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Classificar os tumores em hereditários e esporádicos pela realização de teste genético em DNA de sangue periférico utilizando painel de genes de predisposição ao câncer contendo no mínimo *BRCA1* e *BRCA2*.
- 2- Estabelecer um painel com genes frequentemente alterados em tumores TN a partir de análise de grandes coortes (TCGA, METABRIC, etc.), além de dados de sequenciamento de exoma gerados pelo grupo.
- 3- Identificar mutações somáticas em amostras de DNA de tecido tumoral sem tratamento (biópsia).
- 4- Avaliar a dinâmica do padrão mutacional através da análise da frequência das variantes somáticas dos tumores de cada paciente em DNA circulante livre de células (cfDNA) isolado do plasma em diferentes momentos do tratamento.
- 5- Associar as informações da dinâmica mutacional nos genes candidatos com dados clínico-demográficos e de resposta ao tratamento.

3 METODOLOGIA

Este é um estudo unicêntrico prospectivo longitudinal que teve como objetivo investigar o potencial do monitoramento de ctDNA como biópsia líquida na investigação da dinâmica mutacional em pacientes diagnosticadas com tumores triplo-negativos da mama, levando em consideração o status de mutação germinativa no gene *BRCA1*, que é o principal gene associado a esses tumores, e de outros genes de predisposição ao câncer de mama. A Figura 2 ilustra o delineamento do estudo para as pacientes incluídas, explicado com mais detalhes nas subseções deste documento.

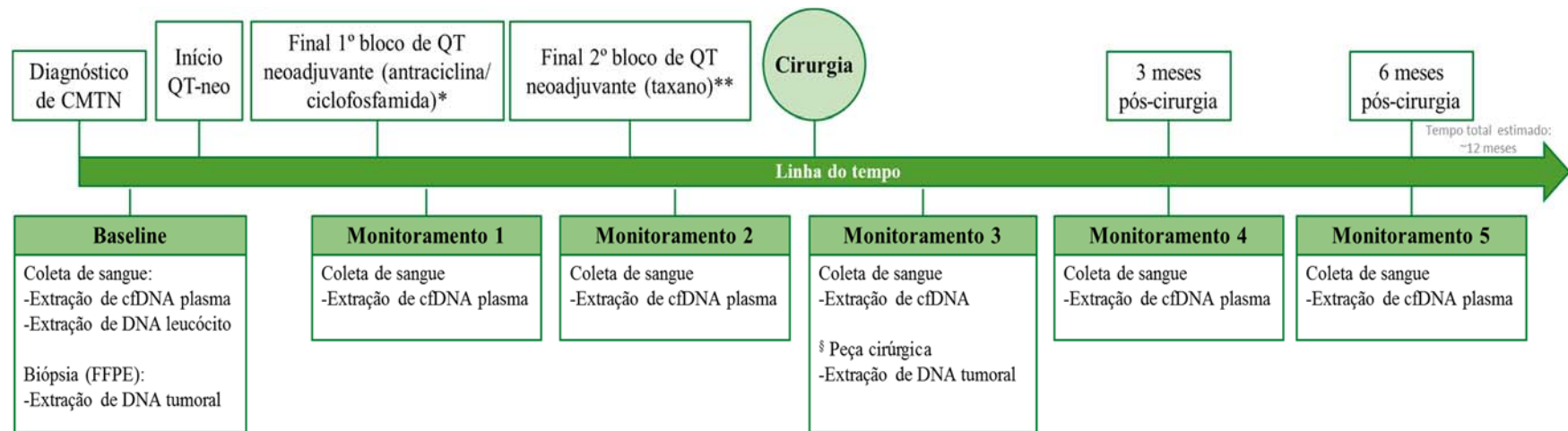


Figura 2 - Delineamento do estudo. Após diagnóstico de câncer de mama triplo-negativo (CMTN), amostras de DNA de tecido não neoplásico (leucócitos) foram extraídas para análise de mutação germinativa (Baseline). Também foram extraídas amostras de DNA provenientes do tecido tumoral (biópsia pré-tratamento) para a identificação de mutações somáticas (Baseline). Ainda nesta etapa, amostras de cfDNA provenientes do plasma foram extraídas e avaliadas para a presença das mutações identificadas no tumor (Baseline). Mutações somáticas previamente identificadas foram investigadas em amostras de cfDNA de plasma em diferentes momentos para investigação da dinâmica mutacional (Monitoramentos 1-5). § Mutações somáticas identificadas na biópsia (pré-tratamento) foram rastreadas na peça cirúrgica (pós-tratamento) somente para as pacientes que apresentaram doença residual ($RCB \geq 1$) após a cirurgia (Monitoramento 3). * O primeiro bloco de quimioterapia consiste tipicamente de tratamento com antraciclina e ciclofosfamida uma vez a cada 14 dias, totalizando 4 ciclos (AC dose densa). ** O segundo bloco de quimioterapia consiste na administração de taxano semanalmente, totalizando 12 semanas. Tratamento com carboplatina foi incorporado ao segundo bloco quimioterápico a depender da escolha do médico/paciente. De maneira geral, o tempo entre o diagnóstico do tumor e a cirurgia das pacientes atendidas no A.C.Camargo Cancer Center foi de 5-6 meses. O tempo de acompanhamento total para cada paciente foi de cerca de 12 meses.

3.1 PACIENTES E AMOSTRAS BIOLÓGICAS

3.1.1 Pacientes

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa-CEP do A.C.Camargo Cancer Center (número 1746/13E SC1206/d) como projeto vinculado ao projeto FAPESP aprovado processo nº 2013/23277-8. A inclusão das pacientes nesse trabalho foi condicionada a assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ver Apêndice 5).

Foram incluídas prospectivamente pacientes atendidas no A.C.Camargo Cancer Center. Os critérios de inclusão foram: mulheres em idade ≥ 18 anos; diagnóstico de câncer de mama triplo-negativo (CMTN); indicação de quimioterapia neoadjuvante baseada em antraciclinas e taxanos \pm carboplatina, assinatura do termo de consentimento livre esclarecido (TCLE). Os critérios de exclusão foram: metástase ao diagnóstico; tratamento em outro local que não o A. C. Camargo. As informações clínicas e de resposta ao tratamento neoadjuvante dada pela avaliação da Carga de Câncer Residual (RCB, do inglês *Residual Cancer Burden*) (SYMMANS et al. 2007) foram obtidas mediante a consulta dos prontuários eletrônicos. O RCB é um método de avaliação de resposta patológica que investiga características anatomopatológicas com valor prognóstico, como a avaliação de linfonodos, tamanho e celularidade do tumor residual, além da porcentagem de carcinoma *in situ* e fornece um score numérico, categorizado em quatro classes: RCB 0 (resposta patológica completa); RCB I (doença residual mínima); RCB II (doença residual moderada); e RCB III (doença residual extensa). O RCB é um método robusto por sua reprodutibilidade e valor prognóstico, especialmente no potencial de identificar pacientes com excelente

prognóstico apesar da presença de doença residual mínima (RCB I) (SYMMANS et al. 2007, 2017).

As pacientes foram referenciadas ao estudo com o auxílio do Dr. Vladimir Claudio Cordeiro de Lima e equipe, do departamento de Oncologia Clínica e da Dra. Fabiana Baroni Makdissi e equipe, do departamento de Mastologia. O diagnóstico de CMTN (caracterização do subtipo tumoral) foi feito conforme os procedimentos de rotina do departamento de Anatomia Patológica. Contamos com a colaboração da Dra. Marina de Brot Andrade para revisão anatomopatológica dos casos e da Dra. Maria Nirvana da Cruz Formiga e equipe, do departamento de Oncogenética, para aconselhamento genético das pacientes.

3.1.2 Amostras Biológicas

Amostras tumorais das biópsias, que foram emblocadas em parafina e utilizadas para o diagnóstico, foram usadas para extração de DNA. Para as pacientes que apresentaram tumor residual na peça cirúrgica, também foram obtidas amostras tumorais da peça cirúrgica emblocadas em parafina ou congeladas a fresco para extração de DNA, conforme o protocolo padronizado do Banco de Macromoléculas do A. C. Camargo Cancer Center (baseado nos kits QIAmp DNA Mini/ FFPE tissue), de forma que obtivéssemos amostras tumorais pré- (biópsia) e, para alguns casos, pós-tratamento (peça cirúrgica).

Também foram coletadas amostras de 4 mL de sangue periférico em tubos BD Vacutainer EDTA K2 para isolamento de DNA da papa leucocitária segundo o protocolo do Banco de Macromoléculas (baseado no kit QIASymphony DNA Midi). Adicionalmente, amostras seriadas de 5 ml sangue periférico foram coletadas em tubos

BD Vacutainer PPT™ ao diagnóstico e ao longo do tratamento para separação do plasma, utilizado para avaliação de ctDNA (Figura 2). Os tubos foram centrifugados dentro de 2 horas após a coleta por 15 minutos a 3000 rpm em temperatura ambiente (TA). O sobrenadante foi transferido para um tubo cônico de 15mL e novamente centrifugado (3000 rpm/15min em TA), sendo o sobrenadante (plasma) transferido para um novo tubo cônico de 15mL e encaminhado para armazenamento a -80 °C até posterior processamento. A extração do DNA circulante livre de células (cfDNA, do inglês *cell-free* DNA) em amostras de 1mL de plasma foi feita com o kit MagMax cell-free DNA isolation kit (ThermoFisher) segundo as recomendações do fabricante. Todas as amostras de DNA usadas no estudo (tumor, leucócito e plasma) foram quantificadas no fluorômetro Qubit 1.0 com o kit Quant-iT dsDNA High Sensitivity (ThermoFisher), segundo as recomendações do fabricante.

3.2 PLATAFORMAS E PAINÉIS PARA SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

Nesse trabalho utilizamos duas tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês, *Next-Generation Sequencing*): Illumina e Ion Torrent. As plataformas NextSeq500 e MiniSeq (Illumina) foram usadas para os painéis germinativos em DNA de leucócitos (Painel 2, Painel 26, Painel 27 e Painel 94 genes). Já a plataforma Ion Proton (Ion Torrent) foi utilizada com os painéis de mutação somática (Painel 93 e Painel 409) nos DNAs dos tumores e nos pools de leucócitos e também para os Painéis Tumoriais Personalizados para investigação das marcas tumorais (ctDNA) nas amostras de plasma. Os Apêndices 1-3 ilustram os painéis e

plataformas de NGS utilizados no estudo, que também serão abordados detalhadamente a seguir.

Para o sequenciamento nas plataformas NextSeq500 e MiniSeq (Illumina), as bibliotecas de DNA, que foram confeccionadas com os painéis explicados mais adiante, são depositadas em uma superfície de vidro, denominada *flowcell*. Também são adicionados reagentes para a reação de amplificação e sequenciamento. São feitas PCR subsequentes (PCR em ponte) que permitem a leitura dos fragmentos de DNA nos dois sentidos. Essa leitura é possível pela adição de nucleotídeos marcados com fluorescência, os quais, quando incorporados, emitem um sinal luminoso e permitem a identificação da base incorporada e determinação da sequência. Para o sequenciamento utilizamos o kit *Mid Output NextSeq*, capaz de gerar 260 milhões de leituras de aproximadamente 150bp em um total de 40Gb, no NextSeq500 e o kit *Mid Output MiniSeq*, capaz de gerar 16 milhões de leituras de aproximadamente 150bp em um total de 2,4Gb, no MiniSeq, conforme os protocolos do fabricante.

Para sequenciamento na plataforma Ion Proton, uma vez confeccionadas as bibliotecas de DNA a partir dos painéis, o passo seguinte é a PCR em emulsão (emPCR). Nessa etapa, os fragmentos de DNA são ligados à superfície de *beads* microscópicas. Idealmente, apenas um fragmento de DNA é capturado por *bead* e amplificado individualmente milhares de vezes durante a emPCR. É necessário ainda selecionar apenas as *beads* carregadas com material amplificado, em um processo chamado enriquecimento, para em seguida proceder a reação de sequenciamento na plataforma IonProton. 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.

Para o sequenciamento foi utilizado o Kit *IonSequencing 200* (Thermo Fisher), de acordo com as recomendações do fabricante, que permite o sequenciamento de fragmentos de aproximadamente 200 pb. A reação de sequenciamento foi feita em um chip, capaz de gerar uma quantidade de dados de até 10Gb bases (60-80 milhões de reads).

Em seguida serão apresentadas as abordagens utilizadas para cada painel.

3.2.1 Painéis para investigação de mutações germinativas

A avaliação das mutações germinativas foi realizada na tecnologia Illumina, conforme mencionado anteriormente, utilizando quatro painéis diferentes, sendo que todos contemplavam 100% da região codificante e transições exon-intron dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, que são os genes mais importantes de predisposição ao câncer de mama. Os painéis utilizados foram: Painel 2 genes *BRCA1/2* (Ampliseq BRCA panel for Illumina - genes *BRCA1* e *BRCA2* - Thermo Fisher), Painel 26 genes (Hereditary Cancer Solution - Sophia Genetics), Painel 27 genes (IDT customizados – Integrated DNA Technologies) ou Painel 94 genes (TruSight Cancer - Illumina), com sequenciamento nas plataformas Illumina NextSeq500 e MiniSeq. Para as amostras testadas com os Painel 2 genes, Painel 27 genes ou Painel 94 genes não foram investigadas alterações em número de cópias nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Para as amostras testadas com o Painel 26 genes foi feita uma análise de alterações em número de cópias pelo software do fabricante (Sophia DDM). Pacientes com teste genético externo reportando variantes germinativas patogênicas foram testadas apenas para a mutação específica por NGS ou Sanger. O Apêndice 1 ilustra as características dos

painéis bem como esquematiza os painéis germinativos empregados para cada paciente.

Com exceção das amostras Adamant22 e 24, que foram preparadas com o Painel 2 genes e sequenciadas na plataforma MiniSeq (illumina), todas as amostras de painéis germinativos foram sequenciadas na plataforma NextSeq500 (illumina). As amostras preparadas com os Painel 2 genes, Painel 27 genes e Painel 94 genes tiveram seus arquivos de sequenciamento processados no BaseSpace Sequence Hub com o *workflow* Enrichment versão 3.1.0 na configuração padrão, gerando arquivos VCF para as análises subsequentes. Brevemente, nessa análise as leituras geradas são alinhadas ao genoma referência pela ferramenta Isaac (RACZY et al. 2013) e a chamada de variantes (SNVs e indels) é feita pela ferramenta Starling (https://github.com/sequencing/isaac_variant_caller). As métricas relacionadas ao alinhamento e chamada de variantes são geradas pelo Pluggable Universal Metrics Analyzer (PUMA). Os arquivos de sequenciamento das amostras preparadas com o Painel 26 genes (Hereditary Cancer Solution - Sophia Genetics) foram processados pelo software Sophia DDM, que realiza o alinhamento, calcula as métricas e faz a chamada de variantes, gerando arquivos VCF. Consideramos como critério satisfatório de qualidade de sequenciamento de painel germinativo as amostras com >96% (100% para os genes *BRCA1* e *BRCA2*) das regiões-alvo cobertas pelo menos 50x.

Uma vez gerados os arquivos VCF foi realizada uma re-anotação e filtragem de variantes (*single-nucleotide variant* – SNV e pequenas inserções/deleções – indels) utilizando-se o software VarSeq v2.1.1 (Golden Helix), incluindo os seguintes filtros: cobertura $\geq 50x$, frequência da variante $\geq 20\%$, SNVs e indels presentes em região codificante ou próximas ao sítio de *splicing* (-20 e +20). As variantes foram

classificadas utilizando os bancos de dados públicos LOVD e Clinvar, seguindo os critérios do *American College of Medical Genetics* (ACMG) (RICHARDS et al. 2015), que classifica as variantes em cinco classes: benigna, provavelmente benigna, de significado clínico incerto (VUS, do inglês *Variant of Uncertain Significance*), provavelmente patogênica e patogênica. Para as VUS com interpretações conflitantes nos bancos de dados, mas que foram reclassificadas por consórcios de reclassificação de variantes (por exemplo, ENIGMA, CIMBA), utilizamos a re-designação indicada pelo consórcio. Variantes não reportadas nos bancos de dados consultados foram classificadas da seguinte maneira: SNVs e indels que resultam em códon de parada prematuro (*nonsense* e indels que mudam a matriz de leitura) e SNVs em sítios de *splicing* (posições -2, -1 e +1, +2) foram classificadas como provavelmente patogênicas; SNVs que promovem a troca de aminoácido (*missense*) ou próximas aos sítios de *splicing* (posições entre -3 a -20 ou +3 a + 20) e indels que não mudam a matriz de leitura (*inframe*) foram consideradas VUS; SNVs que não resultam em mudança de aminoácido (*sinônimas*) foram classificadas como provavelmente benignas.

Todas as pacientes receberam os laudos dos testes genéticos realizados que foram entregues pelos médicos do departamento de Oncogenética do A.C. Camargo Cancer Center, juntamente com o aconselhamento genético pré e pós-teste. No laudo liberado foram reportadas apenas as variantes classificadas como patogênicas, provavelmente patogênicas e as VUS. Não foram reportadas as variantes classificadas como benignas ou provavelmente benignas. Todas as variantes classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas foram validadas por NGS ou sequenciamento Sanger. Em relação às VUS, também foram reportadas as

informações dos programas de predição de patogenicidade *in silico* SIFT, Polyphen-2, Mutation Taster, CADD, Revel e Align-GVGD. Para os programas CADD e Revel, foram classificadas como prejudiciais as variantes com score $\geq 0,5$ e $\geq 0,6$, respectivamente.

3.2.2 Painel para investigação de mutações somáticas

Para a identificação de variantes somáticas avaliamos a viabilidade de confeccionarmos um painel customizado contemplando genes frequentemente mutados em CMTN. Assim, foi realizado um levantamento de literatura e de dados de sequenciamento de exoma produzidos pelo grupo (BANERJI et al. 2012; CURTIS et al. 2012; SHAH et al. 2012; STEPHENS et al. 2012; The Cancer Genome Atlas Network et al. 2012; PEREIRA et al. 2016; FERREIRA et al. 2019), gerando uma lista de 401 genes de interesse para o estudo. Essa lista foi comparada com genes contemplados em painéis disponíveis comercialmente e avaliou-se o custo benefício dos diferentes painéis. Os custos dessa abordagem customizada foram impeditivos sem clara superioridade em relação aos painéis comerciais, que mostraram uma sobreposição satisfatória em relação aos genes de interesse (ver Apêndice 1). Assim, nesse estudo utilizamos os painéis comerciais Painel 93 (Qiaseq Targeted DNA Human Breast Cancer - Qiagen) e Painel 409 (Oncomine Tumor Mutation Load Assay -Thermo Fisher), ambos para sequenciamento na plataforma Ion Proton. O Painel 93 é um painel de 93 genes (aproximadamente 370Kb) associados a câncer de mama e que tem como diferencial a tecnologia de barcodes moleculares, que permite a identificação de variantes com maior sensibilidade. Para esse painel é necessário uma massa de pelo menos 100ng de DNA, sendo essa uma quantidade crítica para ótimo

desempenho. Isso limitou sua utilização, só sendo empregado para amostras cuja biópsia gerou no mínimo 300ng de DNA. Sendo assim, para as amostras que não apresentaram quantidade mínima (<300 ng), utilizamos o Painel 409, que abrange 409 genes (aproximadamente 1,7Mb) frequentemente mutados em tumores sólidos e é aprimorado para amplificação de baixas quantidades de DNA (20 ng) e amostras de material parafinado, embora não incluía a estratégia de molecular barcodes. Além disso, como nosso índice de sucesso com esse painel foi muito melhor do que com o painel de 93 genes e ainda permite realizar uma análise da carga mutacional (número de mutações por megabase) dos tumores, esse foi o painel que foi utilizado para a maioria das amostras do estudo. As listas de genes dos dois painéis utilizados para detecção de mutações somáticas podem ser encontradas no Apêndice 1. Todas as amostras de DNA de tecido parafinado foram tratadas previamente com a enzima Uracil DNA glicosilase (ThermoFisher), conforme recomendações do fabricante, para remoção de bases deaminadas durante o processo de fixação, as quais diminuem a qualidade do sequenciamento.

Os arquivos de sequenciamento não alinhados (UBAM) gerados a partir do sequenciamento das amostras com o Painel 93 foram processados no GeneGlobe Data Analysis Center (software disponibilizado pelo fabricante), utilizando o workflow smCounter V1, que realiza o alinhamento, chamada de variantes e análise de métricas, gerando os arquivos VCF e BAM, utilizados nas análises posteriores. Os dados das amostras sequenciadas a partir do Painel 409 foram alinhados pelo software Torrent Suite 5.10.1. Os arquivos BAM gerados nessa análise foram carregados no Ion Reporter 5.10.5.0 e processados de acordo com os *workflows* Oncomine TML VarCalling - w1 e Oncomine Tumor Mutation Load - w2.0 para chamada de variantes

(arquivos VCF) e análise da carga mutacional, respectivamente. Os arquivos VCF provenientes da análise de ambos os painéis foram utilizados para anotação e filtragem das variantes no software VarSeq v2.1.1 (Golden Helix). Consideramos como critério satisfatório de qualidade de sequenciamento de painel somático as amostras com >85% das regiões-alvo cobertas pelo menos 100x. Os tumores foram classificados de acordo com a carga mutacional em três categorias: alta carga mutacional (≥ 20 mutações/Mb), baixa carga mutacional (< 10 mut/Mb) e carga mutacional intermediária (< 20 e ≥ 10 mut/Mb), de acordo com o proposto por XU et al. (2019).

Para discriminar as variantes somáticas presentes exclusivamente no tumor das variantes germinativas das pacientes, amostras de DNA isolado de leucócitos foram utilizadas em *pool* de 5 pacientes. Essa abordagem foi escolhida por ser uma forma custo-efetiva de eliminar as variantes germinativas e identificar as variantes exclusivas do tecido tumoral das mesmas pacientes. Nessa estratégia, espera-se que variantes germinativas em heterozigose estarão presentes em frequência alélica próximas de 50% no DNA de leucócitos, sendo que no pool de 5 pacientes a frequência esperada das variantes germinativas de cada paciente passa a ser de $\sim 10\%$, conforme ilustrado na Figura 3. Uma vez identificadas as variantes germinativas do pool, elas são subtraídas da lista de variantes identificadas no tumor, resultando na lista de variantes somáticas.

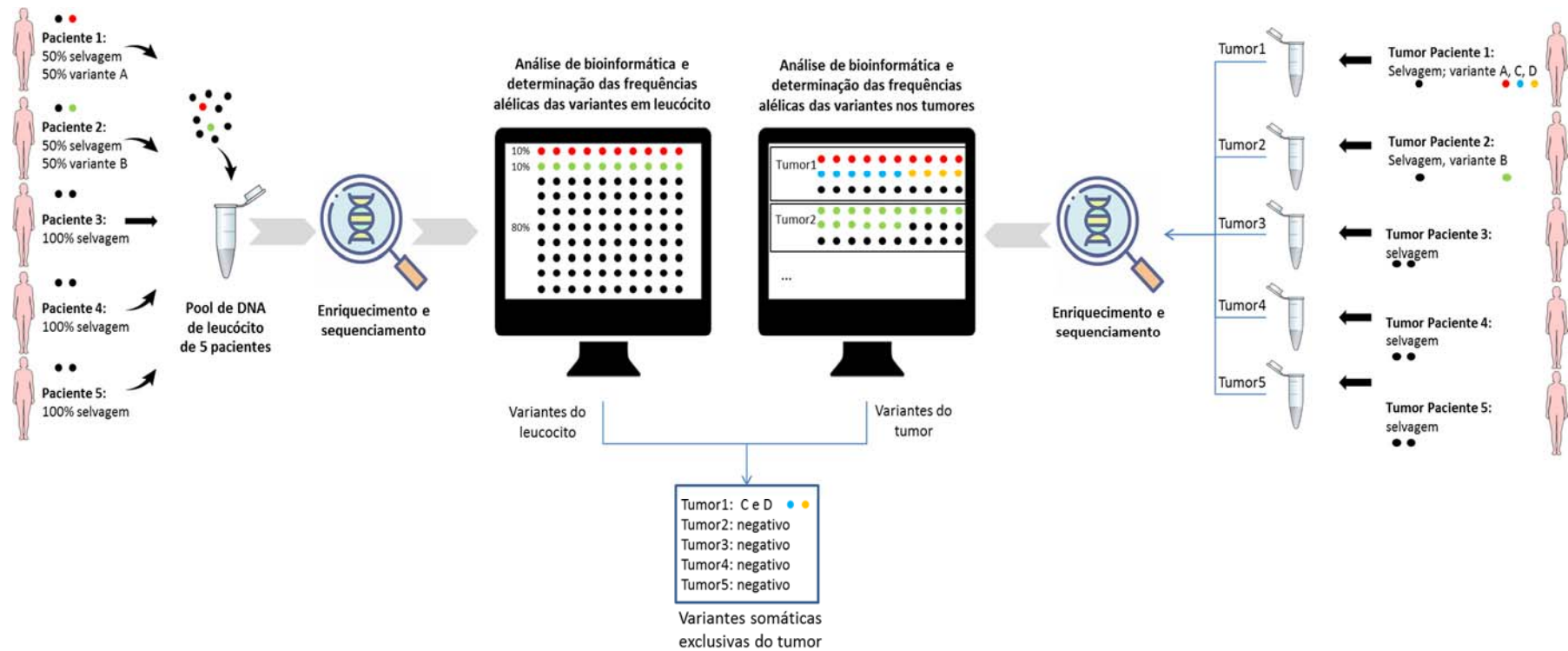


Figura 3 - Estratégia para remoção das variantes germinativas para identificação de variantes somáticas exclusivas do tecido tumoral.

Assim, para a seleção das variantes exclusivas do tecido tumoral foi utilizado como critério de chamada frequência alélica $\geq 5\%$, e cobertura mínima de 100x no DNA de tecido tumoral e que estavam ausentes ou em frequência $\leq 0,1\%$ no DNA de leucócito (pool 5 pacientes). Foram selecionadas variantes no DNA tumoral que ocorreram em região codificante e com impacto na proteína (missense, nonsense, splice site e indels). Foi feita inspeção visual do alinhamento das leituras reportando variantes nas amostras de tecido tumoral e leucócitos para minimizar erros de alinhamento/chamada.

As variantes selecionadas nessa análise foram validadas por sequenciamento de amplicon com alta cobertura utilizando Painéis Tumorais Personalizados.

3.2.3 *Deep-Amplicon Sequencing*

Uma vez identificadas as mutações somáticas específicas de cada tumor, denominadas de marcas tumorais, foram desenhados iniciadores capazes de amplificar essas mutações, ao que foi denominado Painel Tumoral Personalizado (PTP). Os iniciadores foram utilizados em forma de multiplex nas reações de PCR tanto para a validação da variante no DNA do tumor como para avaliação do DNA tumoral circulante (ctDNA) no DNA do plasma (cfDNA). O sequenciamento dos PTPs (amplicons) em multiplex foi realizado na plataforma Ion Proton (*deep-amplicon sequencing*).

O desenho dos iniciadores foi feito com o software Primer 3 (KORESSAAR e REMM 2007) segundo os parâmetros a seguir: tamanho do amplicon de 80-130bp; tamanho do iniciador de 18-24 bases; porcentagem de GC de 30-70%; Diferença da temperatura de *melting* do iniciador *forward* e *reverse* $\leq |2|$ °C e avaliação da

especificidade da região a ser amplificada utilizando a ferramenta In-Silico PCR (<http://genome.ucsc.edu/>). O Apêndice 2 detalha as informações dos iniciadores. A amplificação foi feita em PCR multiplex (DNA tumor e DNA plasma) com o kit Qiagen Multiplex PCR Plus (Volume final 25 μ L; Concentração final: iniciadores 0,16 μ M cada, MasterMix 1x) seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com SybrSafe (ThermoFisher). Amostras amplificadas foram purificadas com Ampure XP Beads (1,8x volume, seguida de 2 lavagens com etanol 70% e eluição em 35 μ L de H₂O) e quantificados com o kit Qubit dsDNA High Sensitivity. Em seguida 10-100ng do produto de PCR purificado foram usados para preparo de biblioteca de DNA usando o kit Ion Plus Fragment Library (Thermo Fisher) segundo as instruções do fabricante.

Na avaliação de ctDNA, como se trata de uma busca de variantes com frequências alélicas que podem chegar a valores bastante baixos, por exemplo, menores de 0,5%, foram estabelecidos alguns critérios de confiança baseado no que foi previamente publicado por MURTAZA et al. (2015). Já é bastante conhecido o aparecimento de variantes artefatuais em baixa frequência em sequenciamento NGS com alta cobertura. Isso impacta negativamente nos resultados gerados e consequentemente na confiança na identificação de variantes verdadeiras. Assim, nesse estudo, para estabelecer o nível de confiança na detecção de mutações somáticas no DNA de plasma das pacientes, para cada PTP foi realizado um sequenciamento controle, usando como molde DNA sabidamente negativo para a variante investigada, para com isso estabelecer a frequência alélica confiável para cada variante de interesse de cada painel. Para tanto, os controles negativos foram sequenciados com alta cobertura vertical (mínimo 20.000x). O resultado do sequenciamento do controle

negativo serviu para estabelecer o ruído de sequenciamento e estabelecer frequências alélicas de confiança para cada variante dentro de cada PTP conforme apresentado no quadro abaixo.

Quadro 1 - Critérios para identificação de variantes genéticas em cfDNA

Frequência da variante $\geq 0,5\%$ e $\geq 2X$ o ruído*	Confiável
Frequência da variante $\geq 0,5\%$ e $\leq 2X$ o ruído	Menos confiável
Frequência da variante $< 0,5\%$ e $> 2X$ o ruído	Menos confiável
Frequência da variante \leq ruído	Negativo

*Ruído = frequência alélica da variante na amostra de DNA sabidamente negativa para essa variante (controle negativo)

Para todas as análises em amostras de DNA de plasma foi feita inspeção visual do alinhamento e determinação da frequência da variante com o software Integrative Genomics Viewer (IGV) (ROBINSON et al. 2011; THORVALDSDOTTIR et al. 2013).

3.4 ESTATÍSTICA

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, cor, invasão vascular e linfática, grau nuclear, grau histológico de Scarff-Bloom-Richardson (SBR), índice mitótico, infiltrado inflamatório, desmoplasia e resposta patológica dada pela avaliação do Residual Cancer Burden.

Para o teste de associação entre variáveis categóricas foi utilizado o método estatístico X^2 ou teste exato de Fisher e Mann-Whitney ou ANOVA para variáveis numéricas. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 PACIENTES RECRUTADAS PARA O ESTUDO

Nesse estudo fomos capazes de recrutar 46 pacientes, sendo que duas delas foram excluídas, pois na revisão posterior os laudos anatomopatológicos evidenciaram diagnóstico não triplo-negativo (tumores ER+). Assim totalizou-se 44 casos confirmados de câncer de mama triplo-negativo (CMTN). Para todos esses casos foi possível obter amostras de sangue periférico para isolamento de DNA de leucócito, que são representativas de células saudáveis e apropriadas para a realização dos testes genéticos de predisposição a câncer.

Como se trata de um estudo prospectivo e a partir do delineamento proposto, a conclusão de todas as coletas pode durar mais de um ano desde o diagnóstico. Além disso, as análises das marcas tumorais no plasma requerem primeiramente a identificação das mesmas no DNA da biópsia tumoral, e esse material passa primeiramente por toda a etapa de diagnóstico e tramitação interna, passando pelo Banco de Macromoléculas para liberação do DNA. Dessa forma, o resultado completo de todas as etapas do estudo foi possível para 17 casos (Figura 4). Entretanto, para cada análise, o número de casos analisados até o momento pode ser diferente, e será detalhado ao longo da apresentação dos resultados. Além disso, vale informar que esse estudo inicialmente era pertencente a um projeto Temático (2013/23277-8/Dirce Maria Carraro) que contemplava a inclusão de 10 pacientes para uma análise de prova de conceito; atualmente está sendo financiado pelo Projeto Pronon (Medicina

personalizada aplicada para o monitoramento terapêutico do paciente oncológico, número 2500.055.121\2015-12 - Dirce Maria Carraro) que contemplará ao todo o recrutamento e análise de 100 pacientes. Dessa forma, o recrutamento de pacientes e as respectivas análises continuam em andamento, e o Apêndice 4 esquematiza as amostras coletadas.



Figura 4 - Representação geral do número de casos para cada resultado gerado.

Em relação às variáveis clínicas das 44 pacientes recrutadas, a idade ao diagnóstico variou de 28 a 73 (média 43,8 e mediana 40 anos). A maior parte das pacientes (83,3% - 35/43) apresentou algum caso de câncer na família, de acordo com os dados levantados nos prontuários eletrônicos. Em relação às características anatomopatológicas, a maioria dos tumores foi de carcinoma ductal invasor sem outra especificação (90,4% - 38/42); 83,7% Grau Nuclear score 3 e 68,3% Grau histológico de S.B.R Nottingham score III; apresentaram necrose (60,5% - 26/43); reação desmoplásica leve ou moderada (97,6% - 41/43); infiltrado inflamatório leve ou

moderado (95,2% - 40/42) e positividade para o marcador ki-67 $\geq 15\%$ (97,7% - 42/43) (Tabela 5).

4.2 INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS

Para caracterização de mutações germinativas nos genes de predisposição a câncer de mama e a consequente classificação em CMTN hereditário ou esporádico foram utilizados quatro painéis disponíveis no laboratório contemplando no mínimo *BRCA1* e *BRCA2*, conforme citado na metodologia (ver Apêndice 1 para a lista completa dos genes). Até o momento, obtivemos os resultados de 43 casos. A análise de variantes germinativas mostrou que 20,9% (9/43) das pacientes apresentaram variantes patogênicas (P) ou provavelmente patogênicas (PP) em *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*. Para uma das pacientes (Adamant36) já havia laudo de teste germinativo reportando a variante germinativa R337H no gene *TP53*, sendo que para esse caso foi considerado o laudo externo e realizada apenas a confirmação da mutação pontual.

Como esperado, a grande maioria das mutações patogênicas foram identificadas no gene *BRCA1* (16,3% - 7/43) confirmando nossos dados previamente publicados (BRIANESE et al. 2018), seguida de *BRCA2* (2,3% - 1/43) e *TP53* (2,3% - 1/43). Curiosamente, como utilizamos painéis multigênicos contendo genes pouco caracterizados, observamos que um grande número de pacientes (58,1% - 25/43) que apresentaram variantes de significado incerto (VUS, do inglês *Variant of Uncertain Significance*). Os genes mais frequentemente alterados por esse tipo de variante foram *ATM*, *BUB1B*, *PALB2* e *PMS2* com 3 (6,9%) casos em cada gene. Além desses, outros genes afetados por VUS foram *APC*, *BRCA2*, *BRIP1*, *PMS1*, *RAD51D*, *RECQL4* e

Tabela 1 - Classificação das variantes germinativas identificadas em pacientes diagnosticadas com câncer de mama triplo-negativo

Paciente	gene	c.(HGVS)	p.(HGVS)	Clinvar	AbraOM	BIPMed	Intervar (ACMG)	Varsome (ACMG)	Frequência populacional (gnomAD Exomes)	LOH (DNA tumor)	Classificação variante
Adamant01	ALK	NM_004304.4:c.1528C>T	p.(Arg510Trp)	não consta	não consta	não consta	Provavelmente benigna	Provavelmente benigna	0.0000954	Sim	VUS
	PALB2	NM_024675.3:c.3059A>G	p.(Gln1020Arg)	VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	0.0000159	Não	VUS
	PTCH1	NM_000264.3:c.901G>A	p.(Asp301Asn)	não consta	não consta	não consta	VUS	VUS	0.0000239	Não	VUS
Adamant02	PMS2	NM_000535.6:c.961G>A	p.(Val321Ile)	VUS	0.000821	não consta	VUS	VUS	0.0000398	Sim	VUS
	ATM	NM_000051.3:c.1759G>A	p.(Gly587Ser)	VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	.	Não	VUS
Adamant03	Não foram identificadas variantes relevantes										
Adamant04	Não foram identificadas variantes relevantes										
Adamant05	ATM	NM_000051.3:c.2281A>T	p.(Thr761Ser)	VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	0.0000438	Não	VUS
	ATM	NM_000051.3:c.4871A>G	p.(His1624Arg)	VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	0.0000597	Não	VUS
Adamant06	PMS2	NM_000535.6:c.1501G>A	p.(Val501Met)	VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	0.0000398	NA	VUS
Adamant07	BRIP1	NM_032043.2:c.679C>G	p.(Gln227Glu)	VUS	não consta	não consta	Provavelmente benigna	Provavelmente benigna	0.0000359	Não	VUS
Adamant08	Não foram identificadas variantes relevantes										
Adamant09	PALB2	NM_024675.3:c.2816T>G	p.(Leu939Trp)	VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	0.000925	Não	VUS
Adamant10	NBN	NM_002485.4:c.633T>A	p.(Asp211Glu)	VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	0.0000319	Não	VUS
Adamant11	BRCA1	NM_007294.3:c.5266dupC	p.(Gln1756Profs*74)	Patogênica	não consta	não consta	NA	Patogênica	0.000183	NA	Patogênica
Adamant12	BARD1	NM_000465.2:c.353A>G	p.(Asn118Ser)	VUS	0.000821	não consta	Provavelmente benigna	Provavelmente benigna	0.0000478	NA	VUS
Adamant13	BRCA2	NM_000059.3:c.9510C>G	p.(Asp3170Glu)	VUS	não consta	não consta	Provavelmente benigna	Provavelmente benigna	.	NA	VUS
	BARD1	NM_000465.2:c.1028C>T	p.(Thr343Ile)	VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	0.000127	NA	VUS
Adamant14	BRCA1	NM_007294.3:c.1712T>C	p.(Ile571Thr)	Conflitante - Provavelmente benigna/VUS	não consta	não consta	Provavelmente benigna	Provavelmente benigna	0.000012	NA	VUS
Adamant15	STK11	NM_000455.4:c.1108G>C	p.(Gly370Arg)	VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	.		VUS
Adamant16	STK11	NM_000455.4:c.894C>A	p.(Phe298Leu)	Conflitante - Provavelmente benigna/VUS	não consta	não consta	Provavelmente benigna	Provavelmente benigna	0.000172	Não	VUS
Adamant17	RAD51D	NM_002878.3:c.544C>G	p.(Leu182Val)	não consta	não consta	não consta	VUS	VUS	.	NA	VUS
Adamant18	ATM	NM_000051.3:c.6741T>G	p.(Ile2247Met)	VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	0.00000797	Não	VUS
Adamant19	MSH6	NM_000179.2:c.3149C>G	p.(Ala1050Gly)	VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	.	Não	VUS
Adamant20	BRCA1	NM_007294.3:c.34C>T	p.(Gln12*)	Patogênica	não consta	não consta	Patogênica	Patogênica	0.00000398	NA	Patogênica
	MRE11	NM_005591.3:c.2076T>A	p.(Asp692Glu)	VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	0.0000123	NA	VUS

Cont/ Tabela 1

Paciente	gene	c.(HGVS)	p.(HGVS)	Clinvar	AbraOM	BIPMed	Intervar (ACMG)	Varsome (ACMG)	Frequência populacional (gnomAD Exomes)	LOH (DNA tumor)	Classificação variante
Adamant21	BRCA1	NM_007294.3:c.5266dupC	p.(Gln1756Profs*74)	Patogênica	não consta	não consta	NA	Patogênica	0.000183	NA	Patogênica
	BRIP1	NM_032043.2:c.3693A>G	p.(Ile1231Met)	VUS	não consta	não consta	Provavelmente benigna	Provavelmente benigna	0.00000399	Sim	VUS
	RAD51D	NM_002878.3:c.26G>C	p.(Cys9Ser)	Conflitante - Provavelmente benigna/VUS	0.000821	não consta	VUS	VUS	0.000372	NA	VUS
Adamant22	Não foram identificadas variantes relevantes										
Adamant24	Não foram identificadas variantes relevantes										
Adamant25	ERCC3	NM_000122.1:c.350A>G	p.(Lys117Arg)	Não classificada	não consta	não consta	VUS	VUS	0.0000318	NA	VUS
	XPC	NM_004628.4:c.2404G>A	p.(Gly802Ser)	Não classificada	0.000821	não consta	VUS	VUS	0.000462	NA	VUS
	BUB1B	NM_001211.5:c.805A>G	p.(Asn269Asp)	VUS	0.002463	não consta	VUS	VUS	0.000306	NA	VUS
	PMS1	NM_000534.4:c.178G>A	p.(Gly60Ser)	não consta	.	.	VUS	VUS	0.0000119	NA	VUS
Adamant26	BUB1B	NM_001211.5:c.391T>G	p.(Leu131Val)	VUS	0.000821	não consta	Provavelmente benigna	Provavelmente benigna	0.00000398	NA	VUS
Adamant27	BRCA1	NM_007294.3:c.3331_3334delCAAG	p.(Gln1111Asnfs*5)	Patogênica	não consta	não consta	NA	Patogênica	.	NA	Patogênica
	MET	NM_001127500.2:c.1640G>A	p.(Arg547Gln)	não consta	não consta	não consta	VUS	VUS	0.0000401	Sim	VUS
	RECQL4	NM_004260.3:c.1972G>A	p.(Val658Met)	VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	0.000017	Não	VUS
Adamant28	PMS1	NM_000534.4:c.174_175delinsTA	p.(Glu59Lys)	Não classificada	não consta	não consta	NA	Provavelmente benigna	.	Sim	VUS
	PMS2	NM_001322014.1:c.2186_2187delTC	p.(Leu729Glnfs)	VUS	0.006061	não consta	NA	Provavelmente patogênica	0.00186 (warning RF)	NA	VUS
	RECQL4	NM_004260.3:c.2543G>A	p.(Arg848His)	VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	0.000116	Não	VUS
	NF1	NM_001042492.2:c.3778A>G	p.(Met1260Val)	VUS	não consta	não consta	VUS	Provavelmente patogênica	0.00000796	Não	VUS
Adamant29	BRCA1	NM_007294.3:c.1687C>T	p.(Gln563*)	Patogênica	.	.	Patogênica	Patogênica	0.000028	NA	Patogênica
Adamant31	APC	NM_000038.5:c.2627G>A	p.(Arg876Gln)	Conflitante - benigna/VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	0.0000518	Não	VUS
	FANCF	NM_022725.3:c.547G>A	p.(Glu183Lys)	VUS	não consta	não consta	VUS	Provavelmente benigna	0.000012	Não	VUS
	DDB2	NM_000107.2:c.1228G>A	p.(Ala410Thr)	Não classificada	não consta	0.004717	VUS	Provavelmente benigna	0.00255	Não	VUS
	FANCM	NM_020937.3:c.2859A>C	p.(Lys953Asn)	VUS	0.000821	não consta	VUS	Provavelmente benigna	0.0011	NA	VUS
	SMAD4	NM_005359.5:c.880A>G	p.(Met294Val)	Conflitante - Provavelmente benigna/VUS	0.000821	não consta	VUS	Benigna	0.000127	Sim	VUS

Cont/ Tabela 1

Paciente	gene	c.(HGVS)	p.(HGVS)	Clinvar	AbraOM	BIPMed	Intervar (ACMG)	Varsome (ACMG)	Frequência populacional (gnomAD Exomes)	LOH (DNA tumor)	Classificação variante
Adamant32	ERCC2	NM_000400.3:c.2114A>G	p.(Asn705Ser)	não consta	não consta	não consta	VUS	VUS	0.000235	Não	VUS
	TSC2	NM_000548.4:c.4216G>T	p.(Asp1406Tyr)	Conflitante - Provavelmente benigna/VUS	não consta	não consta	VUS	Provavelmente benigna	0.0000332	Não	VUS
Adamant33	BUB1B	NM_001211.5:c.2508C>G	p.(His836Gln)	não consta	não consta	não consta	VUS	Provavelmente benigna	0.0000239	Não	VUS
Adamant34	BRCA1	NM_007294.3:c.5266dupC	p.(Gln1756Profs*74)	Patogênica	não consta	não consta	NA	Patogênica	0.000183	NA	Patogênica
Adamant35	BRCA2	NM_000059.3:c.9382C>T	p.(Arg3128Ter)	Patogênica	não consta	não consta	Patogênica	Patogênica	0.0000119	NA	Patogênica
Adamant36	TP53	NM_000546.5:c.1010G>A	p.(Arg337His)	Patogênica	não consta	não consta	Provavelmente patogênica	Provavelmente patogênica	0.000012	NA	Patogênica
Adamant38	Não foram identificadas variantes relevantes										
Adamant39	Não foram identificadas variantes relevantes										
Adamant40	Não foram identificadas variantes relevantes										
Adamant41	SMARCA4	NM_001128849.1:c.1419+4C>T		Conflitante - Provavelmente benigna/VUS	0.000824	não consta	NA	Benigna	0.0000761	Não	VUS
Adamant42	Não foram identificadas variantes relevantes										
Adamant43	BARD1	NM_000465.3:c.344T>C	p.(Leu115Pro)	VUS	0.000821		VUS	VUS	.	NA	VUS
	PALB2	NM_024675.3:c.2659A>G	p.(Ile887Val)	VUS	não consta	não consta	VUS	VUS	.	Não	VUS
Adamant44	APC*	NM_000038.5:c.3920T>A	p.(Ile1307Lys)	Conflitante - Provavelmente benigna/ VUS/ Provavelmente patogênica/ patogênica	0.002463	não consta	Provavelmente benigna	Benigna	0.00201	Não	VUS
Adamant45	CDKN2A	NM_000077.4:c.298G>T	p.(Ala100Ser)	Conflitante - Provavelmente benigna/ VUS	0.000821	não consta	Provavelmente benigna	Benigna	0.0000853	Não	VUS
Adamant46	BRCA1	NM_007294.3:c.4484G>T	p.(Arg1495Met)	Patogênica	não consta	não consta	Provavelmente patogênica	Provavelmente patogênica	0.00000398	NA	Patogênica

* variante reportada com MAF 3,6% gnomAD em população Ashkenazi. Paciente reportou ter ascendência Ashkenazi

Tabela 2 – Avaliação *in silico* das variantes germinativas identificadas em pacientes diagnosticadas com câncer de mama triplo-negativo

Paciente	gene	c.(HGVS)	p.(HGVS)	SIFT	Polyphen	Mutation Taster	CADD raw rankscore	REVEL score	Align-GVGD
Adamant01	ALK	NM_004304.4:c.1528C>T	p.(Arg510Trp)	Tolerada	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	.
	PALB2	NM_024675.3:c.3059A>G	p.(Gln1020Arg)	Danosa	Provavelmente danosa	Danosa	Danosa	Tolerada	Class C0
	PTCH1	NM_000264.3:c.901G>A	p.(Asp301Asn)	Tolerada	Provavelmente danosa	Danosa	Danosa	Tolerada	.
Adamant02	PMS2	NM_000535.6:c.961G>A	p.(Val321Ile)	Tolerada	Benigna	Danosa	Tolerada	Tolerada	Class C0
	ATM	NM_000051.3:c.1759G>A	p.(Gly587Ser)	Tolerada	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	Class C0
Adamant03	Não foram identificadas variantes relevantes								
Adamant04	Não foram identificadas variantes relevantes								
Adamant05	ATM	NM_000051.3:c.2281A>T	p.(Thr761Ser)	Tolerada	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	Class C0
	ATM	NM_000051.3:c.4871A>G	p.(His1624Arg)	Tolerada	Benigna	Danosa	Tolerada	Tolerada	Class C0
Adamant06	PMS2	NM_000535.6:c.1501G>A	p.(Val501Met)	Tolerada	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	Class C0
Adamant07	BRIP1	NM_032043.2:c.679C>G	p.(Gln227Glu)	Tolerada	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	.
Adamant08	Não foram identificadas variantes relevantes								
Adamant09	PALB2	NM_024675.3:c.2816T>G	p.(Leu939Trp)	Danosa	Provavelmente danosa	Danosa	Danosa	Tolerada	Class C55
Adamant10	NBN	NM_002485.4:c.633T>A	p.(Asp211Glu)	Danosa	Provavelmente danosa	Danosa	Danosa	Tolerada	.
Adamant11	BRCA1	NM_007294.3:c.5266dupC	p.(Gln1756Profs*74)
Adamant12	BARD1	NM_000465.2:c.353A>G	p.(Asn118Ser)	Tolerada	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	.
Adamant13	BRCA2	NM_000059.3:c.9510C>G	p.(Asp3170Glu)	Tolerada	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	Class C0
	BARD1	NM_000465.2:c.1028C>T	p.(Thr343Ile)	Tolerada	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	.
Adamant14	BRCA1	NM_007294.3:c.1712T>C	p.(Ile571Thr)	Tolerada	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	Class C0
Adamant15	STK11	NM_000455.4:c.1108G>C	p.(Gly370Arg)	Tolerada	Possivelmente danosa	Danosa	Tolerada	Tolerada	.
Adamant16	STK11	NM_000455.4:c.894C>A	p.(Phe298Leu)	Tolerada	Benigna	Danosa	Tolerada	Tolerada	.
Adamant17	RAD51D	NM_002878.3:c.544C>G	p.(Leu182Val)	Tolerada	Provavelmente danosa	Danosa	Danosa	Tolerada	.
Adamant18	ATM	NM_000051.3:c.6741T>G	p.(Ile2247Met)	Danosa	Possivelmente danosa	Danosa	Tolerada	Tolerada	Class C0
Adamant19	MSH6	NM_000179.2:c.3149C>G	p.(Ala1050Gly)	Danosa	Provavelmente danosa	Danosa	Danosa	Danosa	Class C55
Adamant20	BRCA1	NM_007294.3:c.34C>T	p.(Gln12*)
	MRE11	NM_005591.3:c.2076T>A	p.(Asp692Glu)	Tolerada	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	Class C0
Adamant21	BRCA1	NM_007294.3:c.5266dupC	p.(Gln1756Profs*74)
	BRIP1	NM_032043.2:c.3693A>G	p.(Ile1231Met)	Danosa	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	.
	RAD51D	NM_002878.3:c.26G>C	p.(Cys9Ser)	Danosa	Provavelmente danosa	Danosa	Danosa	Tolerada	.
Adamant22	Não foram identificadas variantes relevantes								
Adamant24	Não foram identificadas variantes relevantes								

Cont/ Tabela 2

Paciente	gene	c.(HGVS)	p.(HGVS)	SIFT	Polyphen	Mutation Taster	CADD raw rankscore	REVEL score	Align-GVGD
Adamant25	ERCC3	NM_000122.1:c.350A>G	p.(Lys117Arg)	Tolerada	Benigna	Danosa	Tolerada	Tolerada	.
	XPC	NM_004628.4:c.2404G>A	p.(Gly802Ser)	Danosa	Provavelmente danosa		Danosa	Tolerada	.
	BUB1B	NM_001211.5:c.805A>G	p.(Asn269Asp)	Tolerada	Possivelmente danosa	Tolerada	Tolerada	Tolerada	.
	PMS1	NM_000534.4:c.178G>A	p.(Gly60Ser)	Danosa	Provavelmente danosa	Danosa	Danosa	Danosa	.
Adamant26	BUB1B	NM_001211.5:c.391T>G	p.(Leu131Val)	Tolerada	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	.
	BRCA1	NM_007294.3:c.3331_3334delCAAG	p.(Gln1111Asnfs*5)
Adamant27	MET	NM_001127500.2:c.1640G>A	p.(Arg547Gln)	Tolerada	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	.
	RECQL4	NM_004260.3:c.1972G>A	p.(Val658Met)	.	Benigna	.	Tolerada	.	.
Adamant28	PMS1	NM_000534.4:c.174_175delinsTA	p.(Glu59Lys)
	PMS2	NM_001322014.1:c.2186_2187delTC	p.(Leu729Glnfs)
	RECQL4	NM_004260.3:c.2543G>A	p.(Arg848His)	Tolerada	Benigna		Tolerada	.	.
	NF1	NM_001042492.2:c.3778A>G	p.(Met1260Val)	Tolerada	Possivelmente danosa	Danosa	Tolerada	Danosa	.
Adamant29	BRCA1	NM_007294.3:c.1687C>T	p.(Gln563*)
Adamant31	APC	NM_000038.5:c.2627G>A	p.(Arg876Gln)	Tolerada	Possivelmente danosa	Danosa	Tolerada	Tolerada	.
	FANCF	NM_022725.3:c.547G>A	p.(Glu183Lys)	Tolerada	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	.
	DDB2	NM_000107.2:c.1228G>A	p.(Ala410Thr)	Tolerada	Benigna	Danosa	Tolerada	Tolerada	.
	FANCM	NM_020937.3:c.2859A>C	p.(Lys953Asn)	Danosa	Provavelmente danosa	Tolerada	Tolerada	Tolerada	.
	SMAD4	NM_005359.5:c.880A>G	p.(Met294Val)	Tolerada	Benigna	Danosa	Tolerada	Tolerada	.
	ERCC2	NM_000400.3:c.2114A>G	p.(Asn705Ser)	Tolerada	Benigna	Danosa	Tolerada	Tolerada	.
	TSC2	NM_000548.4:c.4216G>T	p.(Asp1406Tyr)	Danosa	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	.
Adamant32	TSC2	NM_000548.4:c.4216G>T	p.(Asp1406Tyr)	Danosa	Benigna	Tolerada	Tolerada	Tolerada	.
Adamant33	BUB1B	NM_001211.5:c.2508C>G	p.(His836Gln)	Tolerada	Provavelmente danosa	Tolerada	Tolerada	Tolerada	.
Adamant34	BRCA1	NM_007294.3:c.5266dupC	p.(Gln1756Profs*74)
Adamant35	BRCA2	NM_000059.3:c.9382C>T	p.(Arg3128Ter)
Adamant36	TP53	NM_000546.5:c.1010G>A	p.(Arg337His)
Adamant38	Não foram identificadas variantes relevantes								
Adamant39	Não foram identificadas variantes relevantes								
Adamant40	Não foram identificadas variantes relevantes								
Adamant41	SMARCA4	NM_001128849.1:c.1419+4C>T	
Adamant42	Não foram identificadas variantes relevantes								
Adamant43	BARD1	NM_000465.3:c.344T>C	p.(Leu115Pro)						
	PALB2	NM_024675.3:c.2659A>G	p.(Ile887Val)	Tolerada	Possivelmente danosa		Tolerada	Tolerada	Class C0

Cont/ Tabela 2

Paciente	gene	c.(HGVS)	p.(HGVS)	SIFT	Polyphen	Mutation Taster	CADD raw rankscore	REVEL score	Align- GVGD
Adamant44	APC*	NM_000038.5:c.3920T>A	p.(Ile1307Lys)	Tolerada	Benigna		Tolerada	Tolerada	.
Adamant45	CDKN2A	NM_000077.4:c.298G>T	p.(Ala100Ser)	Tolerada	Provavelmente danosa		Tolerada	Tolerada	.
Adamant46	BRCA1	NM_007294.3:c.4484G>T	p.(Arg1495Met)

4.3 INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES SOMÁTICAS NO TUMOR E PERCENTUAL DE RESPOSTA

Trinta e quatro pacientes já foram submetidas à cirurgia após o tratamento neoadjuvante e, portanto, para essas, foi possível avaliar a resposta à quimioterapia neoadjuvante, sendo que 18 (53%) pacientes apresentaram doença residual e 16 (47%) evoluíram com resposta patológica completa (RPC).

Em relação à investigação das variantes somáticas no tumor, vale informar que essa avaliação é realizada no material de biópsia também usado para diagnóstico. Assim, para todos os 44 casos o material das biópsias foi emblocado em parafina e utilizado para o diagnóstico do câncer da paciente, dentro das etapas da rotina clínica da instituição. Em paralelo, parte do material utilizado para o diagnóstico foi solicitado para a pesquisa levando certo tempo para ser obtido. Além disso, como a quantidade de tecido obtido na biópsia é pequena, pode acontecer de não haver tecido tumoral suficiente para extração de DNA após todas as etapas diagnósticas. Assim, até o momento, foi recebido material de tumor para 28 casos, sendo que para 23 foram gerados dados com qualidade para a avaliação de marcas mutacionais (variantes somáticas). Além disso, dentre as 18 pacientes com doença residual após a cirurgia, para 9 delas foi possível obter também amostras do tecido tumoral da cirurgia (pós-tratamento), sendo que 5 delas puderam ser investigadas em relação às mutações somáticas identificadas na biópsia.

Como citado na metodologia, para identificação das variantes somáticas (marcas do tumor) foram utilizados dois painéis: o Painel de 93 genes relacionados a câncer de mama e o Painel de 409 genes relacionados a tumores sólidos, lembrando

que esse último fornece também o número de mutações por megabase que remete à carga tumoral. Para a identificação das mutações somáticas, nove tumores foram sequenciados com o Painel 93 genes e 17 tumores sequenciados com painel 409. Ambos os painéis foram sequenciados na plataforma Ion Proton. Como o painel 409 genes fornece também a informação de carga mutacional, nós decidimos sequenciar com esse painel os 9 tumores previamente sequenciados com o painel 93. No total, dos 28 tumores sequenciados, 27 foram de amostras de DNA do tecido tumoral coletado no momento da biópsia (pré-tratamento) e uma amostra de DNA do material congelado do tumor residual coletado no momento da cirurgia de uma paciente para a qual não dispúnhamos de DNA da biópsia pré-tratamento. Foi possível obter resultado de sequenciamento com qualidade para 23 tumores. Desses, pudemos identificar variantes somáticas em 18 (78%) casos, sendo que para 5 casos não foram identificadas mutações somáticas específicas do tumor com os painéis utilizados. Nos casos de mutação somática positivos, foram detectadas em média 2 variantes por tumor (mínimo 1 e máximo 6), que foram selecionadas para análises posteriores (Tabela 3).

Para os 18 casos com marcas tumorais identificadas foram desenhados iniciadores para investigação das variantes somáticas no DNA no plasma das pacientes. Como citado na metodologia, o plasma foi avaliado de forma personalizada, isso é, com amplicons correspondentes a cada mutação somática identificada nos tumores em forma de multiplex para tumores que apresentaram mais de uma variante. Os PTPs (Painéis Tumorais Personalizados) estão apresentados no Apêndice 2. Os PTPs foram utilizados para a validação das variantes somáticas no DNA do tumor primário pré-tratamento (biópsia) e para avaliar a presença das marcas tumorais no plasma por sequenciamento com alta cobertura (do inglês, *deep-amplicon sequencing*).

Foram identificadas 49 potenciais mutações somáticas pelos painéis nas 18 amostras tumorais. O percentual de validação das 49 variantes identificadas foi de 83,6% (41 de 49) como apresentado na Tabela 3.

Em relação à frequência de mutação por gene, o gene *TP53* foi o mais frequentemente mutado aparecendo como mutação somática em 65,2% dos tumores (15/23) nessa casuística, seguido de *SYNE1* com 13% (3/23) e demais genes menos frequentes. Curiosamente, 2 variantes somáticas em *TP53* apareceram em mais de um tumor: a variante c.637C>T; p.(Arg213Ter), identificada nas pacientes Adamant04 e 28 e a variante c.659A>G; p.(Tyr220Cys), identificada nas pacientes Adamant17 e 18.

Adicionalmente, 23 tumores foram investigados em relação à carga mutacional do tecido tumoral. Nessa análise, 3 (13%) tumores foram classificados com alta carga mutacional; 2 (8,7%) com carga mutacional intermediária e 18 (78,3%) classificados com baixa carga mutacional.

Em relação aos cinco casos para os quais também foi possível avaliar o DNA tumoral pós-tratamento (peça cirúrgica), identificou-se a presença de 12 das 17 (70,5%) variantes somáticas identificadas inicialmente no DNA tumoral pré-tratamento (biópsia). Além disso, não houve diferença significativa na frequência alélica das variantes entre o tecido tumoral pré- e pós-tratamento (média de 26% e 20%, respectivamente), sinalizando que provavelmente a quimioterapia agiu de forma homogênea em todos os clones do tumor.

Tabela 3 - Avaliação somática das pacientes diagnosticadas com tumor triplo-negativo da mama

	ID	Gene	c.DNA (HGVS)	p.(HGVS)	% Tumor no tecido avaliado	Tumor Biopsia (painel)		Tumor Biopsia (PTP)		Tumor residual (PTP)		
						Cobertura	frequência alélica da variante	Cobertura	frequência alélica da variante	Validada	Cobertura	frequência alélica da variante
BRCA1 hereditário	Adamant11	não foram identificadas variantes somáticas			50%						na	na
	Adamant20	<i>FANCD2</i>	NM_033084.4:c.2261G>A	p.Gly754Asp	90%	1506	25.55%	27332	11.7%	sim	48222	10.7%
		<i>PKHD1</i>	NM_138694.3:c.6083A>G	p.Lys2028Arg		1097	22.31%	22127	15.8%	sim	30219	11.8%
		<i>AKT1</i>	NM_005163.2:c.9C>G	p.Asp3Glu		667	16.22%	18119	12.6%	sim	14575	0.0%
		<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.797G>A	p.Gly266Glu		612	62.01%	22873	65.3%	sim	34336	46.5%
		<i>MALT1</i>	NM_006785.3:c.641G>A	p.Ser214Asn		1477	55.79%	89	47.2%	sim	78	14.1%
	Adamant21	<i>MYD88</i>	NM_001172567.1:c.656C>T	p.Ser219Phe	80%	216	5.09%	54895	4.07%	sim	na	na
		<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.544delT	p.Cys182Alafs		141	49.29%	55959	76.38%	sim	na	na
		<i>AURKC</i>	NM_001015878.1:c.374G>A	p.Arg125Lys		153	23.87%	91916	14.12%	sim	na	na
	Adamant29	<i>PPARG</i>	NM_015869.4:c.1512G>C		70%	1013	26.9%	64355	22.3%	sim	na	na
	<i>KDR</i>	NM_002253.2:c.3134G>T			1347	21.7%	124680	16.8%	sim	na	na	
	<i>DCC</i>	NM_005215.3:c.3571C>G			4128	23.9%	87851	19.5%	sim	na	na	
BRCA	Adamant35	<i>PIK3CA</i>	NM_006218.3:c.29T>A	p.Leu10Gln	60%	4124	6.40%	1293840	6.6%	sim	na	na
Esporádico	Adamant01	não foram identificadas variantes somáticas			90%						na	na
	Adamant02	<i>CSMD1</i>	NM_033225.5:c.2750delA	p.His917Profs	NA	1404	9%	88893	8%	sim	na	na
		<i>PTEN</i>	NM_001304717.2:c.728+1G>C			750	30%	26	62%	sim	na	na
		<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.383delC	p.Pro128Leufs		1732	37%	247125	49%	sim	na	na
	Adamant03	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.755_765dupTCACCATCATC	p.Thr256Serfs	NA	2752	16%	31692	6.8%	sim	na	na
		<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.511G>T	p.Glu171Ter		1938	41%	19531	8.1%	sim	na	na
	Adamant04	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.637C>T	p.Arg213Ter	NA	3474	14.16%	17253	14.8%	sim	na	na
	Adamant05	<i>SYNE1</i>	NM_182961.3:c.6632G>C	p.Gly2211Ala	80%	1145	11.16%	24219	2.6%	sim	95347	0.0%*
		<i>SAMD9</i>	NM_017654.3:c.3010A>G	p.Lys1004Glu		2355	9.26%	22140	4.4%	sim	98506	9.9%
		<i>NUP98</i>	NM_016320.4:c.2608G>C	p.Asp870His		2209	5.66%	8122	4.2%	sim	23002	0.0%
	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.1018delA	p.Met340Cysfs		3685	33.00%	4354	32.1%	sim	12571	70.6%	
Adamant09	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.768_769delAC	p.Leu257Glyfs	95%	2604	54%	75893	83%	sim	na	na	
Adamant10	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.743G>A	p.Arg248Gln	75%	3324	66%	135738	30%	sim	147342	26%	

Cont/ Tabela 3

ID	Gene	c.DNA (HGVS)	p.(HGVS)	% Tumor no tecido avaliado	Tumor Biopsia (painel)		Tumor Biopsia (PTP)			Tumor residual (PTP)	
					Cobertura	frequência alélica da variante	Cobertura	frequência alélica da variante	Validada	Cobertura	frequência alélica da variante
Adamant12		não foram identificadas variantes somáticas		90%						na	na
Adamant13		não foram identificadas variantes somáticas		70%						na	na
Adamant15		não foram identificadas variantes somáticas		80%						na	na
Adamant16	<i>EPHA3</i>	NM_005233.5:c.1325C>A	p.Thr442Lys	80%	3949	26.60%	14382	27.5%	sim	70850	7.4%
	<i>EPHA7</i>	NM_004440.3:c.2274C>A	p.Asp758Glu		2018	20.90%	8307	18.5%	sim	25073	10.8%
	<i>SYNE1</i>	NM_182961.3:c.12880G>A	p.Asp4294Asn		1490	14.90%	18642	8.53%	sim	100705	0.07%
	<i>SMUG1</i>	NM_014311.2:c.452A>G	p.Gln151Arg		313	5.11%	23340	0.1%	não		
	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.958A>T	p.Lys320Ter		1694	39.22%	34928	24.2%	sim	129515	9.2%
	<i>AURKB</i>	NM_001284526.1:c.110C>T	p.Ser37Phe		464	9.42%	8714	3.1%	sim	22550	2.5%
	<i>CDH2</i>	NM_001792.4:c.1678G>T	p.Asp560Tyr		4122	8.35%	43628	7.8%	sim	211811	0.1%
Adamant17	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.659A>G	p.Tyr220Cys	90%	713	59.26%	228498	52.0%	sim	na	na
	<i>AURKA</i>	NM_003600.3:c.410G>T	p.Arg137Leu		733	27.69%	369677	25.1%	sim	na	na
Adamant18	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.659A>G	p.Tyr220Cys	50%	1063	37.96%	32685	37.7%	sim	na	na
Adamant19	<i>NCOA1</i>	NM_003743.4:c.3405G>C	p.Met1135Ile		1785	7.3%
	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.844C>T	p.Arg282Trp		892	50.4%
Adamant22	<i>NOTCH2</i>	NM_024408.3:c.4238T>A	p.Leu1413His	40%	707	6.9%	231926	0.030%	não		
	<i>LRP1B</i>	NM_018557.2:c.9557G>A	p.Arg3186His		511	5.5%	96774	0.050%	não		
	<i>EPHB1</i>	NM_004441.4:c.1352C>T	p.Thr451Ile		620	6.5%	76108	0.018%	não		
	<i>PTPRD</i>	NM_002839.3:c.2983C>T	p.Arg995Cys		965	8.1%	384581	0.044%	não		
	<i>THBS1</i>	NM_003246.3:c.11C>A	p.Ala4Asp		507	5.3%	288580	0.001%	não		
	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.722C>T	p.Ser241Phe		664	14.0%	348912	29.78%	sim	82112	19.20%
	<i>RNF213</i>	NM_001256071.2:c.15460C>A	p.Pro5154Thr		507	6.5%	482080	0.002%	não		
	<i>ITGB2</i>	NM_000211.4:c.2104G>A	p.Ala702Thr		502	5.2%	51356	0.037%	não		
Adamant27	<i>TAF1L</i>	NM_153809.2:c.5246A>T	p.Glu1749Val	60%	3867	17.3%	62751	14.0%	sim	na	na
Adamant28	<i>SYNE1</i>	NM_033071.3:c.23089-1G>T		70%	959	10.4%	137099	9.3%	sim	na	na
	<i>GRM8</i>	NM_000845.2:c.2054C>T	p.Thr685Ile		670	12.6%	150484	12.0%	sim	na	na
	<i>CSMD3</i>	NM_198123.1:c.2113C>G	p.Gln705Glu		2468	32.0%	139108	25.1%	sim	na	na
	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.637C>T	p.Arg213Ter		2369	67.2%	66782	70.4%	sim	na	na
Adamant31	<i>NOTCH2</i>	NM_024408.3:c.5665C>T	p.Arg1889Trp	60%	840	33.7%	455167	22.3%	sim	na	na
	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.497C>G	p.Ser166*		940	57.2%	317791	59.9%	sim	na	na

* Variante não detectada. Constatada uma deleção (NM_182961.3:c.6632delG) na mesma posição em 2,7%

4.4 INVESTIGAÇÃO DE MARCAS TUMORAIS EM DNA DO PLASMA

Para todas as 44 pacientes incluídas no estudo foram coletadas pelo menos uma amostra de sangue periférico para avaliação do plasma, totalizando 205 amostras de plasma até o momento (média de 4,6 coletas/paciente). O Apêndice 4 ilustra as amostras de plasma coletadas para cada paciente.

Dos 23 casos em que foram avaliados os DNAs extraídos das biópsias teciduais, a identificação das marcas tumorais com confiança em amostras de DNA de plasma (ctDNA) foi possível para 17 casos. Foi realizada uma etapa de análise do ctDNA nas amostras de plasma coletadas antes do tratamento (Baseline) para os 17 casos. Nesse primeiro plasma (Baseline), 10 das 17 (58,8%) amostras de cfDNA investigadas foram positivas para a detecção de ctDNA, ou seja, positivas para as marcas tumorais.

Adicionalmente, a persistência de ctDNA em amostras de plasma avaliadas para monitoramento de resposta e progressão/recidiva da doença (M1-M5) foi observada em 41% das pacientes (7/17). A Tabela 4 e Figura 6 ilustram a avaliação das amostras de DNA de plasma. De forma geral observamos quatro padrões de dinâmica mutacional: A) Amostras positivas para marca tumoral no *baseline* e negativas durante todo o período de monitoramento; B) amostras positivas no *baseline* e com marcas tumorais persistentes durante o período de monitoramento; C) amostras negativas ou positivas de baixa confiança no *baseline* e que apresentaram detecção confiável ou não de marca tumoral durante algum ponto de monitoramento, e D) amostras negativas no *baseline* e durante o monitoramento.

Tabela 4 - Avaliação de DNA tumoral circulante (ctDNA) em amostras de DNA de plasma.

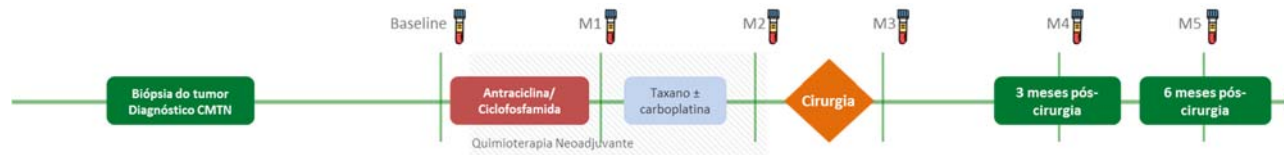
ID	Resposta a Quimioterapia	Gene	Variante (c.HGVS)	DNA Tumor (biópsia)			DNA plasma							
				% tumor no tecido avaliado	Freq. Alélica (painel)	Freq. Alélica (amplicon)	Freq. Alélica Baseline	Freq. Alélica M 1	Freq. Alélica M 2	Freq. Alélica M 3	Freq. Alélica M 4	Freq. Alélica M 5		
Esporádico	Adamant02	RCB=0	<i>CSMD1</i>	NM_033225.5:c.2750delA	NA	9%	8%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
			<i>PTEN</i>	NM_001304717.2:c.728+1G>C			30%	62%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,04%	0,07%
			<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.383delC			37%	49%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	Adamant03	RCB=III	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.755_765dupTCACCATCATC	NA	16%	6,8%	0,47%	0,00%	0,33%	0,61%	0,00%	1,22%	
			<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.511G>T			41%	8,1%	0,47%	0,00%	0,20%	1,21%	0,00%	2,72%
	Adamant04	RCB=II	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.637C>T	NA	14,16%	14,8%	3,50%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
	Adamant05	RCB=II	<i>SYNE1</i>	NM_182961.3:c.6632G>C	80%	11,16%	2,6%	0,21%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
			<i>SAMD9</i>	NM_017654.3:c.3010A>G			9,26%	4,4%	0,93%	0,00%	0,00%	0,00%	0,40%	2,53%
			<i>NUP98</i>	NM_016320.4:c.2608G>C			5,66%	4,2%	0,22%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
			<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.1018delA			33,00%	32,1%	17,74%	0,00%	1,72%	0,00%	6,51%	59,22%
	Adamant09	RCB=0	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.768_769delAC	95%	54%	83%	1,32%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,64%	
	Adamant10	RCB=III?	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.743G>A	75%	66%	30%	5,26%	NA	NA	0,00%	0,21%	2,12%	
	Adamant16	RCB=II	<i>EPHA3</i>	NM_005233.5:c.1325C>A	80%	26,60%	27,5%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	
			<i>EPHA7</i>	NM_004440.3:c.2274C>A			20,90%	18,5%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
			<i>SYNE1</i>	NM_182961.3:c.12880G>A			14,90%	8,53%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
			<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.958A>T			39,22%	24,2%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
			<i>AURKB</i>	NM_001284526.1:c.110C>T			9,42%	3,1%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
			<i>CDH2</i>	NM_001792.4:c.1678G>T			8,35%	7,8%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
	Adamant17	RCB=0	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.659A>G	90%	59,26%	52,0%	5,70%	0,00%	0,00%	0,00%	0,33%	0,00%	
			<i>AURKA</i>	NM_003600.3:c.410G>T			27,69%	25,1%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
Adamant18	RCB=0	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.659A>G	50%	37,96%	37,7%	0,76%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%		
Adamant22	RCB=II	<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.722C>T	40%	14,0%	29,78%	0,00%	0,00%	0,00%	1,65%	0,00%	2,38%		
Adamant27	RCB=II	<i>TAFIL</i>	NM_153809.2:c.5246A>T	60%	17,3%	14,0%	0,71%	0,00%	0,00%	0,00%	0,25%	0,00%		
Adamant28	RCB=III	<i>SYNE1</i>	NM_033071.3:c.23089-1G>T	70%	10,4%	9,3%	1,08%	0,00%	0,00%	0,00%	NA	NA		
		<i>GRM8</i>	NM_000845.2:c.2054C>T			12,6%	12,0%	1,39%	0,00%	0,00%	0,00%	NA	NA	
		<i>CSMD3</i>	NM_198123.1:c.2113C>G			32,0%	25,1%	17,63%	3,51%	15,23%	31,26%	NA	NA	
		<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.637C>T			67,2%	70,4%	32,28%	4,13%	36,41%	53,96%	NA	NA	

Cont/ Tabela 4

	ID	Resposta a Quimioterapia	Gene	Variante (c.HGVS)	DNA Tumor (biópsia)			DNA plasma					
					% tumor no tecido avaliado	Freq. Alélica (painel)	Freq. Alélica (amplicon)	Freq. Alélica Baseline	Freq. Alélica M 1	Freq. Alélica M 2	Freq. Alélica M 3	Freq. Alélica M 4	Freq. Alélica M 5
	Adamant31	RCB=0	<i>NOTCH2</i>	NM_024408.3:c.5665C>T	70%	33,7%	22,3%	2,35%	0,24%	0,00%	0,00%	1,51%	NA
			<i>SYNE1</i>	NM_033071.3:c.12150G>T		27,3%	24,9%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	NA
			<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.497C>G		57,2%	59,9%	0,99%	0,00%	0,00%	0,00%	4,65%	NA
BRCA1 Hereditário	Adamant20	RCB=II	<i>FANCD2</i>	NM_033084.4:c.2261G>A	90%	25,55%	11,7%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
			<i>PKHD1</i>	NM_138694.3:c.6083A>G		22,31%	15,8%	0,16%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
			<i>AKT1</i>	NM_005163.2:c.9C>G		16,22%	12,6%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
			<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.797G>A		62,01%	65,3%	0,76%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
BRCA1 Hereditário	Adamant21	RCB=I	<i>MYD88</i>	NM_001172567.1:c.656C>T	80%	5,09%	4,07%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
			<i>TP53</i>	NM_000546.5:c.544delT		49,29%	76,38%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
			<i>AURKC</i>	NM_001015878.1:c.374G>A		23,87%	14,12%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
BRCA1 Hereditário	Adamant29	RCB=0	<i>PPARG</i>	NM_015869.4:c.1512G>C	70%	26,9%	22,3%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
			<i>KDR</i>	NM_002253.2:c.3134G>T		21,7%	16,8%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
			<i>DCC</i>	NM_005215.3:c.3571C>G		23,9%	19,5%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
BRCA2 Hereditário	Adamant35	RCB=III	<i>PIK3CA</i>	NM_006218.3:c.29T>A	60%	6,40%	6,6%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	NA	NA

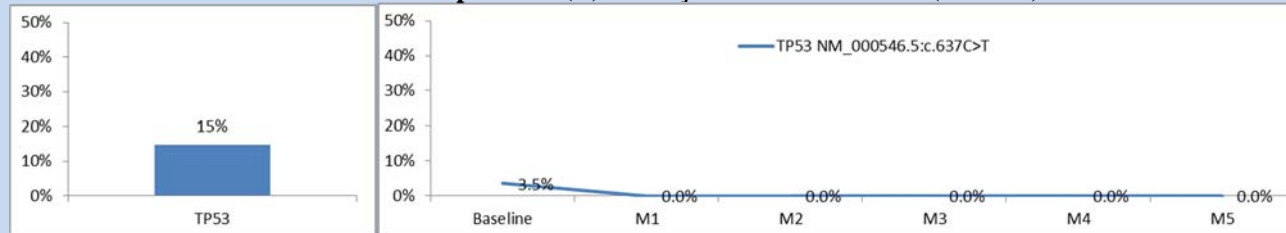
Baseline= coleta antes do início do tratamento; M1-5 coletas de monitoramento: M1= coleta após 1º bloco de quimioterapia; M2= coleta após 2º bloco de quimioterapia. M3= coleta pós-cirurgia; M4= coleta 3 meses após cirurgia; M5= coleta 6 meses após cirurgia. Valores em verde indicam detecção com confiança e em amarelo com baixa confiança.

Conforme mencionado na metodologia, a avaliação de ctDNA contemplou primeiramente a identificação de variantes somáticas (marcas tumorais) no DNA da biópsia tumoral para posterior rastreamento dessas marcas em amostras de DNA de plasma, coletadas em diferentes momentos do tratamento, sendo que consideramos positivas as amostras para as quais a detecção foi considerada confiável. Na Figura 6, a frequência alélica das variantes identificadas no DNA do tumor de cada paciente está representada no gráfico à esquerda e o rastreamento dessas marcas tumorais em amostras de DNA do plasma (ctDNA) no gráfico à direita, juntamente com eventos clínicos relevantes observados até o momento. Os gráficos foram apresentados em quatro grupos. A) Amostras positivas para marca tumoral no baseline e negativas durante todo o período de monitoramento; B) amostras positivas no *baseline* e com marcas tumorais persistentes durante o período de monitoramento; C) amostras negativas ou positivas de baixa confiança no *baseline* e que apresentaram detecção confiável ou não de marca tumoral durante algum ponto de monitoramento, e D) amostras negativas no *baseline* e durante o monitoramento.

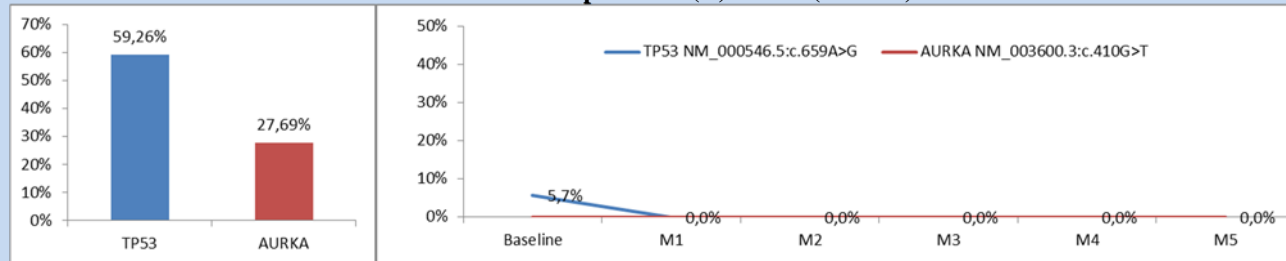


GRUPO A

Adamant04 - Esporádico (A) - doença residual moderada (RCB=II)



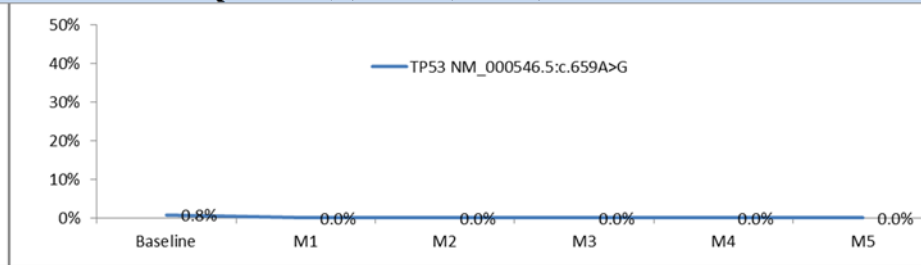
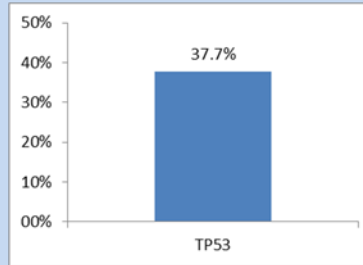
Adamant17 - Esporádico (A) - RPC (RCB=0)



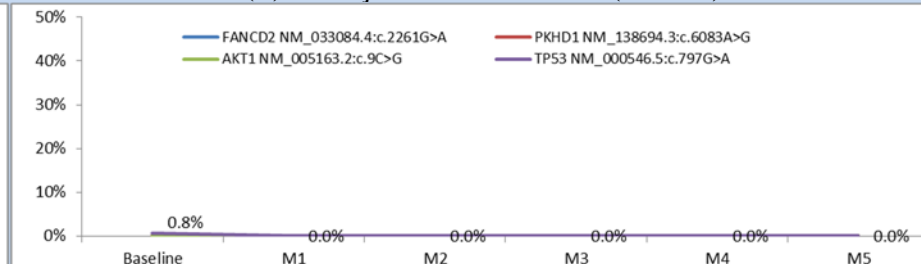
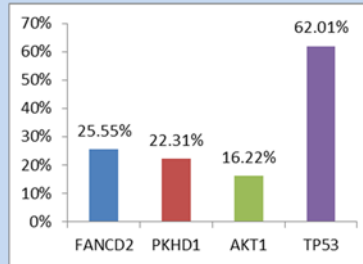
(continua)

GRUPO A

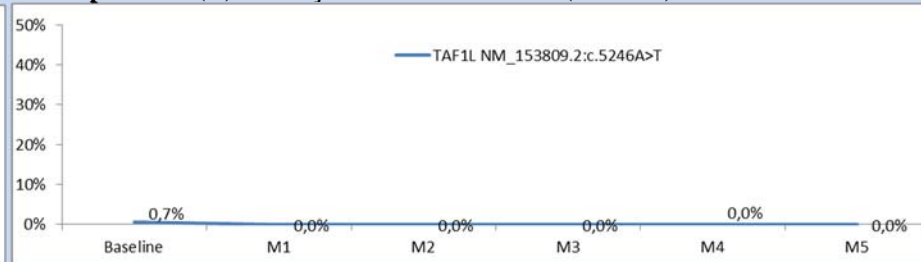
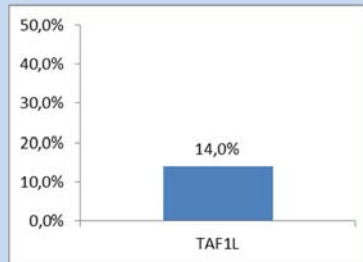
Adamant18 - Esporádico (A) - RPC (RCB=0)



Adamant20 - BRCA1 Hereditário (A) - doença residual moderada (RCB=II)

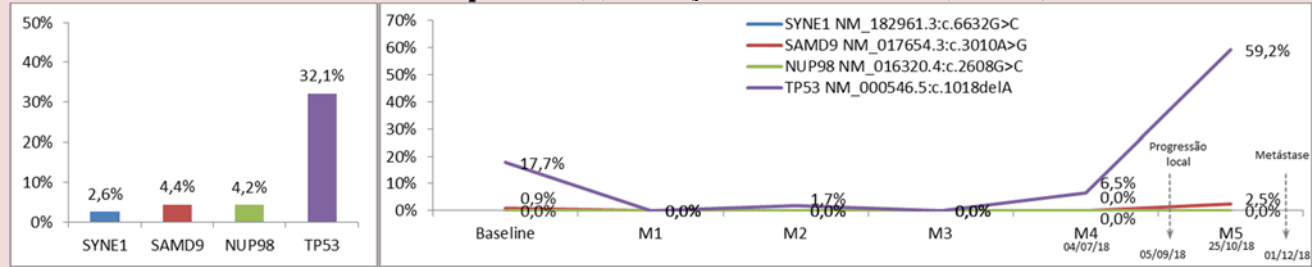


Adamant27 - Esporádico (A) - doença residual moderada (RCB=II)

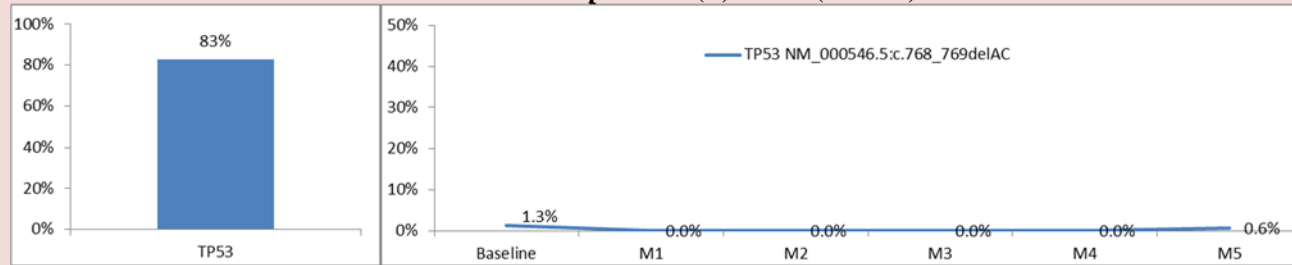


GRUPO B

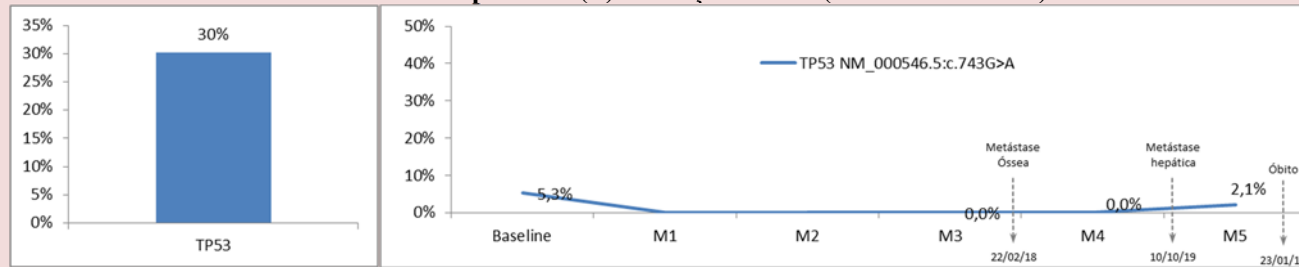
Adamant05 - Esporádico (B) - doença residual moderada (RCB=II)



Adamant09 - Esporádico (B) - RPC (RCB=0)



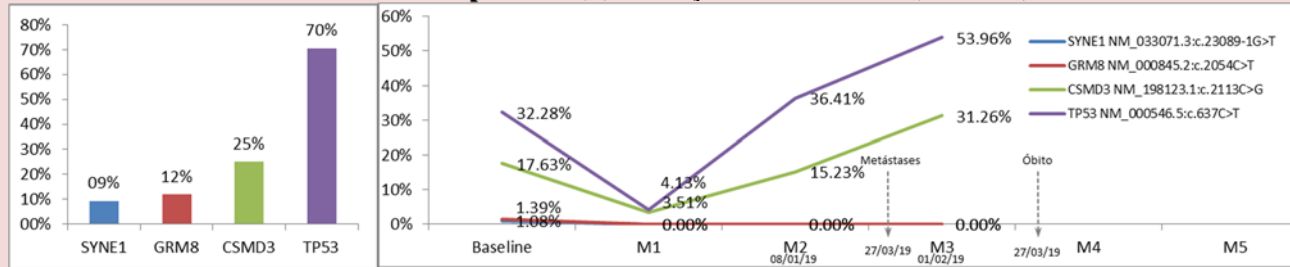
Adamant10 - Esporádico (B) - doença residual (RCB não avaliado)



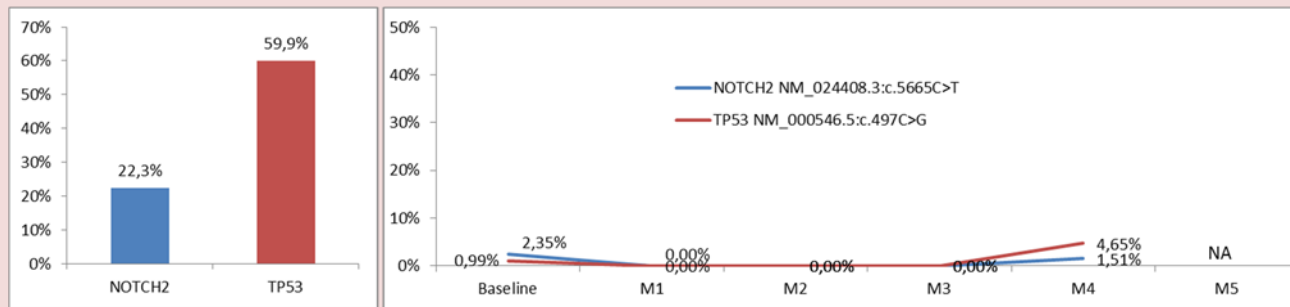
(continua)

GRUPO B

Adamant28 - Esporádico (B) - doença residual extensa (RCB=III)

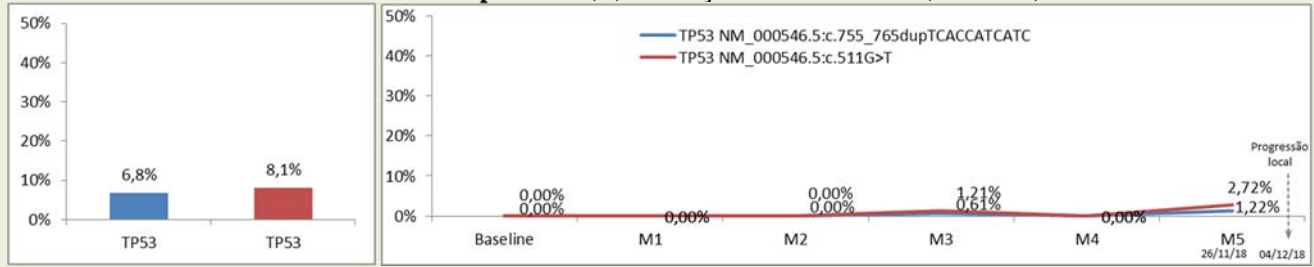


Adamant31 - Esporádico (B) - RPC (RCB=0)

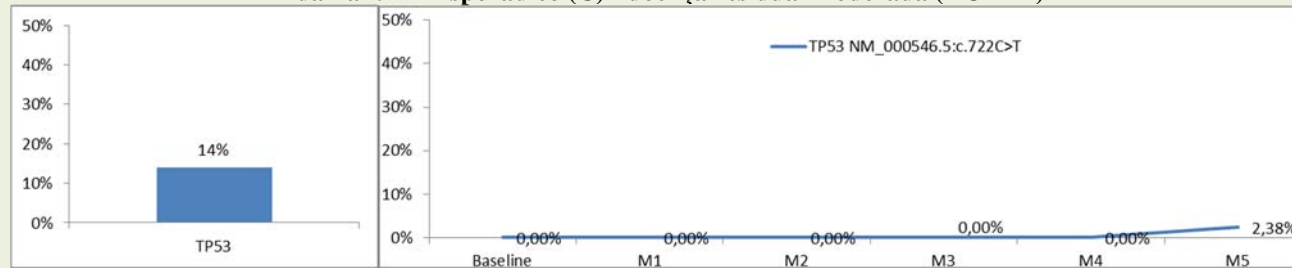


GRUPO C

Adamant03 - Esporádico (C) - doença residual extensa (RCB=III)

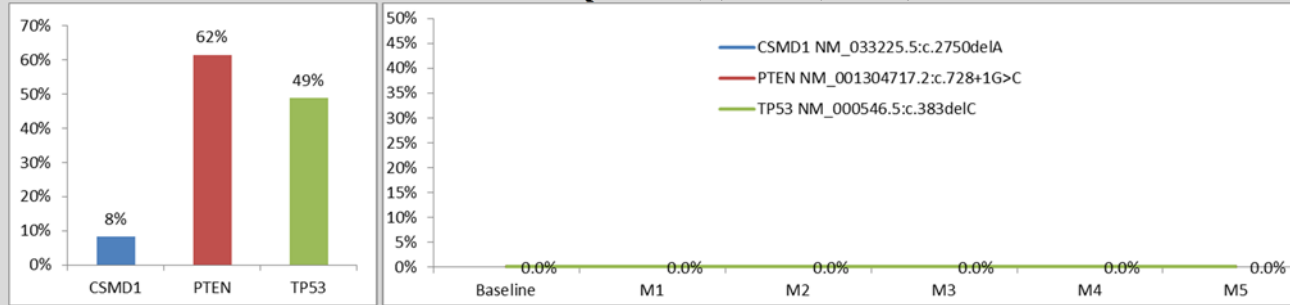


Adamant22 - Esporádico (C) - doença residual moderada (RCB=II)

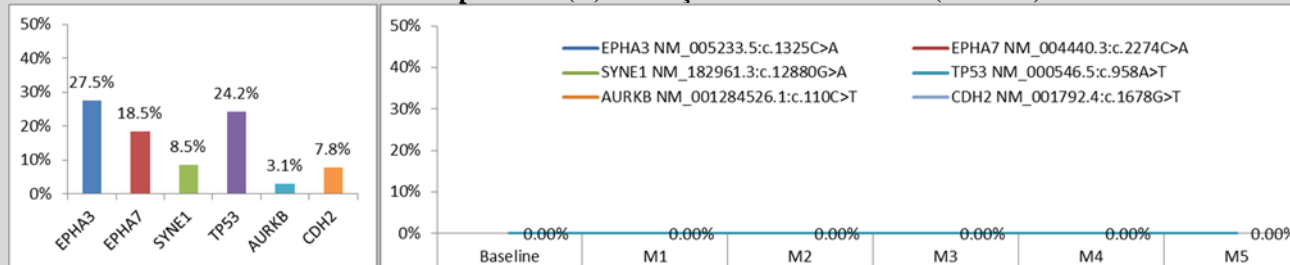


GRUPO D

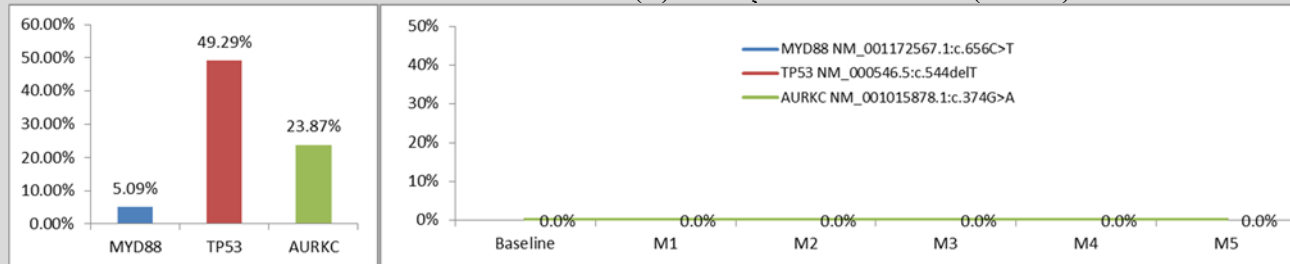
Adamant02 - Esporádico (D) - RPC (RCB=0)



Adamant16 - Esporádico (D) - doença residual moderada (RCB=II)



Adamant21 - BRCA1 Hereditário (D) - doença residual mínima (RCB=I)



(continua)

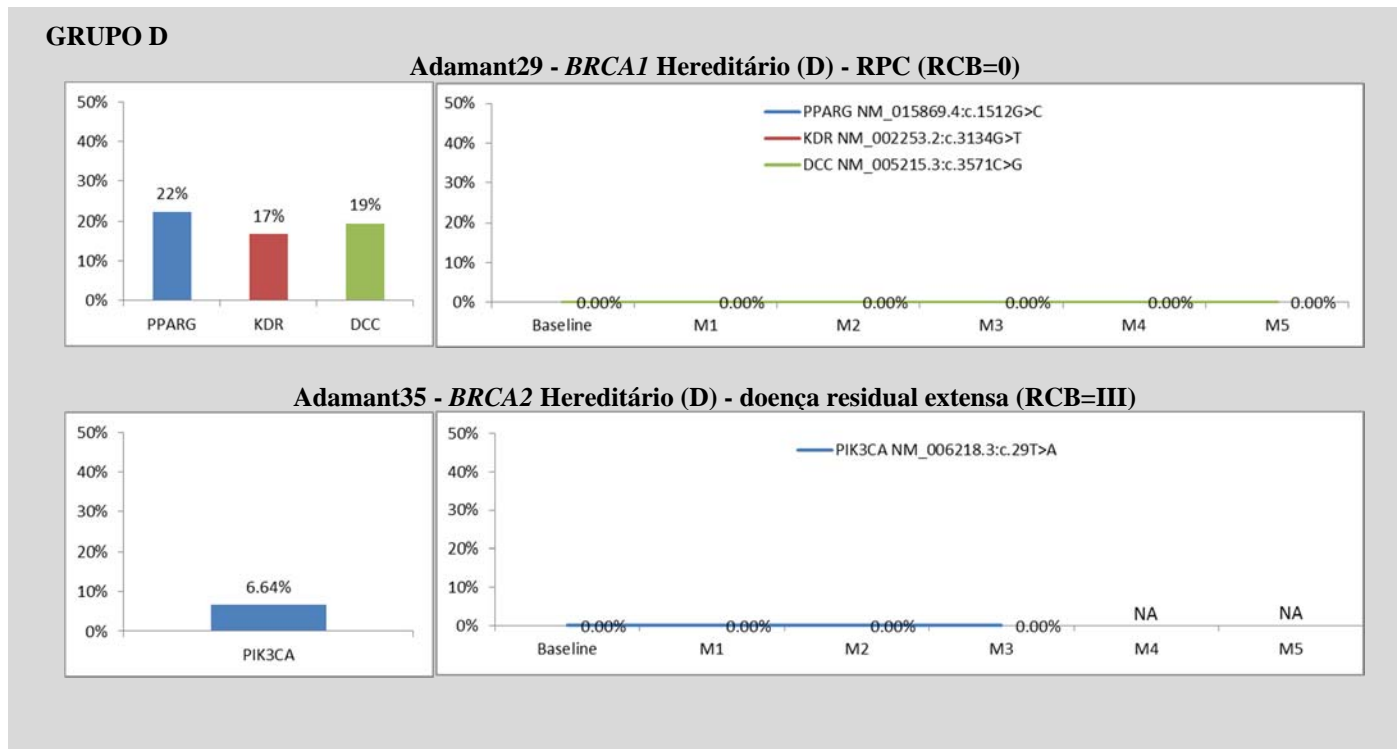


Figura 6 - Representação das frequências alélicas das variantes somáticas identificadas em tumor de mama triplo-negativo. Os gráficos de barra à esquerda representam a frequência alélica das variantes no tecido tumoral extraído da biópsia também usada para o diagnóstico. Os gráficos à direita representam a frequência alélica das variantes em amostra seriadas de DNA isolado do plasma ao longo do tratamento. Baseline= pré-tratamento; M1= após antraciclina + ciclofosfamida; M2= após taxano ± carboplatina e antes da cirurgia; M3= após cirurgia (até 1 mês); M4= 3 meses após a cirurgia; M5= 6 meses após a cirurgia. Detecção de ctDNA com baixa confiança foi considerada negativa (0%) na representação dos gráficos. A) Amostras positivas para marca tumoral no baseline e negativas durante todo o período de monitoramento; B) amostras positivas no baseline e com marcas tumorais persistentes durante o período de monitoramento; C) amostras negativas ou positivas de baixa confiança no baseline e que apresentaram detecção confiável ou não de marca tumoral durante algum ponto de monitoramento, e D) amostras negativas no baseline e durante o monitoramento.

4.5 ASSOCIAÇÃO DOS ACHADOS MOLECULARES COM AS VARIÁVEIS CLÍNICAS

Dada a caracterização molecular das pacientes, a qual permitiu classificarmos os casos em hereditários (com mutação germinativa em *BRCA1/2* e *TP53*) e esporádicos, investigamos as variáveis clínico-demográficas das pacientes. Não houve associação entre o status germinativo e essas características, conforme ilustrado na Tabela 5. Em relação à resposta ao tratamento e o status germinativo das pacientes, observou-se que, de forma geral, 47,1% (16/34) das pacientes operadas apresentaram resposta patológica completa. Entretanto, também não houve associação entre a presença de mutação patogênica germinativa (*BRCA1/2* e *TP53*) e presença de resposta patológica completa (50% nas hereditárias *versus* 46,2% esporádicas - Teste exato Fisher; $p > 0.999$).

Tabela 5 - Associação das variáveis clínicas das pacientes com câncer de mama triplo-negativo

Variável	Todos		Hereditário		Esporádico		p-valor
	%	n	%	n	%	n	
Idade	média 43,8 (28-73anos)	43	média 44,3 (34-62 anos)	9	média 43,7 (28-73 anos)	34	
≤ 40 anos	51,2%	22	44,4%	4	53,0%	18	0,7205
> 40 anos	48,8%	21	55,6%	5	47,0%	16	
Cor							
amarela	3,0%	1	0,0%	0	3,6%	1	0,6445
branca	70,6%	24	83,3%	5	67,9%	19	
parda	17,6%	6	16,7%	1	17,8%	5	
preta	8,8%	3	0,0%	0	10,7%	3	
NA		9		3		6	
Histórico Familiar							
Positivo	83,3%	35	77,8%	7	84,8%	28	0,6305
Negativo	16,7%	7	22,2%	2	15,2%	5	
NA		1		0		1	
Tipo Histológico							
Carcinoma invasivo SOE	90,4%	38	87,5%	7	91,2%	31	>0,9999
Outro	9,6%	4	12,5%	1	8,8%	3	
NA		1		1		0	

Cont/ Tabela 5

Variável	Todos		Hereditário		Esporádico		p-valor
Grau SBR							
< 3	31,7%	13	25,0%	2	33,3%	11	>0,9999
3	68,3%	28	75,0%	6	66,7%	22	
NA		2		1		1	
Grau Nuclear							
< 3	16,3%	7	11,1%	1	17,6%	6	>0,9999
3	83,7%	36	88,9%	8	82,4%	28	
Índice Mitótico							
Escore 1	27,5%	11	25,0%	2	28,1%	9	0,6511
Escore 2	47,5%	19	37,5%	3	50,0%	16	
Escore 3	25,0%	10	37,5%	3	21,9%	7	
NA		3		1		2	
Invasão vascular sanguínea							
Presente	0,0%	0	0%	0	0%	0	>0,9999
Ausente	100%	42	100%	8	100%	34	
NA		1		1		0	
Invasão vascular linfática							
Presente	7,2%	3	12,5%	1	5,9%	2	0,4787
Ausente	92,8%	39	87,5%	7	94,1%	32	
NA		1		1		0	
Invasão perineural							
Presente	2,4%	1	0%	0	2,9%	1	>0,9999
Ausente	97,6%	41	100%	8	97,1%	33	
NA		1		1		0	
Necrose							
Presente	60,5%	26	77,8%	7	55,9%	19	0,2807
Ausente	39,5%	17	22,2%	2	44,1%	15	
Infiltrado Inflamatório							
Discreto ou moderado	95,2%	40	100%	8	94,1%	32	>0,9999
Intenso	4,8%	2	0%	0	5,9%	2	
NA		1		1		0	
Desmoplasia							
Discreta ou moderada	97,6%	41	100%	8	97,1%	33	>0,9999
Intensa	2,4%	1	0%	0	2,9%	1	
NA		1		1		0	
IHQ ki-67							
<15	2,3%	1	11,1%	1	0%	0	0,2093
>15	97,7%	42	88,9%	8	100%	34	
Resposta (RCB)							
RPC (RCB=0)	47,1%	16	50,0%	4	46,2%	12	>0,9999
Residual (RCB=I-III)	52,9%	18	50,0%	4	53,8%	14	
NA		9		1		8	

Em seguida, investigamos os genes afetados por mutações somáticas em relação ao status hereditário e esporádico. Não foram observados genes frequentemente afetados por variantes somáticas em nenhum dos grupos (Tabela 3).

Contudo, nenhum tumor do grupo hereditário apresentou variantes somáticas no gene *SYNE1*, enquanto que os 3 tumores que apresentaram variantes nesse gene foram classificados no grupo esporádico (sem mutação patogênica germinativa em *BRCA1/2* ou *TP53*).

Na sequência, analisamos o índice da carga mutacional dos tumores hereditários e esporádicos. A Figura 7 ilustra a carga mutacional das amostras tumorais. Não foi observada associação entre alta carga mutacional dos tumores e presença de mutação germinativa em *BRCA1* ($p > 0,9999$), sendo que todos os tumores hereditários foram classificados com baixa carga mutacional ($< 10 \text{ mut/Mb}$)

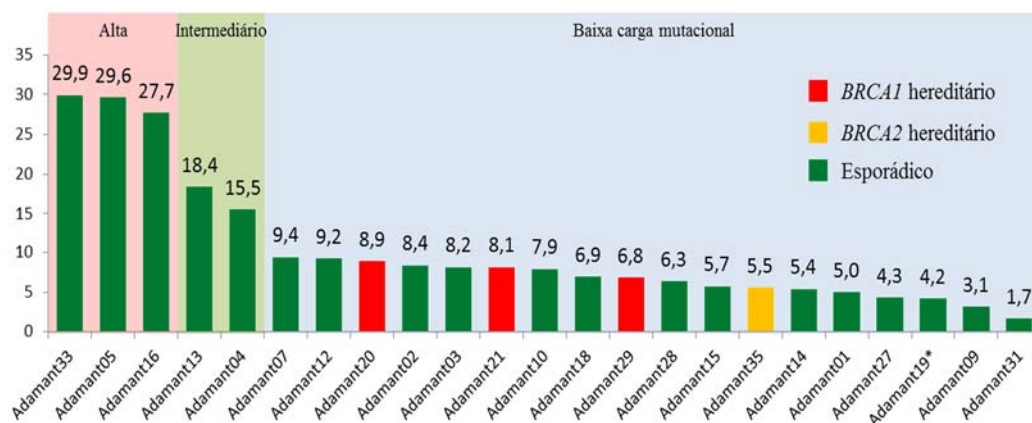


Figura 7 - Índice de carga mutacional dos tumores triplo-negativos da mama de acordo com o status de mutação patogênica germinativa. *Para a paciente Adamant19 utilizamos amostra de DNA do tecido tumoral pós-tratamento congelado a fresco (não parafinado), enquanto para as demais foram utilizadas amostras de DNA do material parafinado da biópsia pré-tratamento.

Na etapa seguinte, tendo então caracterizado os tumores, avaliamos as marcas tumorais (ctDNA) no plasma baseline (pré-tratamento) e investigamos se a positividade para ctDNA nessa amostra estaria associada à resposta avaliada na cirurgia. Dentre os casos positivos para ctDNA no plasma baseline, 40% (4/10) das

pacientes evoluíram com resposta patológica completa (RPC) e 60% (6/10) apresentaram doença residual (DR). Entre as negativas para ctDNA, 30% (2/7) e tiveram RPC e 70% (5/7) DR, não sendo observada associação entre positividade para ctDNA ao diagnóstico e resposta ao tratamento com quimioterapia neoadjuvante ($p > 0,999$; Teste Fisher).

Avaliamos também se a positividade para ctDNA ao diagnóstico estaria associada ao status germinativo das pacientes. Entre as pacientes do grupo hereditário, 25% (1/4) foram positivas para ctDNA no plasma baseline, ao passo que entre os casos esporádicos (tumores sem mutação patogênica germinativa) 69% (9/13) foram positivos, não havendo associação entre o status germinativo e a presença de ctDNA ($p = 0,25$; Teste Fisher).

Posteriormente, passamos a investigar se a identificação de ctDNA estaria associada à resposta ou status germinativo nas amostras coletas para monitoramento de resposta e progressão/recidiva da doença (M1-M5). Identificamos que 54,5% (6/11) das pacientes que apresentaram DR (RCB I a III) após cirurgia foram positivas para ctDNA, contra apenas 16% (1/6) entre as pacientes com RPC (RCB 0), embora sem significância estatística ($p = 0,1507$; Teste Fisher).

A título de explorar os dados gerados, investigamos a frequência alélica das variantes identificadas nas amostras de DNA do plasma como um indicador do nível de ctDNA nessas amostras. Observamos que os níveis de ctDNA das pacientes com DR foram maiores em comparação às pacientes com RPC, se considerados os valores médios das frequências alélicas no ctDNA, como ilustrado na Figura 8, ficando evidente a maior frequência de pacientes com doença residual e persistência das

marcas tumorais no plasma, embora sem significância estatística ($p=0.6689$, teste Mann Whitney).

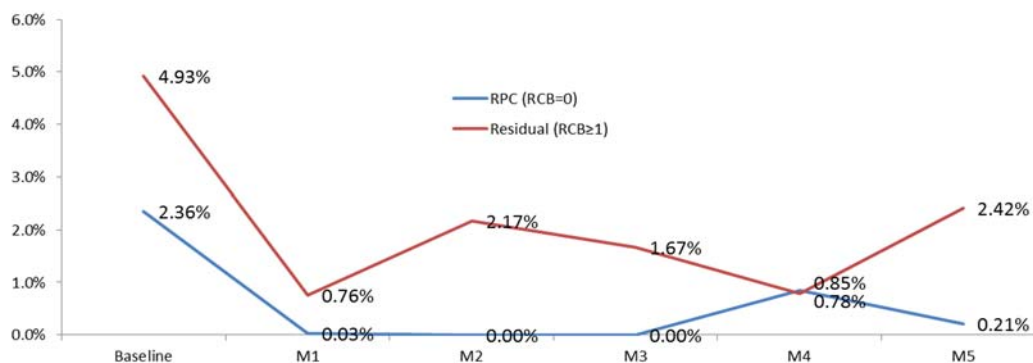


Figura 8 - Média dos níveis de ctDNA (frequência alélica das variantes somáticas) detectados em amostras de plasma para as pacientes que evoluíram com resposta patológica completa (RPC) e pacientes com tumor residual ($RCB \geq 1$). Baseline = coleta antes do início do tratamento; M1= coleta após 1º bloco de quimioterapia; M2= coleta após 2º bloco de quimioterapia. M3= coleta pós-cirurgia; M4= coleta 3 meses após cirurgia; M5= coleta 6 meses após cirurgia

Além disso, também investigamos a positividade para ctDNA nas amostras de plasma durante o monitoramento, tendo em vista o status de mutação germinativa. Em relação às pacientes com tumores TN hereditários, nenhuma (0/4) foi positiva para ctDNA nas coletas de monitoramento (M1-M5), ao passo que entre os casos esporádicos, 53,8% (7/13) foram positivos, entretanto sem associação estatística observada ($p=0,1029$; Teste Exato Fisher). Avaliamos também as quatro classes de perfil de dinâmica mutacional (Figura 6) com todas as variáveis clínicas e patológicas sem observar nenhuma associação significativa, provavelmente pelo baixo número de casos completamente caracterizados até o momento.

Por fim, a Tabela 6 apresenta de forma simplificada as informações obtidas para cada paciente.

Tabela 6 - Caracterização das pacientes com câncer de mama triplo-negativo

ID	Idade	Classificação	Carga mutacional	Marcas tumorais	ctDNA baseline	ctDNA monitoramento	Resposta (RCB)
Adamant01	≤40	Esporádico	Baixa	-	-	-	doença residual extensa (RCB=III)
Adamant02	>40	Esporádico	Baixa	<i>CSMD, PTEN, TP53</i>	negativo	negativo	RPC (RCB=0)
Adamant03	>40	Esporádico	Baixa	<i>TP53</i>	negativo	positivo	doença residual extensa (RCB=III)
Adamant04	≤40	Esporádico	Intermediária	<i>TP53</i>	positivo	negativo	doença residual moderada (RCB=II)
Adamant05	≤40	Esporádico	Alta	<i>SYNE, SAMD9, NUP98, TP53</i>	positivo	positivo	doença residual moderada (RCB=II)
Adamant06	>40	Esporádico	-	-	-	-	RPC (RCB=0)
Adamant07	>40	Esporádico	Baixa	-	-	-	doença residual moderada (RCB=II)
Adamant08	>40	Esporádico	-	-	-	-	RPC (RCB=0)
Adamant09	>40	Esporádico	Baixa	<i>TP53</i>	positivo	positivo	RPC (RCB=0)
Adamant10	≤40	Esporádico	Baixa	<i>TP53</i>	positivo	positivo	doença residual*
Adamant11	≤40	Hereditário	-	-	-	-	RPC (RCB=0)
Adamant12	>40	Esporádico	Baixa	-	-	-	doença residual moderada (RCB=II)
Adamant13	>40	Esporádico	Intermediária	-	-	-	RPC (RCB=0)
Adamant14	≤40	Esporádico	Baixa	-	-	-	RPC (RCB=0)
Adamant15	>40	Esporádico	Baixa	-	-	-	doença residual moderada (RCB=II)
Adamant16	>40	Esporádico	Alta	<i>EPHA, EPHA7, SYNE1, TP53, AURKB, CDH2</i>	negativo	negativo	doença residual moderada (RCB=II)
Adamant17	>40	Esporádico	-	<i>TP5, AURK4</i>	positivo	negativo	RPC (RCB=0)
Adamant18	>40	Esporádico	Baixa	<i>TP53</i>	positivo	negativo	RPC (RCB=0)
Adamant19	≤40	Esporádico	Baixa	<i>NCOA, TP53</i>	na	na	doença residual extensa (RCB=III)
Adamant20	≤40	Hereditário	Baixa	<i>FANCD, PKHD1, AKT1, TP53, MALT1</i>	positivo	negativo	doença residual moderada (RCB=II)
Adamant21	>40	Hereditário	Baixa	<i>MYD88, TP53, AURKC</i>	negativo	negativo	doença residual mínima (RCB=I)
Adamant22	≤40	Esporádico	-	<i>TP53</i>	negativo	positivo	doença residual moderada (RCB=II)
Adamant24	≤40	Esporádico	-	-	-	-	RPC (RCB=0)
Adamant25	≤40	Esporádico	-	-	-	-	RPC (RCB=0)

Cont/ Tabela 6

ID	Idade	Classificação	Carga mutacional	Marcas tumorais	ctDNA baseline	ctDNA monitoramento	Resposta (RCB)
Adamant26	>40	<i>BRCA1</i> Hereditário	-	-	-	-	doença residual moderada (RCB=II)
Adamant27	≤40	Esporádico	Baixa	<i>TAF1L</i>	positivo	negativo	doença residual moderada (RCB=II)
Adamant28	≤40	Esporádico	Baixa	<i>SYNE1, GRM8, CSMD3, TP53</i>	positivo	positivo	doença residual extensa (RCB=III)
Adamant29	≤40	<i>BRCA1</i> Hereditário	Baixa	<i>PPARG, KDR, DCC</i>	negativo	negativo	RPC (RCB=0)
Adamant31	≤40	Esporádico	Baixa	<i>NOTCH2, TP53</i>	positivo	positivo	RPC (RCB=0)
Adamant32	≤40	Esporádico	-	-	-	-	RPC (RCB=0)
Adamant33	≤40	Esporádico	Alta	-	-	-	doença residual extensa (RCB=III)
Adamant34	≤40	<i>BRCA1</i> Hereditário	-	-	-	-	RPC (RCB=0)
Adamant35	>40	<i>BRCA2</i> Hereditário	Baixa	<i>PIK3CA</i>	negativo	negativo	doença residual extensa (RCB=III)
Adamant36	>40	<i>TP53</i> Hereditário	-	-	-	-	RPC (RCB=0)

*Para a paciente Adamant10, apesar da presença de doença residual, não foi possível obter o escore RCB a partir do laudo anatomopatológico da peça cirúrgica.

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho, foram incluídas pacientes com tumores TN não metastáticos, não selecionadas por idade ou história familiar de câncer e referenciadas à quimioterapia neoadjuvante (AC-T ± platina). Em linhas gerais, sabe-se que os tumores triplo-negativos da mama são frequentemente carcinomas invasivos, de alto grau e em muitos casos diagnosticados em idade jovem (RAKHA et al. 2007). Conforme o esperado, nesse estudo a maior parte das pacientes recrutadas (90,5% - 38/42) apresentou carcinoma mamário invasivo sem outra especificação (também denominado carcinoma ductal invasivo), 68,3% (28/41) de Grau histológico SBR modificado Nottingham 3; 83,7% (36/43) de Grau Nuclear 3. A média de idade ao diagnóstico (43,8 anos) foi levemente menor quando comparada a outras casuísticas de tumores TN (49; 52,7; 51 anos) (BRIANESE et al. 2018; COUCH et al. 2014; SHAH et al. 2012) bem como quando comparada a grandes coortes de câncer de mama não classificadas por subtipo (48,5; 54,2; 61,8 anos) (The Cancer Genome Atlas Network et al. 2012; CURTIS et al. 2012, 2017). Inicialmente, foi proposto investigarmos os marcadores basalóides por imunohistoquímica (IHQ) disponíveis nos registros eletrônicos das pacientes, entretanto devido a uma mudança nas diretrizes dos testes de rotina diagnóstica do departamento de Anatomia Patológica, desde 2017 esses marcadores não são mais contemplados nos laudos anatomopatológicos. Assim, não foi possível classificar os tumores *basal-like* nessa coorte, uma vez que não há dados de IHQ das citoceratinas 5, 6 e 14, expressão de EGFR, e status de p53 e p63 para os tumores das pacientes.

Em relação às análises germinativas, constatou-se que 20,9% (9/43) das pacientes apresentaram variantes patogênicas nos genes de predisposição a câncer *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*. A grande maioria das mutações patogênicas foi identificada no gene *BRCA1* (16,3% - 7/43), conforme o esperado, confirmando a associação classicamente observada entre a perda de função desse gene e os tumores TN. Interessantemente, a variante fundadora c.5266dupC em *BRCA1* foi detectada em 3 pacientes e correspondeu a 43% (3/7) das variantes patogênicas nesse gene. Estima-se que 10% dos tumores TN ocorrem em mulheres portadoras de mutação germinativa em *BRCA1*, conforme reportado anteriormente pelo nosso grupo e outros (COUCH et al. 2014; BRIANESE et al. 2018). Para o gene *BRCA2*, embora também faça parte da via de reparo de DNA por recombinação homóloga, a taxa de mutação tende a ser semelhante entre os subtipos de câncer de mama, sem uma maior frequência de mutação em tumores TN, como acontece para *BRCA1* (LAKHANI 2002; MAVADDAT et al. 2012). Embora não tenhamos avaliado outros subtipos de câncer de mama, essa informação foi confirmada nos nossos dados, visto que apenas 2,3% (1/43) das pacientes carregavam a mutação em *BRCA2*. Já o gene *TP53* é um gene raramente afetado por mutações patogênicas germinativas em câncer de mama TN (CARRARO et al. 2013; COUCH et al. 2014), conforme também foi observado nesse estudo (2,3% - 1/43). O gene *TP53* está relacionado à síndrome de Li-Fraumeni, na qual os indivíduos afetados apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de um amplo espectro de tumores, incluindo câncer de mama (LI e FRAUMENI 1969). Entretanto, mutações germinativas em *TP53* não parecem estar associadas a um aumento de risco para tumores TN, uma vez que estudos com grandes coortes mostraram uma frequência de mutação germinativa extremamente baixa (<1%)

(COUCH et al. 2014; BUYS et al. 2017). Todavia, a mutação germinativa patogênica R337H é uma importante mutação fundadora na população brasileira (ACHATZ e ZAMBETTI 2016).

Ainda sobre os aspectos germinativos, observamos uma alta taxa (58,1% - 25/43) de variantes de significado incerto (VUS, do inglês *Variants of Uncertain Significance*) em 31 genes diferentes, incluindo *BRCA1* e *BRCA2*. Vale a pena ressaltar que boa parte dos genes afetados por VUS são genes ainda pouco caracterizados e para os quais poucas informações estão disponíveis em bancos de dados. Assim, com o avanço do uso de painéis abrangendo um número crescente de genes nos testes genéticos, espera-se que progressivamente haja um acúmulo de informações em bancos de dados que permita reclassificar muitas VUS como benignas ou patogênicas, diminuindo os testes com resultado incerto. Nos nossos dados os genes mais frequentemente afetados por VUS foram *ATM*, *BUB1B*, *PALB2* e *PMS2* (6,9%; 6,9%; 6,9%; e 6,9% - 3/43 pacientes respectivamente), além de outros genes menos frequentes.

O gene *ATM* (do inglês, *Ataxia Telangiectasia-Mutated*) está localizado no braço longo do cromossomo 11 e codifica uma proteína quinase envolvida na regulação do ciclo celular e na resposta celular ao dano no DNA, participando do reconhecimento de quebras de fitas duplas no DNA e recrutamento de outras proteínas *downstream* da via de recombinação homóloga, incluindo *BRCA1*. Existem evidências de que mutações patogênicas germinativas em *ATM* aumentam o risco de desenvolvimento de câncer em mulheres portadoras da mutação (GOLDGAR et al. 2011). Nesse estudo, foram detectadas 4 variantes (c.1759G>A, c.2281A>T, c.4871A>G, c.6741T>G) no gene *ATM* em 3 pacientes. Interessantemente, a variante

c.6741T>G (Adamant18) foi classificada como potencialmente prejudicial por três dos seis programas de predição de patogenicidade *in silico*, porém não foi observada perda de heterozigidade (LOH - do inglês, *Loss Of Heterozigosity*) no tecido tumoral. A paciente Adamant5 apresentou duas VUS em ATM (c.2281A>T e c.4871A>G) que foram classificadas como benignas por pelo menos 5 dos 6 preditores e não foi observada LOH para ambas as variantes, não sendo possível determinar se as variantes ocorreram no mesmo alelo ou em alelos diferentes. Por último a VUS c.1759G>A (Adamant2) foi classificada como benigna pelos seis programas de predição e não foi constatada LOH no DNA tumoral. Assim, apesar de haver evidências sugerindo que essas variantes sejam provavelmente benignas, as informações ainda são insuficientes para reclassificá-las, permanecendo como VUS.

O gene *BUB1B* (do inglês, *Budding Uninhibited By Benzimidazoles 1 Homolog Beta*) está localizado no braço longo do cromossomo 15 e codifica uma proteína quinase (BUBR1) envolvida na ligação das cromátides-irmãs ao fuso mitótico e sua consequente separação durante a divisão celular (TAYLOR et al. 1998). Mutações em *BUB1B* estão relacionadas à síndrome de aneuploidia variegada em mosaico tipo 1, uma doença autossômica recessiva rara, na qual se observa anormalidades cromossômicas, que podem levar a crescimento lento, deformidades anatômicas e risco aumentado para desenvolvimento de cânceres infantis (rabdomiossarcomas, tumor de Wilms, leucemia) (HANKS et al. 2004). Além disso, apesar da inativação de *BUB1B* estar associada a uma instabilidade genômica aumentada em câncer de mama (SCINTU et al. 2007), característica frequente em tumores TN, não existe uma associação clara entre mutações germinativas e aumento de risco a câncer de mama. VACLAVICEK et al. (2007) investigaram genes relacionados ao fuso mitótico,

incluindo *BUB1B*, e não observaram associação entre variantes nesses genes e aumento de risco de câncer de mama familiar. Entretanto, os autores analisaram uma coorte pequena e não investigaram toda a região codificante do gene, não podendo ser descartada a ocorrência de outras alterações com potencial patogênico. As VUS identificadas no gene *BUB1B* nesse estudo (c.391T>G, c.805A>G, e c.2508C>G) foram classificadas como benignas por pelo menos 4 dos 5 preditores de patogenicidade e não foi observada LOH no DNA do tumor (somente c.2508C>G foi avaliada). Além disso, a variante c.391T>G foi identificada em uma paciente também portadora de mutação patogênica germinativa em *BRCA1* c.3331_3334delCAAG (Adamant26), o que reforça o caráter benigno dessa variante.

O gene *PALB2* (do inglês, *Partner and localizer of BRCA2*) está localizado no braço curto do cromossomo 16 e desempenha função importante no reparo de DNA por recombinação homóloga, através da formação do complexo BRCA1-PALB2-BRCA2 que auxilia na função de RAD51 para invasão da fita homóloga e reparo (XIA et al. 2006; ROY et al. 2012). Mutações em *PALB2* estão relacionadas à Anemia de Fanconi, grupo de complementação N (XIA et al. 2007). Além disso, estudo de ANTONIOU et al. (2014) mostrou que mutações germinativas de perda de função em *PALB2* conferem risco elevado para o desenvolvimento de câncer de mama em mulheres portadoras da mutação de maneira semelhante ao observado para *BRCA2*. Além disso, *PALB2* é o segundo gene mais frequentemente mutado em câncer de pâncreas hereditário, atrás apenas de *BRCA2*, cuja proteína é parceira de ligação da proteína PALB2 (JONES et al. 2009). As VUS identificadas em *PALB2* nesse estudo (c.2659A>G, c.2816T>G e c.3059A>G) foram classificadas como potencialmente prejudiciais pela maioria dos programas de predição (3 de 6; 5 de 6, 4 de 6,

respectivamente), entretanto não foi observada LOH no tecido tumoral para nenhuma das variantes. As três variantes estão localizadas no domínio C-terminal WD40 (aa 859–1186) que está relacionado à estabilidade da proteína PALB2. Recentemente, análises funcionais indicaram que mutações nesse domínio podem levar a deficiência no reparo por recombinação homóloga e sensibilidade a inibidores de PARP (RODRIGUE et al. 2019). CATUCCI et al. (2016) investigaram a variante c.2816T>G e, com base em análises populacionais e funcionais, sugerem que essa variante é benigna em relação a aumento de risco para câncer de mama. Contudo, o banco de dados ClinVar (ID 126683) apresenta interpretações conflitantes de patogenicidade para essa variante, que permanece como VUS.

O gene *PMS2* (do inglês, *Postmeiotic segregation increased 2*) está localizado no braço curto do cromossomo 7 e é um dos principais genes relacionados à via de reparo de mau pareamento do DNA (do inglês, mismatch repair – MMR) (NICOLAIDES et al. 1994). Mutações germinativas em *PMS2* estão associadas à síndrome de Lynch (também conhecida como Câncer Colorretal Hereditário Não Poliposo), na qual se observa um risco elevado para o desenvolvimento de vários tipos de câncer, principalmente câncer colorretal, mas também endométrio, ovário entre outros (HENDRIKS et al. 2006). Duas das três VUS identificadas em *PMS2* nesse estudo (c.961G>A e c.1501G>A) foram classificadas como benignas por pelo menos 5 dos 6 programas de predição. Para a terceira variante (c.2186_2187delTC), embora sua consequência seja a formação de uma proteína truncada por alterar a matriz de leitura, existe um risco de a variante estar localizada em pseudogene (*PMS2CL*), já que ela está localizada no exon 13, e o *PMS2* apresenta homologia dos exons 9 e 11-15 com esse pseudogene (HAYWARD et al. 2007). Assim, por levar em conta o

mapeamento incerto dessas regiões genômicas por técnicas comuns de sequenciamento, o consórcio InSiGHT indica essa variante como VUS no banco de dados ClinVar. No presente estudo, a técnica utilizada na identificação dessa variante não permite que a localização seja determinada com precisão. Dessa forma, apesar do efeito da variante ser provavelmente patogênico, ela foi classificada como VUS. Interessantemente, ainda no contexto de genes associados a aumento de risco de câncer colorretal, observamos que a paciente Adamant44 apresentou uma VUS no gene *APC* (c.3920T>A) que apresenta interpretações conflitantes no banco de dados Clinvar, mas que é reportada como uma variante frequente (3,7-11%) e associada a um risco aumentado para câncer colorretal entre judeus Ashkenazi, embora o risco em outras populações não seja claro (LIANG et al. 2013). A paciente declarou ter ascendência Ashkenazi, entretanto clinicamente não há evidências de Polipose Adenomatose Familiar para o caso, e o papel da variante em relação a aumento de risco de câncer de mama é incerto.

Adicionalmente, dada a associação entre inativação de *BRCA1* e tumores TN, investigamos as VUS que afetavam outros genes relacionados a via de reparo de DNA por recombinação homóloga (além de *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM* e *PALB2* comentados anteriormente). Identificamos 8 VUS nos genes *BARD1* (2/43), *BRIP1* (2/43), *RAD51D* (2/43), *NBN* (1/43) e *MRE11* (1/43). Foi possível investigar LOH para 4 dessas variantes e somente a variante c.3693A>G em *BRIP1* apresentou LOH. Entretanto essa variante, assim como a c.26G>C em *RAD51D*, foi identificada concomitantemente em uma paciente portadora da mutação patogênica em *BRCA1* c.5266dupC (Adamant21). *BRIP1*, *RAD51D* e *BRCA1* estão localizados no cromossomo 17. O fato de termos observado LOH para a variante *BRIP1* poderia estar relacionado a uma perda

cromossômica ampla, provavelmente mais associada a variante patogênica em *BRCA1*. Somado a isso c.3693A>G em *BRIP1* foi classificada como patogênica por apenas 1 de 5 preditores. Já a c.26G>C em *RAD51D* foi classificada como patogênica por 4 de 5 preditores, mas foi reportada com frequência de 0.000821 no banco de dados AbraOM (NASLAVSKY et al. 2017), que disponibiliza informações genômicas em idosos saudáveis, portanto menos prováveis de serem variantes patogênicas. Assim, essas evidências sugerem que ambas as variantes em *BRIP1* e *RAD51D* tem um caráter provavelmente benigno. Além disso, apenas outras 2 VUS foram classificadas como patogênicas pela maior parte dos softwares de predição: c.633T>A em *NBN* (4 de 5) e c.544C>G em *RAD51D* (3 de 5). Entretanto, apenas a predição *in silico* (tanto benigna quanto patogênica) é insuficiente para reclassificar as VUS.

Em relação aos aspectos de mutações somáticas, identificamos 2 variantes somáticas em média por tumor TN. Análise de mais de 2000 tumores de mama de todos os subtipos do consórcio *Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium*-METABRIC identificou uma média de 13 mutações somáticas por tumor, sendo 5 para variantes em região codificante (PEREIRA et al. 2016). Assim, apesar de alguns tumores apresentarem grande número de variantes somáticas, a prevalência dessas variantes tende a ser baixa em tumores de mama se comparada a outros tipos de câncer, como melanoma e câncer de pulmão (ALEXANDROV et al. 2013).

O gene mais frequentemente mutado nessa casuística foi *TP53*, sendo que foram identificadas 16 variantes somáticas em 15 tumores (65,2% - 15/23), reforçando a importância desse gene no processo tumorigênico do câncer de mama triplo-negativo. Essa informação vai ao encontro dos dados do TCGA, os quais mostram que 80% dos tumores *basal-like* (a maior parte deles, triplo-negativo) apresentaram

mutação de perda de função em *TP53* (The Cancer Genome Atlas Network et al. 2012). Além disso, outros estudos também mostram que mutações somáticas em *TP53* e *PIK3CA* são as mais frequentes em câncer de mama (SHAH et al. 2012; PEREIRA et al. 2016). Interessantemente, apenas um tumor apresentou variante em *PIK3CA* no nosso estudo, o que de certa forma é esperado, uma vez que mutações nesse gene são observadas em menor frequência nos tumores TN comparados aos ER+ ou ER-/HER2+ (The Cancer Genome Atlas Network et al. 2012). O segundo gene mais alterado nos tumores investigados foi *SYNE1*, sendo que 3 tumores (13%) apresentaram variantes nesse gene. Ainda pouco se sabe a respeito do papel de *SYNE1*, especialmente na tumorigênese em câncer de mama, uma vez que parece ser um gene frequentemente mutado em vários tipos de câncer (PEREIRA et al. 2016; XU et al. 2019).

A carga mutacional é definida como o número de mutações não sinônimas presente no tecido tumoral e é geralmente representada como a fração entre o número de mutações por megabase de DNA sequenciado. A carga mutacional é variável entre os diferentes tipos de câncer, variando de 0,1 mutações/Mb em certos tumores pediátricos a mais de 400 mutações/Mb em tumores relacionados à exposição a carcinógenos, como melanoma (raios UV) e câncer de pulmão (tabaco), por exemplo (The Cancer Genome Atlas Network et al. 2012; ALEXANDROV et al. 2013; LAWRENCE et al. 2013). Estudos têm mostrado a existência de uma associação entre alta carga mutacional e melhor sobrevida. Além disso, tumores triplo-negativos frequentemente apresentam maior carga mutacional que tumores ER+ (THOMAS et al. 2018). Nesse estudo a carga mutacional média foi de 10,2 mutações/Mb. De forma arbitrária, classificamos com alta carga mutacional aqueles tumores com índice >20

mutações/Mb, seguindo o critério de XU et al. (2019). Com esse ponto de corte apenas 3 tumores (~15% da casuística) foram classificados nesse estrato superior, entretanto não foi observada associação entre alta carga mutacional e status germinativo de *BRCA1/2* ou mesmo de resposta ao tratamento, mesmo usando diferentes pontos de corte (dado não mostrado). Vários aspectos precisam ser considerados na investigação da carga mutacional, como o processamento das amostras (FFPE, tecido congelado), tamanho da região do genoma investigada (exoma, painéis) e profundidade de sequenciamento (maior sensibilidade em amostras com alta cobertura de sequenciamento). MELÉNDEZ et al. (2018) apontam que talvez, para câncer de pulmão, 3 classes possam ser definidas em relação à carga mutacional: alta carga mutacional (>10 mut/mb), baixa (<5 mut/Mb) e indeterminada (entre 5-10 mut/Mb). Outro estudo conduzido por XU et al. (2019) utilizou dados do sequenciamento de exoma do TCGA para selecionar um conjunto de genes menor, mas que fosse representativo para a investigação da carga mutacional. Usando essa abordagem, os autores classificaram com alta carga mutacional aqueles tumores com >20 mut/Mb, nível médio quando entre 20 e 10 mut/Mb e baixo para aqueles com <10 mut/Mb. Contudo, até o momento, não existe uma padronização sobre qual o melhor método para se determinar a carga mutacional ou mesmo qual ponto de corte que permite a identificação dos tumores com maiores probabilidades de resposta ao tratamento, principalmente incluindo inibidores de checkpoint imunológico.

A investigação de ctDNA (marcas tumorais) no DNA circulante livre de células (cfDNA) isolado do plasma pode fornecer informações importantes em relação ao tumor, como desenvolvimento de resistência a quimioterapia e presença de doença residual e recidiva. Nesse estudo, foi possível identificar marcas tumorais presentes no

plasma antes do tratamento em cerca de 60% dos casos, nos quais o ctDNA representou em média 6% (média das frequências alélicas, 0,7-32,2%) do cfDNA total. Estudos indicam que a detecção de altos níveis de ctDNA antes do tratamento cirúrgico estaria associada a mau prognóstico (CATARINO et al. 2008; SCHWARZENBACH et al. 2011; FUJITA et al. 2012). Nesse estudo, o tempo de seguimento ainda é muito curto. Assim, investigamos a Carga de Câncer Residual (RCB, do inglês *Residual Cancer Burden*) (SYMMANS et al. 2007) como um indicativo prognóstico das pacientes e não observamos associação entre a presença de ctDNA no plasma pré-tratamento e resposta, nem mesmo levando em consideração o status de mutação germinativa. Da mesma forma, RIVA et al. (2017) não observaram uma associação entre a identificação de ctDNA pré-tratamento e resposta patológica completa (RPC). Além disso, no estudo de GARCIA-MURILLAS et al. (2015) não houve associação entre positividade para ctDNA no plasma pré-tratamento e recidiva precoce ou sobrevida livre de progressão. Em contraste, ROTHÉ et al. (2019), analisando uma coorte de tumores de mama HER2+, observaram uma associação entre a detecção de ctDNA no plasma pré-tratamento e menores probabilidade de RPC. Dessa forma, ainda é incerto o valor prognóstico da detecção de ctDNA em amostras de DNA de plasma pré-tratamento.

Por outro lado, nesse estudo a investigação das amostras de plasmas coletadas durante o monitoramento mostrou que uma maior porcentagem das pacientes que apresentaram doença residual foi positiva para ctDNA quando comparadas as pacientes que apresentaram RPC (54,5% versus 16%, respectivamente), embora sem significância estatística, provavelmente influenciada pelo pequeno número amostral. Além disso, de forma geral notou-se uma maior carga de ctDNA (maior frequência

alélica das variantes) no DNA de plasma das pacientes que evoluíram com doença residual. Embora com ressalvas, essas informações sugerem uma associação entre presença de tumor e maiores níveis de ctDNA em amostras de plasma, indicando um potencial valor prognóstico dessa investigação, conforme demonstrado em outros trabalhos (MOULIERE et al. 2011; GARCIA-MURILLAS et al. 2015). Entretanto, vale ressaltar que há evidências de que a maior parte das pacientes apresentam níveis não detectáveis de ctDNA após quimioterapia neoadjuvante (RIVA et al. 2017; ROTHÉ et al. 2019). Assim, é possível que mesmo pacientes que apresentam tumor residual exibam níveis indetectáveis de ctDNA no plasma durante quimioterapia neoadjuvante, não permitindo uma associação clara entre RPC e ctDNA, conforme observado nesse estudo.

Ainda assim, a investigação realizada em alguns pacientes desse estudo ilustra claramente o potencial da investigação de ctDNA em amostras de plasma para o monitoramento de resposta. Para a paciente Adamant18 foi identificado ctDNA apenas na amostra de plasma antes do tratamento (baseline), sendo negativa em todas as coletas subsequentes. Interessantemente, a paciente evoluiu com RPC (RCB=0) e permaneceu sem evidência de doença até o último seguimento (19,3 meses). Já para as pacientes Adamant05 e Adamant28 detectamos altos níveis de ctDNA no plasma pré-tratamento, seguida de uma redução inicial após o 1º bloco de quimioterapia (antraciclina e ciclofosfamida), mas com posterior aumento dos níveis de ctDNA nas coletas subsequentes corroboradas pela progressão clínica da doença. Apesar de termos detectado ctDNA na coleta baseline (pré-tratamento) a paciente Adamant05 apresentou níveis indetectáveis na coleta de plasma após 1º bloco de quimioterapia (M1), mas voltou a ser positiva na coleta realizada após o 2º bloco de quimioterapia

(taxano e carboplatina) (M2), indicando ausência de resposta 2 semanas antes da cirurgia, que indicou doença residual (RCB=II). Na coleta realizada após a remoção do tumor primário (M3), novamente não foi detectado ctDNA. Entretanto, na coleta realizada 3 meses após a cirurgia (M4) voltamos a detectar ctDNA, dois meses antes de a paciente apresentar recidiva local. Por fim, na coleta realizada após 6 meses da cirurgia (M5) identificamos níveis ainda maiores de ctDNA e a paciente evoluiu com metástase óssea 2 meses após essa coleta. Já a paciente Adamant28 foi positiva para ctDNA na coleta baseline e apresentou ausência de resposta clínica após o 2º bloco de quimioterapia acompanhada de níveis crescentes de ctDNA nas coletas pós-quimioterapia (M3) e pós-cirurgia (M4), evoluindo com doença residual extensa (RCB=III). Um mês após a coleta pós-cirurgia (M4) foram constatadas metástases hepática, óssea e pulmonar e 2 meses depois disso a paciente evoluiu para óbito. Interessantemente, para ambas as pacientes as variantes mais abundantes no tumor (maior frequência alélica), especialmente em *TP53*, também foram as mais frequentes no DNA isolado do plasma, mostrando uma boa correlação entre as variantes presentes no tecido tumoral e no plasma.

6 CONCLUSÃO

A caracterização molecular dos tumores triplo-negativos da mama, tanto do ponto de vista germinativo como somático, pode fornecer informações relevantes para a melhoria no manejo clínico e do tratamento das pacientes afetadas por esses tumores. Nesse trabalho, constatamos que uma parcela significativa dos tumores TN apresenta um componente hereditário importante, principalmente relacionado a mutações germinativas no gene *BRCA1* e menos frequente também em *BRCA2* e *TP53*, o que pode ter implicações importantes em medidas redutoras de risco para essas pacientes e familiares, bem como no direcionamento de terapias incluindo inibidores de PARP1, por exemplo. Além disso, variantes de significado clínico incerto em vários genes relacionadas a câncer de mama, incluindo *BRCA1* e *BRCA2*, foram identificadas e representam uma grande parcela dos testes genéticos.

Em relação à caracterização somática dos tumores, o uso de novos painéis gênicos para sequenciamento de nova geração aprimorados para amostras emblocadas em parafina e para baixa quantidade de DNA permitiu a detecção das mutações somáticas de forma abrangente. Nesse trabalho, mutações somáticas no gene *TP53* foi o evento mais frequente, entretanto, não foi observada uma associação entre variantes somáticas e tumores hereditários ou mesmo resposta ao tratamento, levando em consideração a presença de doença residual ou resposta patológica completa após a ressecção do tecido tumoral.

Embora ainda desafiadora, a investigação de variantes somáticas em DNA circulante isolado do plasma (ctDNA) na chamada biópsia líquida é factível e

apresenta um enorme potencial no monitoramento das pacientes durante o tratamento, especialmente na detecção de doença residual. Nesse estudo a detecção de ctDNA em amostras de plasma antecipou a identificação da progressão da doença em exames clínicos ou de imagem. De forma geral, os níveis de ctDNA parecem estar associados à carga tumoral, uma vez que pacientes que apresentaram tumor residual e/ou progressão da doença tenderam a exibir maiores níveis de ctDNA.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achatz MI, Zambetti GP. The Inherited p53 Mutation in the Brazilian population. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2016; 6:a026195.

Alemar B, Gregório C, Herzog J, et al. BRCA1 and BRCA2 mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population? **PLoS One** 2017; 12:e0187630.

Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature** 2013; 500:415-421.

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.

Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, et al. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. **Nature** 2012; 486:405-9.

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.

Brianese RC, Nakamura KDM, Almeida FGSR, et al. BRCA1 deficiency is a recurrent event in early-onset triple-negative breast cancer: a comprehensive analysis of germline mutations and somatic promoter methylation. **Breast Cancer Res Treat** 2018; 167:803-14.

Buys SS, Sandbach JF, Gammon A, et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. **Cancer** 2017; 123:1721-30.

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; 14:933-942.

Caramelo O, Silva C, Caramelo F, Frutuoso C, Almeida-Santos T. The effect of neoadjuvant platinum-based chemotherapy in BRCA mutated triple negative breast cancers -systematic review and meta-analysis. **Hered Cancer Clin Pract** 2019; 17:11.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA** 2006; 295:2492-2502.

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, 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.

Catarino R, Ferreira MM, Rodrigues H, et al. Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. **DNA Cell Biol** 2008; 27:415-21.

Catucci I, Radice P, Milne RL, Couch FJ, Southey MC, Peterlongo P. The PALB2 p.Leu939Trp mutation is not associated with breast cancer risk. **Breast Cancer Res** 2016; 18:111.

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; 28:2966-2973.

Cortazar P, Zhang L, Untch M, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: The CTNeoBC pooled analysis. **Lancet** 2014; 384:164-72.

Couch F. Genetic Epidemiology of BRCA1. **Cancer Biol Ther** 2014; 3:509-514.

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.

Couch FJ, Shimelis H, Hu C, et al. Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer. **JAMA Oncol** 2017; 3:1190-6.

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.

Davies H, Glodzik D, Morganella S, et al. HRDetect is a predictor of BRCA1 and BRCA2 deficiency based on mutational signatures. **Nat Med** 2017; 23:517-25.

De Figueiredo Barros BD, Kupper BEC, Aguiar Junior S, et al. Mutation detection in tumor-derived cell free DNA anticipates progression in a patient with metastatic colorectal cancer. **Front Oncol** 2018; 8:306.

De Mattos-Arruda L, Cortes J, Santarpia L, et al. Circulating tumour cells and cell-free DNA as tools for managing breast cancer. **Nat Rev Clin Oncol** 2013; 10:377-89.

De Souza Timoteo AR, Gonçalves AÉMM, Sales LAP, et al. A portrait of germline mutation in Brazilian at-risk for hereditary breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2018; 172:637-46.

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.

Diehl F, Schmidt K, Choti M A, et al. Circulating mutant DNA to assess tumor dynamics. **Nat Med** 2008; 14:985-90.

Earl HM, Hiller L, Dunn JA, et al. Disease-free and overall survival at 3.5 years for neoadjuvant bevacizumab added to docetaxel followed by fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide, for women with HER2 negative early breast cancer: ARTemis Trial. **Ann Oncol** 2017; 28:1817-24.

Easton DF, Pharoah PDP, Antoniou AC, et al. Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. **N Engl J Med** 2015; 372:2243-57.

Ellsworth DL, Turner CE, Ellsworth RE. A review of the hereditary component of triple negative breast cancer: high- and moderate-penetrance breast cancer genes, low-penetrance loci, and the role of nontraditional genetic elements. **J Oncol** 2019; 2019:1-10.

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.

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

Fernandes GC, Michelli RA, Galvão HC, et al. Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. **Oncotarget** 2016; 5:80465-81.

Ferreira EN, Brianese RC, De Almeida RVB, et al. Influence of BRCA1 germline mutations in the somatic mutational burden of triple-negative breast cancer. **Transl Oncol** 2019; 12:1453-60.

Fujita N, Nakayama T, Yamamoto N, et al. Methylated DNA and total DNA in serum detected by one-step methylation-specific PCR is predictive of poor prognosis for breast cancer patients. **Oncology** 2012; 83:273-82.

Garcia-Murillas I, Schiavon G, Weigelt B, et al. Mutation tracking in circulating tumor DNA predicts relapse in early breast cancer. **Sci Transl Med** 2015; 7:302ra133.

Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. **N Engl J Med** 2012; 366:883-92.

Goldgar DE, Healey S, Dowty JG, et al. Rare variants in the ATM gene and risk of breast cancer. **Breast Cancer Res** 2011; 13:R73.

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.

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.

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.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Hanks S, Coleman K, Reid S, et al. Constitutional aneuploidy and cancer predisposition caused by biallelic mutations in BUB1B. **Nat Genet** 2004; 36:1159-61.

Hayward BE, De Vos M, Valleley EMA, et al. Extensive gene conversion at the PMS2 DNA mismatch repair locus. **Hum Mutat** 2007; 28:424-30.

Hendriks YMC, Jagmohan-Changur S, Van der Klift HM, et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). **Gastroenterology** 2006; 130:312-22.

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.

Higgins MJ, Jelovac D, Barnathan E, et al. Detection of tumor PIK3CA status in metastatic breast cancer using peripheral blood. **Clin Cancer Res** 2012; 18:3462-9.

Huen MSY, Sy SMH, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2010; 11:138-48.

Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: Quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. **Cancer Res** 2001; 61:1659-65.

Jones S, Hruban RH, Kamiyama M, et al. Exomic sequencing identifies PALB2 as a pancreatic cancer susceptibility gene. **Science** 2009; 324:217.

Koressaar T, Remm M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. **Bioinformatics** 2007; 23:1289-91.

Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, et al. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. **JAMA** 2017; 317:2402-16.

Lakhani SR. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. **J Clin Oncol** 2002; 20:2310-8.

Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, et al. Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. **Nature** 2013; 499:214-8.

Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib maintenance therapy in platinum-sensitive relapsed ovarian cancer. **N Engl J Med** 2012; 366:1382-92.

Ledermann J, Harter P, Gourley C, et al. Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: a preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial. **Lancet Oncol** 2014; 15:852-61.

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 FP, Fraumeni JF. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. a familial syndrome? **Ann Intern Med** 1969; 71:747-52.

Liang J, Lin C, Hu F, et al. APC polymorphisms and the risk of colorectal neoplasia: a HuGE review and meta-analysis. **Am J Epidemiol** 2013; 177:1169-79.

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.

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.

Litton JK, Rugo HS, Ettl J, et al. Talazoparib in patients with advanced breast cancer and a germline BRCA mutation. **N Engl J Med** 2018; 379:753-63.

Loi S, Drubay D, Adams S, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and prognosis: a pooled individual patient analysis of early-stage triple-negative breast cancers. **J Clin Oncol** 2019; 37:559-69.

Loibl S, Weber KE, Timms KM, et al. Survival analysis of carboplatin added to an anthracycline/taxane-based neoadjuvant chemotherapy and HRD score as predictor of response-final results from GeparSixto. **Ann Oncol** 2018; 29:2341-7.

Mandel P, Metais P. Les acides nucleiques du plasma sanguin chez l'homme. **C R Seances Soc Biol Fil** 1948; 142:241-3.

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.

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

Meléendez B, Van Campenhout C, Rorive S, Rummelink M, Salmon I, D'Haene N. Methods of measurement for tumor mutational burden in tumor tissue. **Transl Lung Cancer Res** 2018; 7:661-7.

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.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018.

Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, et al. PD-L1 expression in triple-negative breast cancer. **Cancer Immunol Res** 2014; 2:361-370.

Mouliere F, Robert B, Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. **PLoS One** 2011; 6:e23418.

Murtaza M, Dawson S-J, Tsui DWY, et al. Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. **Nature** 2013; 497:108-12.

Murtaza M, Dawson S-J, Pogrebniak K, et al. Multifocal clonal evolution characterized using circulating tumour DNA in a case of metastatic breast cancer. **Nat Commun** 2015; 6:8760.

Nanda R, Liu MC, Yau C, et al. Pembrolizumab plus standard neoadjuvant therapy for high-risk breast cancer (BC): results from I-SPY 2. **J Clin Oncol** 2017; 35(15 suppl):506. [Presented at 2017 Annual Meeting Washington, DC, October 9-15, 2017]

Naslavsky MS, Yamamoto GL, De Almeida TF, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Hum Mutat** 2017; 38:751-63.

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.

Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. **Nature** 1994; 371:75-80.

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.

O'Shaughnessy J, 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.

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.

Olsson E, Winter C, George A, et al. Serial monitoring of circulating tumor DNA in patients with primary breast cancer for detection of occult metastatic disease. **EMBO Mol Med** 2015; 7:1034-47.

Oza AM, Cibula D, Benzaquen AO, et al. Olaparib combined with chemotherapy for recurrent platinum-sensitive ovarian cancer: a randomised phase 2 trial. **Lancet Oncol** 2015; 16:87-97.

Palmero EI, Carraro DM, Alemar B, et al. The germline mutational landscape of BRCA1 and BRCA2 in Brazil. **Sci Rep** 2018; 8:9188.

Pellegrino B, Mateo J, Serra V, Balmaña J. Controversies in oncology: are genomic tests quantifying homologous recombination repair deficiency (HRD) useful for treatment decision making? **ESMO Open** 2019; 4:e000480.

Pereira B, Chin S-F, Rueda OM, et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. **Nat Commun** 2016; 7:11479.

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.

Polak P, Kim J, Braunstein LZ, et al. A mutational signature reveals alterations underlying deficient homologous recombination repair in breast cancer. **Nat Genet** 2017; 49:1476-86.

Raczy C, Petrovski R, Saunders CT, et al. Isaac: ultra-fast whole-genome secondary analysis on Illumina sequencing platforms. **Bioinformatics** 2013; 29:2041-3.

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.

Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genet Med** 2015; 17:405-23.

Riva F, Bidard F-C, Houy A, et al. Patient-Specific Circulating Tumor DNA detection during neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. **Clin Chem** 2017; 63:691-9.

Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, et al. Integrative genomics viewer. **Nat Biotechnol** 2011; 29:24-6.

Robson M, Im S-A, Senkus E, et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA Mutation. **N Engl J Med** 2017; 377:523-33.

Rodrigue A, Margaillan G, Gomes TT, et al. A global functional analysis of missense mutations reveals two major hotspots in the PALB2 tumor suppressor. **Nucleic Acids Res** 2019; 47:10662-77.

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.

Rothé F, Silva MJ, Venet D, et al. Circulating tumor DNA in HER2-amplified breast cancer: a Translational Research Substudy of the NeoALTTO Phase III Trial. **Clin Cancer Res** 2019; 25:3581-8.

Roy R, Chun J, Powell SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nat Rev.Cancer** 2012; 12:68-78.

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.

Schmid P, Adams S, Rugo HS, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in advanced triple-negative breast cancer. **N Engl J Med** 2018; 379:2108-21.

Schwarzenbach H, Müller V, Milde-Langosch K, Steinbach B, Pantel K. Evaluation of cell-free tumour DNA and RNA in patients with breast cancer and benign breast disease. **Mol Biosyst** 2011; 7:2848-54.

Scintu M, Vitale R, Prencipe M, et al. Genomic instability and increased expression of BUB1B and MAD2L1 genes in ductal breast carcinoma. **Cancer Lett** 2007; 254:298-307.

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.

Shaw JA., Page K, Blighe K, et al. Genomic analysis of circulating cell-free DNA infers breast cancer dormancy. **Genome Res** 2012; 22:220-31.

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. **J Clin Oncol** 2015; 33:13-21.

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.

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

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

Staa J, Glodzik D, Bosch A, et al. Whole-genome sequencing of triple-negative breast cancers in a population-based clinical study. **Nat Med** 2019; 25:1526-33.

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

Symmans WF, Peintinger F, Hatzis C, et al. Measurement of residual breast cancer burden to predict survival after neoadjuvant chemotherapy. **J Clin Oncol** 2007; 25:4414-22.

Symmans WF, Wei C, Gould R, et al. Long-term prognostic risk after neoadjuvant chemotherapy associated with residual cancer burden and breast cancer subtype. **J Clin Oncol** 2017; 35:1049-60.

Taylor SS, Ha E, McKeon F. The Human Homologue of Bub3 Is Required for Kinetochore Localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related Protein Kinase. **J Cell Biol** 1998; 142:1-11.

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

Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, et al. Clinical validation of the detection of KRAS and BRAF mutations from circulating tumor DNA. **Nat Med** 2014; 20:430-5.

Thomas A, Routh ED, Pullikuth A, et al. Tumor mutational burden is a determinant of immune-mediated survival in breast cancer. **Oncoimmunology** 2018; 7:e1490854.

Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. **Brief Bioinform** 2013; 14:178-92.

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.

Torrezan GT, De Almeida FGSR, Figueiredo MCP, et al. complex landscape of germline variants in brazilian patients with hereditary and early onset breast cancer. **Front Genet** 2018; 9:161.

Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of “BRCAness” in sporadic cancers. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:814-9.

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.

Vaclavicek A, Bermejo JL, Wappenschmidt B, et al. Genetic variation in the major mitotic checkpoint genes does not affect familial breast cancer risk. **Breast Cancer Res Treat** 2007; 106:205-13.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz L A, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. **Science** 2013; 339:1546-58.

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.

Waks AG, Winer EP. Breast cancer treatment. **JAMA** 2019; 321:288.

Wen WX, Leong C-O. Association of BRCA1- and BRCA2-deficiency with mutation burden, expression of PD-L1/PD-1, immune infiltrates, and T cell-inflamed signature in breast cancer. **PLoS One** 2019; 14:e0215381.

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.

Xia B, Dorsman JC, Ameziane N, et al. Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. **Nat Genet** 2007; 39:159-61.

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.

Xu Z, Dai J, Wang D, et al. Assessment of tumor mutation burden calculation from gene panel sequencing data. **Oncotargets Ther** 2019; 12:3401-9.

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



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

APROVAÇÃO

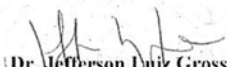
Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de 20/09/2016, aprovaram a realização do projeto afiliado nº 1746/13E intitulado: “Investigação da dinâmica mutacional em tumores triplo negativos da mama através do sequenciamento de DNA tumoral circulante”, o qual está vinculado ao projeto temático nº 1746/13, intitulado: “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”.

Pesquisador responsável: Dra. Dirce Maria Carraro
Aluna: Aluno: Rafael Canfield Brianese (Doutorado)

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 26 de setembro de 2016.

Atenciosamente,



Dr. Jefferson Luiz Gross

Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Apêndice 1 - Painel de Genes para Sequenciamento de Nova Geração

Os painéis de genes de predisposição ao câncer utilizados neste trabalho foram: Painel 2 genes *BRCA1/2* (Ampliseq BRCA panel for Illumina - genes *BRCA1* e *BRCA2* - Thermo Fisher), Painel 26 genes (Hereditary Cancer Solution - Sophia Genetics), Painel 27 genes (IDT customizados – Integrated DNA Technologies) e Painel 94 genes (TruSight Cancer - Illumina). Já os painéis utilizados para identificação de variantes somáticas foram: Painel 93 (Qiaseq Targeted DNA Human Breast Cancer - Qiagen) e Painel 409 (OncoPrint Tumor Mutation Load Assay - Thermo Fisher). A tabela abaixo lista os genes contemplados em cada painel, marcando, em negrito, genes cobertos por mais de um painel.

Quadro A1 - Lista de genes contemplados pelos painéis de sequenciamento de nova geração utilizados neste estudo

Painel CMTN customizado (não sintetizado) - 401 genes				OncoPrint Tumor Mutation Load Assay (ThermoFisher) - 409 genes				TruSight Cancer (illumina) - 94 genes	Qiaseq Targeted DNA Human Breast Cancer (Qiagen) - 93 genes	Painel IDT customizado (IDT) - 27 genes	Hereditary Cancer Solution (Sophia Genetics) - 26 genes
<i>AADA4</i>	<i>EGFR</i>	<i>MIR548W</i>	<i>RYR2</i>	<i>ABL1</i>	<i>EPHB1</i>	<i>LTF</i>	<i>PPP2R1A</i>	<i>AIP</i>	<i>ACVR1B</i>	<i>APC</i>	<i>APC</i>
<i>ACE2</i>	<i>EIF3D</i>	<i>MLH1</i>	<i>SAXO2</i>	<i>ABL2</i>	<i>EPHB4</i>	<i>LTK</i>	<i>PRDM1</i>	<i>ALK</i>	<i>AKT1</i>	<i>ATM</i>	<i>ATM</i>
<i>ACKR1</i>	<i>EP300</i>	<i>MLL4</i>	<i>SBK1</i>	<i>ACVR2A</i>	<i>EPHB6</i>	<i>MAF</i>	<i>PRKARIA</i>	<i>APC</i>	<i>APC</i>	<i>BARD1</i>	<i>BARD1</i>
<i>ACTN3</i>	<i>EPB42</i>	<i>MNDA</i>	<i>SBNO1</i>	<i>ADAMTS20</i>	<i>ERBB2</i>	<i>MAFB</i>	<i>PRKDC</i>	<i>ATM</i>	<i>AR</i>	<i>BMPRIA</i>	<i>BRCA1</i>
<i>ACVRL1</i>	<i>ERAS</i>	<i>MRE11A</i>	<i>SCN8A</i>	<i>AFF1</i>	<i>ERBB3</i>	<i>MAGEA1</i>	<i>PSIP1</i>	<i>BAP1</i>	<i>ATM</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
<i>ADAM30</i>	<i>ERBB2</i>	<i>MSH2</i>	<i>SETD1A</i>	<i>AFF3</i>	<i>ERBB4</i>	<i>MAG11</i>	<i>PTCH1</i>	<i>BLM</i>	<i>ATR</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BRIP1</i>
<i>ADAM9</i>	<i>ERBB3</i>	<i>MSH6</i>	<i>SETD2</i>	<i>AKAP9</i>	<i>ERCC1</i>	<i>MALT1</i>	<i>PTEN</i>	<i>BMPRIA</i>	<i>AXIN2</i>	<i>BRIP1</i>	<i>CDH1</i>
<i>ADCY3</i>	<i>ERBB4</i>	<i>MTAP</i>	<i>SETDB1</i>	<i>AKT1</i>	<i>ERCC2</i>	<i>MAML2</i>	<i>PTGS2</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BAP1</i>	<i>CDH1</i>	<i>CHEK2</i>
<i>ADGRA2</i>	<i>ERLE1</i>	<i>MUC16</i>	<i>SF3B1</i>	<i>AKT2</i>	<i>ERCC3</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>PTPN11</i>	<i>BRCA2</i>	<i>BARD1</i>	<i>CDK4</i>	<i>EPCAM</i>
<i>AFF2</i>	<i>ESPN</i>	<i>MUC4</i>	<i>SGCD</i>	<i>AKT3</i>	<i>ERCC4</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>PTPRD</i>	<i>BRIP1</i>	<i>BLM</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>FAM175A</i>
<i>AGMO</i>	<i>ESYT3</i>	<i>MUC5B</i>	<i>SHANK2</i>	<i>ALK</i>	<i>ERCC5</i>	<i>MAP2K4</i>	<i>PTPRT</i>	<i>BUB1B</i>	<i>BMPRIA</i>	<i>CHEK2</i>	<i>MLH1</i>
<i>AGTR2</i>	<i>EXOC2</i>	<i>MUC6</i>	<i>SIAH1</i>	<i>APC</i>	<i>ERG</i>	<i>MAP3K7</i>	<i>RAD50</i>	<i>CDC73</i>	<i>BRCA1</i>	<i>EPCAM</i>	<i>MRE11A</i>

AGTRAP	EXPH5	MUTYH	SIGLEC10	AR	ESR1	MAPK1	RAF1	CDH1	BRCA2	MLH1	MSH2
AHNAK	FAM133A	MYD88	SIGLEC12	ARID1A	ETS1	MAPK8	RALGDS	CDK4	BRIP1	MSH2	MSH6
AHNAK2	FAM136A	MYH9	SIK1	ARID2	ETV1	MARK1	RARA	CDKN1C	CASP8	MSH6	MUTYH
AIM1L	FAM20C	MYO1A	SIK2	ARNT	ETV4	MARK4	RB1	CDKN2A	CBFB	MUTYH	NBN
AKAP9	FANCA	MYO3A	SLC22A2	ASXL1	EXT1	MBD1	RECQL4	CEBPA	CCND1	NBN	PALB2
AKT1	FANCD2	NANOGNB	SMAD2	ATF1	EXT2	MCL1	REL	CEP57	CDH1	NF1	PIK3CA
AKT2	FASTKD1	NBN	SMAD4	ATM	EZH2	MDM2	RET	CHEK2	CDK4	PALB2	PMS2
ALB	FBXW7	NCOA3	SMARCB1	ATR	FAM123B	MDM4	RHOH	CYLD	CDK6	PMS2	PTEN
ALK	FGL1	NCOR1	SMARCC1	ATRX	FANCA	MEN1	RNASEL	DDB2	CDKN2A	PTEN	RAD50
ANKLE2	FHOD3	NCOR2	SMARCC2	AURKA	FANCC	MET	RNF2	DICER1	CHEK2	RAD51C	RAD51C
ANKS3	FIP1L1	NCSTN	SMARCD1	AURKB	FANCD2	MITF	RNF213	DIS3L2	CSMD1	RAD51D	RAD51D
APC	FLG	NDFIP1	SMIM24	AURKC	FANCF	MLH1	ROS1	EGFR	CTNNB1	RET	STK11
ARID1A	FLT3	NEK1	SNED1	AXL	FANCG	MLL	RPS6KA2	EPCAM	DIRAS3	SMARCA4	TP53
ARID1B	FOXO1	NETO1	SOAT2	BAI3	FANCI	MLL2	RRM1	ERCC2	EGFR	STK11	XRCC2
ARID2	FOXO3	NF1	SPACA1	BAP1	FAS	MLL3	RUNX1	ERCC3	EP300	TP53	
ARID5B	FOXP1	NF2	SPATS2L	BCL10	FBXW7	MLLT10	RUNX1T1	ERCC4	EPCAM		
ASB10	FRMD3	NFAT5	SSPO	BCL11A	FGFR1	MMP2	SAMD9	ERCC5	ERBB2		
ASB12	FUCA2	NKTR	STAB2	BCL11B	FGFR2	MN1	SBDS	EXT1	ERBB3		
ASB3	GABRB3	NOP16	STARD13	BCL2	FGFR3	MPL	SDHA	EXT2	ERCC4		
ASXL1	GAS2L1	NOTCH1	STARD9	BCL2L1	FGFR4	MRE11A	SDHB	EZH2	ESR1		
ASXL2	GATA3	NPNT	STK11	BCL2L2	FH	MSH2	SDHC	FANCA	EXOC2		
ATM	GGNBP2	NR2F1	STK33	BCL3	FLCN	MSH6	SDHD	FANCB	EXT2		
ATP1A2	GH1	NR3C1	STMN2	BCL6	FLI1	MTOR	SEPT9	FANCC	FAM175A		
ATP1B1	GLDC	NRAS	SVEP1	BCL9	FLT1	MTR	SETD2	FANCD2	FANCC		
ATP8B3	GLI2	NRG3	SYNE1	BCR	FLT3	MTRR	SF3B1	FANCE	FBXO32		
ATR	GLIS3	NRXN1	TAF1	BIRC2	FLT4	MUC1	SGK1	FANCF	FGFR1		
ATXN2L	GLRB	NRXN3	TAF4B	BIRC3	FN1	MUTYH	SH2D1A	FANCG	FGFR2		
BAP1	GPATCH4	NT5E	TBC1D5	BIRC5	FOXL2	MYB	SMAD2	FANCI	GATA3		
BARD1	GPR161	OR2T1	TBL1XR1	BLM	FOXO1	MYC	SMAD4	FANCL	GEN1		
BCAS3	GPR32	OR4C45	TBX3	BLNK	FOXO3	MYCL1	SMARCA4	FANCM	HERC1		
BDNF	GPR33	OR4N4	TDRD6	BMPRIA	FOXP1	MYCN	SMARCB1	FH	HOXB13		
BIRC6	GPR75	OR6A2	TDRD9	BRAF	FOXP4	MYD88	SMO	FLCN	IRAK4		
BRAF	GPS2	OR8G1	TEX264	BRD3	FZR1	MYH11	SMUG1	GATA2	ITCH		
BRCA1	GREB1	OR8G5	TG	BTK	G6PD	MYH9	SOCS1	GPC3	KMT2C		
BRCA2	HDAC9	OSBPL11	THADA	BUB1B	GATA1	NBN	SOX11	HNFI1A	KRAS		

<i>BRIP1</i>	<i>HECW2</i>	<i>OTUD4</i>	<i>THSD7A</i>	<i>CARD11</i>	<i>GATA2</i>	<i>NCOA1</i>	<i>SOX2</i>	<i>HRAS</i>	<i>MAP2K4</i>		
<i>C9ORF43</i>	<i>HERC2</i>	<i>PAEP</i>	<i>TMEM97</i>	<i>CASC5</i>	<i>GATA3</i>	<i>NCOA2</i>	<i>SRC</i>	<i>KIT</i>	<i>MAP3K1</i>		
<i>CA13</i>	<i>HIST1H2BC</i>	<i>PALB2</i>	<i>TMPRSS9</i>	<i>CBL</i>	<i>GDNF</i>	<i>NCOA4</i>	<i>SSX1</i>	<i>MAX</i>	<i>MDM2</i>		
<i>CACNA2D1</i>	<i>HLA-DPA1</i>	<i>PALLD</i>	<i>TNNT2</i>	<i>CCND1</i>	<i>GNA11</i>	<i>NF1</i>	<i>STK11</i>	<i>MEN1</i>	<i>MED12</i>		
<i>CACNA2D3</i>	<i>HRAS</i>	<i>PBRM1</i>	<i>TP53</i>	<i>CCND2</i>	<i>GNAQ</i>	<i>NF2</i>	<i>STK36</i>	<i>MET</i>	<i>MEN1</i>		
<i>CAMTA1</i>	<i>HUS1B</i>	<i>PCSK5</i>	<i>TRANK1</i>	<i>CCNE1</i>	<i>GNAS</i>	<i>NFE2L2</i>	<i>SUFU</i>	<i>MLH1</i>	<i>MLH1</i>		
<i>CAPN11</i>	<i>HYDIN</i>	<i>PDE1C</i>	<i>TSC22D1</i>	<i>CD79A</i>	<i>GPR124</i>	<i>NFKB1</i>	<i>SYK</i>	<i>MSH2</i>	<i>MRE11A</i>		
<i>CASP8</i>	<i>IFNA14</i>	<i>PDE4DIP</i>	<i>TTN</i>	<i>CD79B</i>	<i>GRM8</i>	<i>NFKB2</i>	<i>SYNE1</i>	<i>MSH6</i>	<i>MSH2</i>		
<i>CBFB</i>	<i>IGFN1</i>	<i>PHF6</i>	<i>TTYH1</i>	<i>CDC73</i>	<i>GUCY1A2</i>	<i>NIN</i>	<i>TAF1</i>	<i>MUTYH</i>	<i>MSH6</i>		
<i>CCDC190</i>	<i>IGSF10</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>TUBAL3</i>	<i>CDH1</i>	<i>HCAR1</i>	<i>NKX2-1</i>	<i>TAF1L</i>	<i>NBN</i>	<i>MUC16</i>		
<i>CCND3</i>	<i>IGSF11</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>TYRP1</i>	<i>CDH11</i>	<i>HIF1A</i>	<i>NLRP1</i>	<i>TAL1</i>	<i>NF1</i>	<i>MUTYH</i>		
<i>CDH1</i>	<i>IL2</i>	<i>PLA2R1</i>	<i>UBR5</i>	<i>CDH2</i>	<i>HLF</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>TBX22</i>	<i>NF2</i>	<i>MYC</i>		
<i>CDH16</i>	<i>INTS8</i>	<i>PLEKHA4</i>	<i>UGT2A1</i>	<i>CDH20</i>	<i>HNF1A</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>TCF12</i>	<i>NSD1</i>	<i>NBN</i>		
<i>CDK14</i>	<i>ITSN2</i>	<i>PLEKHA7</i>	<i>UGT2A2</i>	<i>CDH5</i>	<i>HOOK3</i>	<i>NOTCH4</i>	<i>TCF3</i>	<i>PALB2</i>	<i>NCOR1</i>		
<i>CDKL2</i>	<i>JAK1</i>	<i>PLEKHA8</i>	<i>UIMC1</i>	<i>CDK12</i>	<i>HRAS</i>	<i>NPM1</i>	<i>TCF7L1</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>NEK2</i>		
<i>CDKN1B</i>	<i>KDM3A</i>	<i>PLEKHH1</i>	<i>UNC80</i>	<i>CDK4</i>	<i>HSP90AA1</i>	<i>NRAS</i>	<i>TCF7L2</i>	<i>PMS1</i>	<i>NF1</i>		
<i>CDKN2A</i>	<i>KDM6A</i>	<i>PMS1</i>	<i>USH2A</i>	<i>CDK6</i>	<i>HSP90AB1</i>	<i>NSD1</i>	<i>TCL1A</i>	<i>PMS2</i>	<i>PALB2</i>		
<i>CDON</i>	<i>KHDRBS2</i>	<i>PMS2</i>	<i>USP26</i>	<i>CDK8</i>	<i>ICK</i>	<i>NTRK1</i>	<i>TET1</i>	<i>PRF1</i>	<i>PALLD</i>		
<i>CDR1</i>	<i>KIAA0040</i>	<i>PNPLA3</i>	<i>USP28</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>IDH1</i>	<i>NTRK3</i>	<i>TET2</i>	<i>PRKARIA</i>	<i>PBRM1</i>		
<i>CENPO</i>	<i>KIAA0196</i>	<i>POTEJ</i>	<i>USP35</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>IDH2</i>	<i>NUMA1</i>	<i>TFE3</i>	<i>PTCH1</i>	<i>PCGF2</i>		
<i>CEP290</i>	<i>KLRG1</i>	<i>PPARA</i>	<i>USP6</i>	<i>CDKN2C</i>	<i>IGF1R</i>	<i>NUP214</i>	<i>TGFBR2</i>	<i>PTEN</i>	<i>PIK3CA</i>		
<i>CHD1</i>	<i>KMT2B</i>	<i>PPP2CB</i>	<i>USP8</i>	<i>CEBPA</i>	<i>IGF2</i>	<i>NUP98</i>	<i>TGM7</i>	<i>RAD51C</i>	<i>PIK3R1</i>		
<i>CHD3</i>	<i>KMT2C</i>	<i>PPP2R2A</i>	<i>USP9X</i>	<i>CHEK1</i>	<i>IGF2R</i>	<i>PAK3</i>	<i>THBS1</i>	<i>RAD51D</i>	<i>PMS1</i>		
<i>CHEK2</i>	<i>KMT2D</i>	<i>PREP</i>	<i>UTRN</i>	<i>CHEK2</i>	<i>IKBKB</i>	<i>PALB2</i>	<i>TIMP3</i>	<i>RB1</i>	<i>PMS2</i>		
<i>CHPF</i>	<i>KRAS</i>	<i>PRKACG</i>	<i>WAPL</i>	<i>CIC</i>	<i>IKBKE</i>	<i>PARP1</i>	<i>TLR4</i>	<i>RECQL4</i>	<i>PPM1L</i>		
<i>CLEC1A</i>	<i>KRTAP29-1</i>	<i>PRKCE</i>	<i>WDFY3</i>	<i>CKS1B</i>	<i>IKZF1</i>	<i>PAX3</i>	<i>TLX1</i>	<i>RET</i>	<i>PTEN</i>		
<i>CLEC2B</i>	<i>KSR1</i>	<i>PRKCQ</i>	<i>WDR87</i>	<i>CMPK1</i>	<i>IL2</i>	<i>PAX5</i>	<i>TNFAIP3</i>	<i>RHBDF2</i>	<i>PTGFR</i>		
<i>CLK3</i>	<i>LICAM</i>	<i>PRKCZ</i>	<i>XKRX</i>	<i>COL1A1</i>	<i>IL21R</i>	<i>PAX7</i>	<i>TNFRSF14</i>	<i>RUNX1</i>	<i>RAD50</i>		
<i>CLRN2</i>	<i>LAMA2</i>	<i>PRKG1</i>	<i>XRCC2</i>	<i>CRBN</i>	<i>IL6ST</i>	<i>PAX8</i>	<i>TNK2</i>	<i>SBDS</i>	<i>RAD51</i>		
<i>COL12A1</i>	<i>LAMB3</i>	<i>PRPS2</i>	<i>ZER1</i>	<i>CREB1</i>	<i>IL7R</i>	<i>PBRM1</i>	<i>TOP1</i>	<i>SDHAF2</i>	<i>RAD51C</i>		
<i>COL22A1</i>	<i>LARGE</i>	<i>PRR16</i>	<i>ZFHX4</i>	<i>CREBBP</i>	<i>ING4</i>	<i>PBX1</i>	<i>TP53</i>	<i>SDHB</i>	<i>RAD51D</i>		
<i>COL6A3</i>	<i>LDLRAP1</i>	<i>PRRC2C</i>	<i>ZFP36L1</i>	<i>CRKL</i>	<i>IRF4</i>	<i>PDE4DIP</i>	<i>TPR</i>	<i>SDHC</i>	<i>RB1</i>		
<i>COL8A1</i>	<i>LIFR</i>	<i>PSG3</i>	<i>ZKSCAN5</i>	<i>CRTC1</i>	<i>IRS2</i>	<i>PDGFB</i>	<i>TRIM24</i>	<i>SDHD</i>	<i>RET</i>		
<i>CRIPAK</i>	<i>LIP1</i>	<i>PTEN</i>	<i>ZNF235</i>	<i>CSF1R</i>	<i>ITGA10</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>TRIM33</i>	<i>SLX4</i>	<i>SEPT9</i>		
<i>CTCF</i>	<i>LOX</i>	<i>PTPN22</i>	<i>ZNF283</i>	<i>CSMD3</i>	<i>ITGA9</i>	<i>PDGFRB</i>	<i>TRIP11</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SMAD4</i>		

<i>CTNNA1</i>	<i>LRGUK</i>	<i>PTPN4</i>	<i>ZNF419</i>	<i>CTNNA1</i>	<i>ITGB2</i>	<i>PER1</i>	<i>TRRAP</i>	<i>SMARCB1</i>	<i>SMARCA4</i>		
<i>CTNNA3</i>	<i>LRP2</i>	<i>PTPRB</i>	<i>ZNF430</i>	<i>CTNNA1</i>	<i>ITGB3</i>	<i>PGAP3</i>	<i>TSC1</i>	<i>STK11</i>	<i>STK11</i>		
<i>CXCR1</i>	<i>LRRC36</i>	<i>PTPRD</i>	<i>ZNF528</i>	<i>CYLD</i>	<i>JAK1</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>TSC2</i>	<i>SUFU</i>	<i>SYNE1</i>		
<i>CYR61</i>	<i>LURAP1L</i>	<i>PTPRM</i>	<i>ZNF529</i>	<i>CYP2C19</i>	<i>JAK2</i>	<i>PIK3C2B</i>	<i>TSHR</i>	<i>TMEM127</i>	<i>TGFB1</i>		
<i>DAGLA</i>	<i>MAGEA8</i>	<i>PTPRO</i>	<i>ZNF563</i>	<i>CYP2D6</i>	<i>JAK3</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>UBR5</i>	<i>TP53</i>	<i>TP53</i>		
<i>DCAF12L1</i>	<i>MAMLD1</i>	<i>RABGAP1L</i>	<i>ZNF717</i>	<i>DAXX</i>	<i>JUN</i>	<i>PIK3CB</i>	<i>UGT1A1</i>	<i>TSC1</i>	<i>TRAF5</i>		
<i>DCAF4L2</i>	<i>MAP1A</i>	<i>RAD50</i>	<i>ZNF728</i>	<i>DCC</i>	<i>KAT6A</i>	<i>PIK3CD</i>	<i>USP9X</i>	<i>TSC2</i>	<i>VHL</i>		
<i>DCSTAMP</i>	<i>MAP2K4</i>	<i>RAD51AP2</i>	<i>ZNF99</i>	<i>DDB2</i>	<i>KAT6B</i>	<i>PIK3CG</i>	<i>VHL</i>	<i>VHL</i>	<i>WEE1</i>		
<i>DDHD1</i>	<i>MAP3K1</i>	<i>RAD51C</i>	<i>ZSWIM8</i>	<i>DDIT3</i>	<i>KDM5C</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>WAS</i>	<i>WRN</i>	<i>XRCC2</i>		
<i>DDX56</i>	<i>MAP3K10</i>	<i>RAD51D</i>	<i>ZSWIM8-AS1</i>	<i>DDR2</i>	<i>KDM6A</i>	<i>PIK3R2</i>	<i>WHSC1</i>	<i>WT1</i>	<i>XRCC3</i>		
<i>DISP1</i>	<i>MAP3K13</i>	<i>RASGEF1B</i>		<i>DEK</i>	<i>KDR</i>	<i>PIM1</i>	<i>WRN</i>	<i>XPA</i>	<i>ZBED4</i>		
<i>DNAH10</i>	<i>MAP3K9</i>	<i>RB1</i>		<i>DICER1</i>	<i>KEAP1</i>	<i>PKHD1</i>	<i>WT1</i>	<i>XPC</i>			
<i>DNAH11</i>	<i>MARCH10</i>	<i>REST</i>		<i>DNMT3A</i>	<i>KIT</i>	<i>PLAG1</i>	<i>XPA</i>				
<i>DNAH2</i>	<i>MATN2</i>	<i>RIMS2</i>		<i>DPYD</i>	<i>KLF6</i>	<i>PLCG1</i>	<i>XPC</i>				
<i>DNAH5</i>	<i>MBL2</i>	<i>RLF</i>		<i>DST</i>	<i>KRAS</i>	<i>PLEKHG5</i>	<i>XPO1</i>				
<i>DNHD1</i>	<i>MCMDC2</i>	<i>RNF213</i>		<i>EGFR</i>	<i>LAMP1</i>	<i>PML</i>	<i>XRCC2</i>				
<i>DPCR1</i>	<i>MEN1</i>	<i>RNU6-28P</i>		<i>EML4</i>	<i>LCK</i>	<i>PMS1</i>	<i>ZNF384</i>				
<i>DTWD2</i>	<i>METTL14</i>	<i>ROS1</i>		<i>EP300</i>	<i>LIFR</i>	<i>PMS2</i>	<i>ZNF521</i>				
<i>DYNC2H1</i>	<i>METTL2B</i>	<i>RPGR</i>		<i>EP400</i>	<i>LPHN3</i>	<i>POT1</i>					
<i>E2F8</i>	<i>MIR548G</i>	<i>RSF1</i>		<i>EPHA3</i>	<i>LPP</i>	<i>POU5F1</i>					
<i>EFCAB5</i>	<i>MIR548N</i>	<i>RUNX1</i>		<i>EPHA7</i>	<i>LRP1B</i>	<i>PPARG</i>					

Apêndice 2 - Painéis Tumorais Personalizados (PTP) para *Deep-Amplicon Sequencing*

Quadro A2: Iniciadores desenhados para sequenciamento de amplicons com alta cobertura.

Gene	ID primer	Sequencia (5'-3')	Coordenada da região amplificada (hg19)
AKT	AKT1_D3E_F	GCTTCCTTTGCTTCTCCAG	chr14:105258951-105259079
	AKT1_D3E_R	ACCCTCCTTACAATAGCCA	
AURKA	AURKA_R137L_F	GCTTTGGAAGACTTTGAAATTGG	chr20:54958085-54958222
	AURKA_R137L_R	CACTCCGGCTTTCTCCAG	
AURKB	AURKB_S37F_F	GCACCCTCAGAGCTACCC	chr17:8111073-8111191
	AURKB_S37F_R	GAGCGGCTCATGAGGACAA	
AURKC	AURKC_R125K_F	TATTTCCATGATGCACGCCG	chr19:57743938+57744025
	AURKC_R125K_R	ATTTCTCGCTTTTCTGCAGC	
CDH2	CDH2_D560Y_F	AAATTATCTGATCCTGCCAATTG	chr18:25568494-25568623
	CDH2_D560Y_R	CAGAAGCAAGGAAAGTAGCATT	
COL1A1	COL1A1_E510A_F	TCTTCCTCTTTTGGCCCGTG	chr17:48271744-48271882
	COL1A1_E510A_R	CCAGCTTACCAGGAGATCC	
CSMD3	CSMD3_Q705E_F	TGGAATTAGAGAAGGCGATGGA	chr8:113702101-113702236
	CSMD3_Q705E_R	ACAGATGGGTATGTTGCAGA	
DCC	DCC_H1191D_F	AGTTGCCAAGACCTCACACC	chr18:50985753+50985886
	DCC_H1191D_R	AAACTCCCTGGGTTACAGAA	
EPHA3	EPHA3_T442K_F	TCCCCTCCCATCTCTCTTT	chr3:89444963+89445065
	EPHA3_T442K_R	TGTTCAAGTCTTGGCCAGGA	
EPHA7	EPHA7_D758E_F	TGAGAGGAATTGCTGCTGGA	chr6:93965616-93965712
	EPHA7_D758R_R	ACGAGATTGCTGTTGACAAGA	
EPHB1	EPHB1_T451I_F	CAGTGCCACTATGAGGAGCA	chr3:134873025+134873156
	EPHB1_T451I_R	CCTTGGGTCTTGCAAGCTTG	
FANCD2	FANCD2_G754D_F	TGGAGAGACAGCATAACGGA	chr3:10107131+10107256
	FANCD2_G754D_R	TGTATTGATCTGCCCTTTCCT	
GRM8	GRM8_T685I_F	CATATGCTCCTCCGACGGG	chr7:126173361-126173498
	GRM8_T685I_R	GGACTAATGAAGTGGGCGC	
ITGB2	ITGB2_A702T_F	TCAGGTGTGCTGCTTCTCC	chr21:46306705-46306841
	ITGB2_A702T_R	GTCGCTCAGGTGGATCAGAG	
KDR	KDR_C1045F_F	CTGTGCCGAGACCTAATGCA	chr4:55956153-55956284
	KDR_C1045F_R	ATAAATATCCCGGCCAAGC	
LRP1B	LRP1B_R3186H_F	TGACTGCTGCGAGTATCCTC	chr2:141232754-141232891
	LRP1B_R3186H_R	TCATCGGCCAGTAGAGTCT	
MALT1	MALT1_S214N_F	AGTGGTCACAGCTGGATGTT	chr18:56367779+56367858
	MALT1_S214N_R	CCCCATCCCAACATTCAGCT	
MYD88	MYD88_S219F_F	AAGTTGTGTGTGTCTGACCG	chr3:38181983+38182073
	MYD88_S219F_R	GCCTTCTAGCCAACCTCTTT	
NCOA1	NCOA1_M1135I_F	TGTACAGTCAACAGCACCGA	chr2:24964696+24964795
	NCOA1_M1135I_R	CCAGATGAGGGAGGGAGGTT	
NOTCH2	NOTCH2_L1413H_F	ATTACTCTGCCAGTGTGCC	chr1:120468116-120468249
	NOTCH2_L1413H_R	CTCATCACAGACGCCATCCC	
	NOTCH2_R1889R_F	GACTGGTGAGATGGCCCTG	chr1:120461989-120462091
	NOTCH2_R1889R_R	CATGTTGTCTGGGCATTGG	
NUP98	NUP98_D870H_F	AGGCAGGTATTGGGAAAAGCA	chr11:3733904-3734018
	NUP98_D870H_R	GCTCCTCCTCCTTCATCA	
PAK3	PAK3_V170M_F	GCATCTGAGCCTCCATTGG	chrX:110406155+110406266

	PAK3_V170M_R	TATGCTCTGGTCTTGGTGCG	
PBRM1	PBMR1_L1565F_F	GCCTACCCTCTCACTGGCTG	chr3:52582103-52582209
	PBMR1_L1565F_R	TTGGCGAATGTTGAGGGTGT	
PBX1	PBX1_Y253F_F	ACAAGCAAGCGACAGAAATCC	chr1:164776799+164776923
	PBX1_Y253F_R	GCTGCTTACCTGGGAGACTG	
PIK3CA	PIK3CA_L10Q_F	AACAATGCCTCCACGACCAT	chr3:178916610+178916729
	PIK3CA_L10Q_R	TCACGGAGGCATTCTAAAGTCA	
PKHD1	PKHD1_I2459M_F	AGGGAAGTCTGTGTATGTCATCT	chr6:51735326-51735439
	PKHD1_I2459M_R	AGGTTCTAATGCCACACAGTT	
	PKHD1_L2028R_F	TCCAAGGCAGAGCTCAGATC	chr6:51798904-51799015
	PKHD1_L2028R_R	TCACCGTGCAGAGAAAGAGT	
PPARG	PPARG_L504F_F	GCAGGTGATCAAGAAGACGGA	chr3:12475569+12475679
	PPARG_L504F_R	GAAGGGAAATGTTGGCAGTGG	
PTPRD	PTPRD_R995C_F	TTGTTCCAGCTGACACCACT	chr9:8485781-8485902
	PTPRD_R995C_R	CCTGAAGTGGACACTGGGAC	
RNF213	RNF213_P5154T_F	AATCAGACTGGCCTAGACGC	chr17:78363890+78364020
	RNF213_P5154T_R	CCCCATAGGTGTGCAAATCCA	
SAMD9	SAMD9_K1004E_F	TGAAGAAAAGCTATCACCTGAA	chr7:92732300-92732424
	SAMD9_K1004E_R	TGTGAGTAGGAGTGTGTGCA	
SETD2	SETD2_E1816Q_F	GAACACTTGCCATTCTACT	chr3:47125743-47125857
	SETD2_E1816Q_R	ACCCATCTCCTTCACTCAACG	
SMUG1	SMUG1_Q151R_F	TCAGAAGTGAGTGGTGCCC	chr12:54576180-54576293
	SMUG1_Q151R_R	AGCCAGGAAAAGCAGAGGG	
SYNE1	SYNE1_23089-1G>T_F	TCCTTGAGTGTGGTCTTCTC	chr6:152501399-152501493
	SYNE1_23089-1G>T_R	TTTACCTATTTGCTGCCGC	
	SYNE1_D4294N_F	CATTGGCATTGCAGGAGAGA	chr6:152652848-152652975
	SYNE1_D4294N_R	ACGTTGCTCTAAATGACTCGTC	
	SYNE1_G2211A_F	GAGAGTAAAGCCTGTCCATTTGG	chr6:152728184-152728296
	SYNE1_G2211A_R	GGTTATCCAGGTTGCTGATGT	
	SYNE1_K4050N_F	TGGTTGCTAACTTTTATCTCTGT	chr6:152658099-152658186
	SYNE1_K4050N_R	GATCTCTCCCAGCCCTGA	
TAF1	TAF1_R1202H_F	AACTCTTCTGCCACTGGACG	chrX:70617168+70617287
	TAF1_R1202H_R	GCGCACATAGGCATCAATGA	
TAF1L	TAF1L_E1749V_F	TGAGGAGGAGGATGGGAAAC	chr9:32630306-32630403
	TAF1L_E1749V_R	TGGCTTCAGGTTGTTGTACAGT	
THBS1	THBS1_A4D_F	ATCTCTGACCCTCGGCTCTT	chr15:39873994+39874132
	THBS1_A4D_R	AACTCACCTGGAATGCGGTT	
TP53	TP53_G266E_F	GGAGTAGATGGAGCCTGGTT	chr17:7577115-7577243
	TP53_G266E_R	AAACACGCACCTCAAAGCTG	
	TP53_L320*_F	CAACAACACCAGCTCCTCTC	chr17:7576790-7576919
	TP53_L320*_R	AACGGCATTGAGTGTTAGAC	
	TP53_M340Cfs_F	CCCTCCTCTGTTGCTGCA	chr17:7573966-7574052
	TP53_M340Cfs_R	TGGGCATCCTTGAGTTCCAA	
	TP53_R213*_F	TGGAAGGAAATTTGCGTGTGG	chr17:7578129-7578259
	TP53_R213*_R	CAACCACCCTTAACCCCTCC	
	TP53_R282W_F	GCTTTGAGGTGCGTGTGTTGT	chr17:7577003-7577132
	TP53_R282W_R	TGTCCTGCTTGCTTACCTCG	
	TP53_S166*_F	GTGCAGCTGTGGGTTGATTC	chr17:7578408-7578503
	TP53_S166*_R	CCTCACAACCTCCGTCATGT	
TRRAP	TRRAP_F1041Sfs*4_F	GTCATTAAGGACCTGCGGCC	chr7:98524902+98525030
	TRRAP_F1041Sfs*4_R	CAAAGAACCAATCCCGTGCC	

Apêndice 3 - Abordagens Metodológicas Utilizadas nas Amostras do Estudo

Quadro A3: Abordagens metodológicas empregadas nos casos de câncer de mama triplo-negativo.

ID	Análise germinativa (DNA leucócito)		Análise mutações somáticas (DNA tumor)		Biópsia líquida (DNA plasma)	
	Painel	Plataforma	Painel	Plataforma	Deep-amplicon-sequencing	Plataforma
Adamant01	Painel 94	NextSeq 500	Painel 409	Ion Proton	-	-
Adamant02	Painel 26	NextSeq 500	Painel 93/Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant03	Painel 26	NextSeq 500	Painel 93/Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant04	Painel 26	NextSeq 500	Painel 93/Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant05	Painel 26	NextSeq 500	Painel 93/Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant06	Painel 26	NextSeq 500	Painel 409*	Ion Proton	-	-
Adamant07	Painel 26	NextSeq 500	Painel 93/Painel 409	Ion Proton	-	-
Adamant08	Painel 26	NextSeq 500	-	-	-	-
Adamant09	Painel 26	NextSeq 500	Painel 93/Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant10	Painel 26	NextSeq 500	Painel 93/Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant11	Painel 26	NextSeq 500	Painel 93/Painel 409*	Ion Proton	-	-
Adamant12	Painel 26	NextSeq 500	Painel 93/Painel 409*	Ion Proton	-	-
Adamant13	Painel 26	NextSeq 500	Painel 409*	Ion Proton	-	-
Adamant14	Painel 26	NextSeq 500	Painel 409	Ion Proton	-	-
Adamant15	Painel 26	NextSeq 500	Painel 409*	Ion Proton	-	-
Adamant16	Painel 26	NextSeq 500	Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant17	Painel 26	NextSeq 500	Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant18	Painel 26	NextSeq 500	Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant19	Painel 26	NextSeq 500	Painel 409	Ion Proton	-	-
Adamant20	Painel 26	NextSeq 500	Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant21	Painel 26	NextSeq 500	Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant22	Painel 2	MiniSeq	Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant24	Painel 2	MiniSeq	-	-	-	-
Adamant25	Painel 94	NextSeq 500	-	-	-	-
Adamant26	Painel 94	NextSeq 500	-	-	-	-

Adamant27	Painel 94	NextSeq 500	Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant28	Painel 94	NextSeq 500	Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant29	Painel 94	NextSeq 500	Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant31	Painel 94	NextSeq 500	Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant32	Painel 94	NextSeq 500	Painel 409*	Ion Proton	-	-
Adamant33	Painel 94	NextSeq 500	Painel 409	Ion Proton	-	-
Adamant34	Painel 94	NextSeq 500	-	-	-	-
Adamant35	Painel 27	NextSeq 500	Painel 409	Ion Proton	Painel Tumoral Personalizado	Ion Proton
Adamant36	Mutação pontual	Ion Proton	-	-	-	-
Adamant38	Painel 27	NextSeq 500	-	-	-	-
Adamant39	Painel 27	NextSeq 500	-	-	-	-
Adamant40	Painel 27	NextSeq 500	-	-	-	-
Adamant41	Painel 27	NextSeq 500	-	-	-	-
Adamant42	Painel 27	NextSeq 500	-	-	-	-
Adamant43	Painel 27	NextSeq 500	-	-	-	-
Adamant44	Painel 27	NextSeq 500	-	-	-	-
Adamant45	Painel 27	NextSeq 500	-	-	-	-
Adamant46	Painel 27	NextSeq 500	-	-	-	-

Quadro A4 - Dados de sequenciamento gerados

Amostra	Análise germinativa				Análise somática			
	Painel	Leituras	Cobertura média	% 50x	Painel	Leituras	Cobertura média	% 100x
Adamant01	Painel 94	4.189.184	639,1	100%	Painel 409	25.329.251	1.486	93,35%
Adamant02	Painel 26	2.867.610		100%	Painel 409/Painel93	10680752/	643.5/ 290.3	78.15%/ 92.08%
Adamant03	Painel 26	3.209.982		100%	Painel 409/Painel93	13910438/ 13028272	901.2/ 3515	92.96%/ 99.95%
Adamant04	Painel 26	3.478.002		100%	Painel 409/Painel93	24791877/ 6270277	1495/ 1529	84.33%/ 90.97%
Adamant05	Painel 26	2.576.394		100%	Painel 409/Painel93	24791877/ 25648093	1759/ 1495	96.88%/ 90.81%
Adamant06	Painel 26	3.790.161		100%	Painel 409/Painel93	1656280/ 15429895	4.6/ 3565	0.88%/ 44.65%
Adamant07	Painel 26	2.048.460		100%	Painel 409/Painel93	29955242/ 16784311	1930/ 4409	94.59%/ 86.94%
Adamant08	Painel 26	2.875.327		100%	-	-	-	-
Adamant09	Painel 26	2.442.100		100%	Painel 409/Painel93	9650747/12082930	597.7/2988	92.16%/ 99.95%
Adamant10	Painel 26	2.035.527		100%	Painel 409/Painel93	12777893/10424175	801.1/2608	86.79%/ 99.93%
Adamant11	Painel 26	2.103.960		100%	Painel 409	809.689	42	10,5%
Adamant12	Painel 26	6.390.692		100%	Painel 409	29.673.915	1.914	96,62%
Adamant13	Painel 26	6.401.295		100%	Painel 409	9.276.721	567	86,89%
Adamant14	Painel 26	5.785.138		100%	Painel 409	9.468.479	575	86,79%
Adamant15	Painel 26	3.798.726		100%	Painel 409	20.620.118	1.359	91,43%
Adamant16	Painel 26	3.547.207		100%	Painel 409	36.636.077	2.138	97,02%
Adamant17	Painel 26	3.851.675		100%	Painel 409/Painel93	8501226/ 2117660	469.5/ 388.4	71.77%/13.93%
Adamant18	Painel 26	11.778.764		99,94%	Painel 409	10.133.941	595	89,80%
Adamant19	Painel 26	8.690.906		99,89%	Painel 409	19.576.041	1.263	97,35%
Adamant20	Painel 26	12.631.251		99,97%	Painel 409	18.942.624	1.243	93,06%
Adamant21	Painel 26	6.796.582		99,82%	Painel 409	32.064.318	2.089	97,16%

Adamant22	Painel 2	1.433.610	4991,7	99,97%		Painel 409	6.039.678	345	67,28%
Adamant24	Painel 2	1.544.686	5393,9	99,82%		-	-	-	-
Adamant25	Painel 94	4.556.386	709,6	98,36%		-	-	-	-
Adamant26	Painel 94	5.809.843	842,1	99,04%		-	-	-	-
Adamant27	Painel 94	4.127.329	736,7	98,61%		Painel 409	39.372.630	2.393	94,71%
Adamant28	Painel 94	5.019.825	897	98,61%		Painel 409	29.973.195	1.818	87,06%
Adamant29	Painel 94	5.080.811	725,3	99,53%		Painel 409	38.388.829	2.420	96,50%
Adamant31	Painel 94	3.946.320	545,8	99,08%		Painel 409	30.734.144	1.819	97,50%
Adamant32	Painel 94	3.027.333	390,4	98,90%		Painel 409	14.756.298	857	63,71%
Adamant33	Painel 94	4.130.750	648,9	98,89%		Painel 409	25.079.560	1.553	94,00%
Adamant34	Painel 94					-	-	-	-
Adamant35	Painel 27	8.147.379	409,4	96,08%		Painel 409	16.515.512	1.030	81,20%
Adamant36	Mutação pontual	-	81394	-		-	-	-	-
Adamant37	-	-	-	-		-	-	-	-
Adamant38	Painel 27	9.947.484	615,1	98,00%		-	-	-	-
Adamant39	Painel 27	9.333.896	441,7	97,15%		-	-	-	-
Adamant40	Painel 27	8.643.154	618,7	97,22%		-	-	-	-
Adamant41	Painel 27	11.035.843	622,4	98,12%		-	-	-	-
Adamant42	Painel 27	8.129.745	573,4	97,27%		-	-	-	-
Adamant43	Painel 27	9.573.509	546	97,55%		-	-	-	-
Adamant44	Painel 27	9.028.631	462,6	96,60%		-	-	-	-
Adamant45	Painel 27	8.629.624	552,3	97,34%		-	-	-	-
Adamant46	Painel 27	8.151.844	469,9	96,59%		-	-	-	-

Adamant28	coletado	coletado	em andamento	coletado	coletado	coletado	coletado	falha	falha
Adamant29	coletado	coletado	sem tumor residual	coletado	coletado	coletado	coletado	coletado	coletado
Adamant31	coletado	coletado	sem tumor residual	coletado	coletado	coletado	coletado	coletado	
Adamant32	coletado	coletado	sem tumor residual	coletado	falha	coletado	coletado	coletado	
Adamant33	coletado	coletado	em andamento	coletado	coletado	coletado	coletado	coletado	
Adamant34	coletado	sem material	sem tumor residual	coletado	coletado	coletado	coletado	coletado	
Adamant35	coletado	coletado	em andamento	coletado	coletado	coletado	coletado		
Adamant36	coletado	em andamento	sem tumor residual	coletado	falha	coletado	coletado		
Adamant37	coletado	em andamento	em andamento	coletado	falha				
Adamant38	coletado	em andamento	em andamento	coletado	falha				
Adamant39	coletado	em andamento	em andamento	coletado	coletado				
Adamant40	coletado	em andamento	em andamento	coletado	coletado				
Adamant41	coletado	em andamento	em andamento	coletado	coletado				
Adamant42	coletado	em andamento	em andamento	coletado	coletado				
Adamant43	coletado	em andamento	em andamento	coletado	coletado				
Adamant44	coletado	em andamento	em andamento	coletado	coletado				
Adamant45	coletado	em andamento	em andamento	coletado					
Adamant46	coletado	em andamento	em andamento	coletado					

Baseline= coleta antes do início do tratamento; M1-5 coletas de monitoramento: M1= coleta após 1º bloco de quimioterapia; M2= coleta após 2º bloco de quimioterapia. M3= coleta pós-cirurgia; M4= coleta 3 meses após cirurgia; M5= coleta 6 meses após cirurgia

Apêndice 5 - Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE aplicado as Pacientes Recrutadas no Estudo



**A.C. Camargo
Cancer Center**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PARTICIPANTE:

SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (---)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):

SEXO: M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (---)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **MEDICINA PERSONALIZADA APLICADA PARA O MONITORAMENTO TERAPÊUTICO DO PACIENTE ONCOLÓGICO**

2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Dra. Dirce Maria Carraro

3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:

CIPE:

- Dra. Giovana Tardin Torrezan
- Dra. Ludmilla T. Domingos Chimen
- Dra. Vilma Martins
- Dr. Tiago Goss dos Santos
- Dr. Kenneth John Gollob

Departamento Oncologia Clínica do A.C. Camargo Cancer Center

- Dr. Helano C. Freitas
- Dr. Vladimir C. Cordeiro de Lima
- Dra. Solange Sanchez
- Dra. Rachel Riechelmann
- Dra. Maria Nirvana da Cruz Formiga
- Dr. Celso Abdon Lopes de Mello

Departamento de Cirurgia Oncológica

- Dra. Fabiana Baroni Alves Makdissi

Rúbrica do
participante:

Rúbrica do
responsável pela aplicação do termo:

- Dr. Stenio Cassio Zequi
- Dr. Walter Henriques da Costa
- Dr. Samuel Aguiar Junior
- Dr. Luiz Paulo Kowalski
- Dr. Jefferson Gross

- Equipe de Enfermeiras de Pesquisa

4. DURAÇÃO DA PESQUISA: 36 meses

III - INFORMAÇÕES A (O) PARTICIPANTE

O (A) senhor (a) está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa ("Medicina Personalizada Aplicada para o Monitoramento Terapêutico do Paciente Oncológico"), que será realizada no A.C. Camargo Cancer Center.

IV – OBJETIVOS DA PESQUISA

O projeto pretende caracterizar as alterações exclusivas do material genético do tumor utilizando painéis de genes para análise desse material (por método de sequenciamento) e monitorar, usando como modelo as alterações exclusivas encontradas no tumor, a eficácia do tratamento pela avaliação em plasma e em determinados casos, em urina. Além disso, pretendemos investigar outros componentes de seu sangue como célula tumoral circulante (CTC), vesículas extracelulares (VE), células do sistema imune e marcadores imunológicos para estudar os mecanismos envolvidos na eficácia e resistência ao tratamento.

V. JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA

Várias evidências científicas têm demonstrado que tumores sólidos liberam material genético e outros componentes, como células tumorais circulantes e vesículas extracelulares, na circulação sanguínea do paciente. Há atualmente vários grupos de pesquisa padronizando os procedimentos para detecção destes marcadores na corrente sanguínea do paciente. No entanto, apesar de ter tido grandes avanços, esses procedimentos ainda apresentam limitações para sua utilização na rotina clínica.

Assim, esse projeto tem o objetivo de investigar, por técnicas de sequenciamento, o material genético de parte de seu tumor, que será armazenado no nosso Biobanco, com sua devida autorização, para determinar as alterações específicas no DNA. Com esse procedimento, nós pretendemos desenvolver uma ferramenta para identificar no seu plasma e/ou urina a presença de DNA da célula tumoral. Além disso, para um subgrupo de pacientes, também iremos analisar outros componentes da biópsia líquida presentes no plasma, bem como investigar, em amostras de sangue periférico, as células do sistema imune e moléculas relacionadas. Como se trata de um projeto científico, sua aplicação na rotina não será imediata, uma vez que é um processo experimental.

Uma vez superado todos os desafios decorrentes desse projeto e estabelecido com segurança este procedimento, sua aplicação poderá ser bastante ampla na área da oncologia, tanto na detecção precoce de recidiva do tumor como para monitorar resposta à quimioterapia.

VI – DESENHO DA PESQUISA

O estudo a ser realizado será experimental, exploratório, longitudinal, prospectivo e envolverá também aspectos de pesquisa básica. Os tumores a serem avaliados incluem: carcinoma de pulmão não

Rúbrica do
participante:

Rúbrica do
responsável pela aplicação do termo:



pequenas células (CPNPC), adenocarcinoma de reto e colon, câncer de mama triplo negativo (CMTN), carcinomas renais (CR), melanoma e carcinomas de cabeça e pescoço (cavidade oral).

VII - DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS

Se concordar em participar deste estudo, você será submetido a coletas de sangue (aproximadamente 8 mL), antes do início do tratamento (cirurgia ou quimioterapia/radioterapia), e em diferentes momentos, sendo que serão feitas em média 6 coletas ao longo da pesquisa. Caso haja necessidade, dependendo do tratamento e de seu consentimento, mais coletas de sangue serão realizadas.

Você não precisará vir ao hospital apenas para a coleta desta pesquisa. Contataremos você nas datas que você tiver exames e na maioria das vezes, aproveitaremos as punções venosas (coleta de sangue) dos exames no laboratório de rotina. Caso não tenha exames a ser realizados, contataremos você nos dias que tiver consulta ou outros procedimentos no hospital. Toda identificação do seu material será feita por códigos para preservar sua confidencialidade.

As amostras coletadas serão processadas e armazenadas pelo Banco de Macromoléculas do Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center, e o excedente não utilizado por este projeto de pesquisa poderá ser utilizado em outros projetos no futuro, mediante seu consentimento e após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição.

VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO

Nenhum dano imediato ou tardio, que comprometa a sua saúde, poderá ser decorrente deste estudo, uma vez que você não será submetido a nenhum procedimento adicional aqueles realizados durante o seu tratamento neste hospital.

No momento das coletas de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados, o que diminui as chances de complicações.

IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Não haverá benefícios de qualquer espécie para os voluntários, apenas a importância de contribuir para uma pesquisa científica cujos dados obtidos poderão trazer benefícios para pessoas com câncer no futuro. A recusa em participar, não acarretará prejuízo em seu tratamento.

X - CONFIDENCIALIDADE

A confidencialidade de suas informações será mantida e sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica/pesquisa e do Comitê de Ética em Pesquisa terão acesso aos registros. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

Para se fazer pesquisas mais relevantes, é importante que os pesquisadores compartilhem informações obtidas de estudos com amostras humanas. Eles fazem isso depositando os resultados em um ou mais bancos de dados científicos, onde são armazenados junto com informações de outros estudos. Os pesquisadores podem então estudar as informações combinadas para aprender ainda mais

Rúbrica do
participante:

Rúbrica do
responsável pela aplicação do termo:



sobre saúde e doenças. A deposição dos dados sempre é feita de forma anonimizada e seu nome e outras informações que poderiam identificá-lo diretamente nunca serão colocados em um banco de dados científicos. Se você concordar em participar do estudo, algumas de suas informações genéticas e de saúde podem ser colocadas em um ou mais bancos de dados científicos e publicadas em revistas científicas. Existem muitos tipos diferentes de bancos de dados científicos, que podem ser mantidos por instituições nacionais ou internacionais. Apesar de ser extremamente pequeno, há um risco de você poder ser identificado, uma vez que a sua composição genética é única. Por isso, o acesso de pesquisadores para estudarem as informações presentes nos bancos de dados é realizado de forma altamente controlada, através de uma autorização de acesso pelos responsáveis do banco de dados e da concordância com os termos de uso de cada banco, garantindo o compromisso de proteger sua privacidade e manter suas informações confidenciais.

Os pesquisadores comprometem-se a manter a confidencialidade dos dados do estudo e do paciente, porém há um risco mínimo de perda desta confidencialidade.

XI – ACHADOS INCIDENTAIS

A pesquisa da qual você irá participar pode identificar informações genéticas que não estavam sendo procuradas, mas que podem ter implicações na sua saúde e/ou na saúde de membros da sua família. Você pode escolher ser ou não ser informado sobre estes resultados por seu médico ou outro médico especialista no assunto. Para isso, assinale apenas uma das alternativas abaixo:

- Quero ser informado
 Não quero ser informado.

XII - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA

Qualquer dano resultante da sua participação no estudo será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e cuidados a que você tem direito. Ao assinar este formulário de consentimento você não está abrindo mão de qualquer um dos seus direitos legais.

XIII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Os pesquisadores e médicos se comprometem a dar informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. **TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS, REAÇÕES ADVERSAS OU QUALQUER DÚVIDA SOBRE O ESTUDO:** Dra. Dirce Maria Carraro – pesquisadora (011 2189-5023), Vilma Regina Martins – pesquisadora (011 2189 5000 – ramal 2979), Ludmilla Thomé Domingos Chinen (011 2189 500 – ramal 2936).

XIV. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

As amostras coletadas serão processadas pelo Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center. O excedente, não utilizado por este projeto de pesquisa, poderá ser descartado ou, se autorizado pelo participante, ser armazenado e utilizado em outros projetos, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição, e quando necessário, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Dependendo da escolha do participante, poderá ser ou não necessária a assinatura de novo TCLE. Para isso, pedimos que o (a) senhor (a) escolha uma das seguintes opções quanto ao armazenamento de sua amostra biológica:

Rúbrica do
participante:

Rúbrica do
responsável pela aplicação do termo:

1. () Autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa.

2. () Não autorizo o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa. Desta forma, compreendo que o excedente será inutilizado pelo Biobanco da instituição.

Se você escolheu a resposta do item 1, favor assinalar uma das seguintes opções:

() Quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa realizada no A.C. Camargo Cancer Center.

() Não quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa no A.C. Camargo Cancer Center.

Portanto, concordo que este TCLE, uma vez assinado, valerá também para os demais protocolos de pesquisa.

Em casos de óbito ou condições incapacitantes, o (a) senhor (a) tem a possibilidade de ceder os direitos sobre sua amostra biológica armazenada aos seus sucessores ou outras pessoas de sua confiança. Para isso, pedimos que expresse a sua vontade com base nas opções abaixo:

() Cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Favor indicar ao menos 1 (um) nome de pessoa autorizada:

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

Nome: _____

Grau de Parentesco: _____

Telefone: () _____

() Não cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Em qualquer ocasião e a qualquer tempo, você terá o direito de acesso às informações e resultados obtidos com a utilização de seu material biológico armazenado, recebendo orientações quanto às suas implicações, incluindo aconselhamento genético quando necessário.

Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da instituição, em casos onde: a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa por em risco a segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável.

XV. QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dra. Dirce Maria Carraro

Laboratório de Genética e Biologia Molecular do A.C. Camargo Cancer Center - São Paulo.

Telefones para contato: (11) 2189-5000 ramais 5023

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo.

Rúbrica do
participante:

Rúbrica do
responsável pela aplicação do termo:

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center pelo telefone (11) 2189-5000, ramal 5020 de segunda-feira a quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas.

Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O (a) senhor (a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.

Eu,

declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante ou responsável legal

_____/_____/_____
Data

Assinatura do pesquisador responsável/ responsável
pela aplicação do termo de consentimento

_____/_____/_____

Rúbrica do
participante:

Fevereiro/2019 e Versão III

Rúbrica do
responsável pela aplicação do termo:

Página 6 de 6