

**CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS GENES  
CANDIDATOS À PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER  
DE MAMA HEREDITÁRIO**

**FERNANDA GABRIELLA DOS SANTOS  
RAMOS DE ALMEIDA**

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

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Dra. Dirce Maria Carraro  
Co-Orientadora: Dra. Maria Isabel Alves de  
Souza Waddington Achatz**

**São Paulo  
2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Almeida, Fernanda Gabriella dos Santos Ramos de  
**Caracterização de novos genes candidatos à predisposição  
ao câncer de mama hereditário** / Fernanda Gabriella dos Santos  
Ramos de Almeida – São Paulo, 2016.  
128p.  
Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.  
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:  
Oncologia.  
Orientadora: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. NEOPLASIAS DA MAMA/genética. 2. SÍNDROME  
HEREDITÁRIA DE CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO/genética. 3.  
HEREDITARIEDADE. 4. GENES. 5. MUTAÇÃO EM LINHAGEM  
GERMINATIVA.

*“Bem-aventurado o homem que acha sabedoria,  
e o homem que adquire conhecimento”.*

Provérbios 3:13

## DEDICATÓRIA

Dedico a realização deste sonho profissional, materializado em forma de trabalho, às minhas tias Zilda (in memoriam), Iraci (in memoriam), Marli e Márcia e à minha mãe, Marta, cujo enfrentamento ao câncer de mama e, conseqüentemente, a estreita vivência da nossa família com essa realidade, me impulsionaram a buscar uma melhor compreensão desta neoplasia, a fim de contribuir, de alguma forma, no tratamento e acompanhamento destes casos.

De maneira não menos importante, dedico este trabalho às pacientes e seus respectivos familiares que, tendo também se deparado e convivido com essa mesma realidade, se dispuseram a participar do nosso estudo, viabilizando a realização deste.

## **AGRADECIMENTOS**

À DEUS, por ser a razão da minha vida, meu socorro, meu refúgio, meu sustento em toda e qualquer circunstância, e por me capacitar ao longo desta empreitada.

À minha orientadora Dra. Dirce Maria Carraro, por todos os valiosos ensinamentos, pela confiança em mim depositada, por todo empenho, incentivo, apoio e, principalmente, pela imensa oportunidade concedida, permitindo que eu subisse um importante degrau em busca da concretização de um sonho cultivado ainda durante a infância.

À minha co-orientadora, Dra. Maria Isabel Alves de Souza Waddington Achatz, pelo suporte, auxílio e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Elisa Napolitano e Ferreira, por me acompanhar durante esses anos, sobretudo em momentos cruciais, compartilhando seu profundo conhecimento, sempre com muito empenho, paciência e dedicação.

À Dra. Cláudia Alessandra Andrade de Paula, cuja colaboração foi fundamental desde o início deste projeto, pelo auxílio, paciência, atenção, compreensão, persistência e confiança.

Aos colegas do laboratório, Ana, Anna, Dai, Dri, Bruna, Paulo e Vanina importantes, cada um à sua maneira, no desenvolvimento do trabalho, por terem me acolhido tão bem e me acompanhado durante esses anos, tornando meu dia-a-dia e rotina muito mais agradáveis. Em especial, ao Rafa por estar sempre disposto a esclarecer minhas dúvidas e me auxiliar no que fosse preciso.

À Vanessa Pereira Dantas de Souza (Van) por sua personalidade inconfundível e cativante, que traz leveza, descontração e alegria ao ambiente do laboratório, e por ter me ajudado em tantos momentos que precisei. Às meninas Bianca, Jennice e Patrícia que, da mesma forma, me ajudaram muito, de diversas formas.

Ao grupo de Bioinformática, especialmente ao Dr. Rodrigo Ramalho e ao Renan Valieris, por toda contribuição e assistência.

À equipe do Biobanco, Ana, Elo e Lou, essenciais, desde o início, em várias etapas do trabalho e por todo carinho.

À equipe do Diagnóstico, Fer, Julia, Maris e Raquel que contribuíram de forma valiosa para a concretização deste trabalho, sempre muito atenciosas quando recorri a elas.

À equipe do Departamento de Oncogenética, em especial às enfermeiras Amanda e Juliana, pela dedicação e pelo inestimável auxílio na coleta de dados e recrutamento dos pacientes e familiares.

Ao Departamento de Pós-Graduação, especialmente à Ana Maria, Luciana e Vanuza, por todo suporte e dedicação.

Ao CIPE e à Biblioteca pela estrutura, suporte e recursos dispensados para a realização deste trabalho.

À CAPES e à FAPESP pelo suporte financeiro.

Aos meus pais, Rubem e Marta, por serem o alicerce de toda minha educação e instrução, embasados nos verdadeiros princípios da vida, e por sempre acompanharem e me apoiarem no decorrer da minha formação.

Ao meu amado esposo, Lucas, por ser uma bênção na minha vida, por me fazer feliz, pelo carinho, companheirismo, cuidado, paciência, respeito, encorajamento e, principalmente, pelo amor.

À minha sogra, Rosângela, que me acolheu e abriu as portas da sua casa no período de mudança, para que eu pudesse me adaptar à nova rotina e me deu todo apoio possível.

Aos meus irmãos e aos demais familiares, por todo incentivo, carinho, cumplicidade, amparo e cuidado.

À Bia, Flávia, Isa, Kivvi, Mel, ao Felipe e ao Fidalgo que ao longo deste percurso se tornaram mais do que colegas. Por estes anos de amizade, por compartilharem comigo experiências, sonhos, expectativas, preocupações, risadas, manias, loucuras e por sempre torcerem por mim.

## RESUMO

Almeida FGSR. **Caracterização de novos genes candidatos à predisposição ao câncer de mama hereditário**. São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer de mama de caráter hereditário corresponde a aproximadamente 5 – 10% do total de casos de câncer de mama. A síndrome HBOC (do inglês, hereditary breast and ovarian cancer) é a síndrome hereditária de câncer de mama mais importante e está relacionada a uma maior predisposição para o desenvolvimento de câncer de mama e ovário em mulheres. Os principais genes associados com a síndrome que apresentam mutações patogênicas germinativas são o *BRCA1* e *BRCA2*. Mutações patogênicas em outros genes como *CHEK2* e *TP53*, também levam ao aumento de risco de câncer de mama. Nosso grupo tem trabalhado na caracterização de mutação patogênica nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes com critérios clínicos para predisposição genética ao câncer de mama e ovário. Em dois estudos anteriores, grupos de mulheres acometidas com câncer de mama em idade precoce (CARRARO et al. 2013) e com critérios clínicos para HBOC (SILVA et al. 2014) foram rastreadas para identificação de mutação patogênica nos principais genes, incluindo *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* e a mutação 1100delC no gene *CHEK2*. Nestes estudos, os índices de detecção de mutação foram de 22,2% e 26%, respectivamente, resultando em um elevado número de mulheres não portadoras de variantes genéticas sabidamente associadas com a predisposição ao câncer de mama. Neste contexto, fica evidente a necessidade de se identificar novos genes de susceptibilidade, visto que estas pacientes negativas para mutação patogênica apresentam história familiar positiva para desenvolvimento de câncer, sugerindo a existência de um fator genético importante que induz ao aumento do risco de desenvolver câncer na família. Desta forma, o objetivo do presente estudo é identificar novos genes candidatos à predisposição ao câncer de mama em famílias com critérios clínicos para câncer hereditário e que são negativas para mutação patogênica nos principais genes associados. Para isso, em um

trabalho prévio, 16 pacientes não aparentadas e uma irmã diagnosticadas com câncer de mama em idade jovem, com história familiar positiva para câncer e negativas para as mutações patogênicas nos genes associados, foram submetidas ao sequenciamento do exoma completo para ampla varredura de variantes genéticas de ponto nos genes humanos codificadores de proteína. A partir dos resultados gerados, a fim de identificar variantes genéticas mais promissoras em novos genes, aplicamos critérios estridentes para seleção e validação das variantes detectadas. Assim, selecionamos 642 variantes, das quais 380 foram avaliadas por sequenciamento alvo (*targeted sequencing*) para validação técnica nas mesmas pacientes através de um painel customizado resultando em 338 variantes validadas (88,95%). Destas, duas variantes (ambas do tipo INDEL) pertenciam aos genes *BARD1* e *ATM*, já associados com o aumento de risco de desenvolvimento de câncer de mama hereditário. Para filtrar polimorfismos frequentes na população foram avaliadas 25 amostras de mulheres sem câncer, utilizadas como controle, resultando em 227 variantes em 220 genes, ausentes nos controles. Posteriormente, para análise de co-segregação de variantes com maior potencial de estarem associados com aumento de risco ao câncer de mama, foram selecionadas 3 famílias distintas, uma que apresentava a mutação do tipo INDEL no gene *ATM*, para confirmação da mesma em um membro da família e duas que apresentaram um total de 25 variantes genéticas pertencentes a genes ainda não diretamente associados com a predisposição ao câncer de mama hereditário. Desta análise, 11 genes distintos foram selecionados como fortes candidatos a estarem associados ao risco aumentado de desenvolvimento de câncer de mama. Destes genes, a saber, *ATRX*, *C9orf3*, *FANCC*, *HIF1A*, *KRTAP29-1*, *LPAR6*, *TET2*, *ZNF574*, *PTPRD*, *ROS1* e *SLC22A16*, os três últimos, envolvidos no processo tumorigênico de outros tumores, são os mais promissores da nossa lista de genes.



## SUMMARY

Almeida FGSR. [**Searching for new genes associated to hereditary breast cancer using whole exome sequencing**]. São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Hereditary breast cancer corresponds to approximately 5-10% of all breast cancer cases. The HBOC syndrome (hereditary breast and ovarian cancer) is the most important hereditary breast cancer syndrome and is related to a greater predisposition of development of breast and ovarian cancer in women. The key genes that presents pathogenic germline mutations associated with the syndrome are *BRCA1* and *BRCA2*. Pathogenic mutations in other genes as *CHEK2* and *TP53* also lead to higher breast cancer risk. Our group has been working on the characterization of pathogenic mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes in patients with clinical criteria for genetic predisposition to breast and ovarian cancer. In two previous studies, groups of affected women with breast cancer at an early age (CARRARO et al. 2013) and with clinical criteria for HBOC (SILVA et al. 2014) were screened for pathogenic mutation in key genes, including *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* and for 1100delC *CHEK2* mutation. In these studies, the mutation detection rates were 22.2% and 26%, respectively, resulting in a large number of women who are not carriers of known genetic variants associated with a breast cancer predisposition. In this context, the need to identify new susceptibility genes is evident, since these negative patients for pathogenic mutation have a family history of cancer development, suggesting the existence of an important genetic factor that leads to an increased risk of developing cancer in the family. Thus, the aim of this study is to identify new candidate genes to breast cancer predisposition in families with clinical criteria for hereditary cancer and which are negative for pathogenic mutations in the key genes. For this, in a previous study, 16 unrelated young patients and an affected sister diagnosed with breast cancer, with family

history of cancer and negative for pathogenic mutations in the associated genes were evaluated by the complete exome sequencing for wide scan of genetic point variants in human protein-coding genes. From these results, we applied stringent criteria for selection and validation of the detected variants, in order to identify the most promising genetic variants in new key genes. Thus, we selected 642 variants, of which 380 were evaluated for technical validation by targeted sequencing in the same patients through a custom panel resulting in 338 validated variants (88,95%). Of these, two were INDEL variants in the *BARD1* and *ATM* genes, which have already been associated with an increased risk of developing hereditary breast cancer. Twenty-five samples of women without cancer were evaluated and used as control for filtering common polymorphisms in the population, resulting in 227 variants in 220 genes, that were absent in the controls. Then, for co-segregation analysis of the variants with greater potential to be associated with an increased risk of breast cancer, we selected three different families, one with the INDEL mutation in *ATM*, to confirm it on an affected member of the family and two other families with 25 genetic variants in genes not yet directly associated with hereditary breast cancer predisposition. From this analysis, 11 distinct genes were selected as strong candidates to be associated with increased risk of breast cancer development, such as *ATRX*, *C9orf3*, *FANCC*, *HIF1A*, *KRTAP29-1*, *LPAR6*, *TET2*, *ZNF574*, *PTPRD*, *ROS1* and *SLC22A16*, the last three, which are involved in tumorigenic process, are the most promising of our genes list.

## LISTA DE FIGURAS

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Figura 1</b> | Estimativa do número de casos novos, em mulheres, Brasil, 2016 de todas as neoplasias, exceto pele não melanoma.....   | 2  |
| <b>Figura 2</b> | Risco de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres na população em geral e em mulheres portadoras de mutação nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> ..... | 9  |
| <b>Figura 3</b> | Fluxograma dos resultados de sequenciamento e chamada, seleção e validação das variantes genéticas.....  | 51 |
| <b>Figura 4</b> | Validação por Sanger da alteração c.2215dupT, no gene <i>BARD1</i> , identificada na paciente SUBJ1007.....  | 53 |
| <b>Figura 5</b> | Validação por Sanger da alteração c.7000_7003delTACA, no gene ATM, identificada na paciente SM001.049.....   | 54 |
| <b>Figura 6</b> | Heredograma pertencente à família da paciente MJ2001.....  | 65 |
| <b>Figura 7</b> | Heredograma pertencente à família da paciente SM001.049...   | 67 |
| <b>Figura 8</b> | Heredograma pertencente à família das pacientes MJ2007 e MJ2012.....   | 68 |

## LISTA DE QUADROS

|                 |  |    |
|-----------------|--|----|
| <b>Quadro 1</b> | Dados clínicos e histopatológico das pacientes incluídas no estudo.....        | 37 |
| <b>Quadro 2</b> | Análise de co-segregação da família da paciente MJ2001.....                    | 66 |
| <b>Quadro 3</b> | Análise de co-segregação da família da paciente SM001.049.....                 | 67 |
| <b>Quadro 4</b> | Análise de co-segregação da família das pacientes MJ2007/MJ2012.....           | 69 |
| <b>Quadro 5</b> | Genes da análise de co-segregação presentes nas demais famílias do estudo..... | 71 |
| <b>Quadro 6</b> | Genes resultantes do estudo.....   | 72 |

## LISTA DE TABELAS

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Tabela 1</b> | Número de variantes selecionadas e validadas por paciente.....                                      | 57 |
| <b>Tabela 2</b> | Genes cujas variantes foram validadas por paciente, de acordo com os critérios de seleção.....      | 58 |
| <b>Tabela 3</b> | Resultados gerais do sequenciamento das amostras controle....                                       | 62 |
| <b>Tabela 4</b> | Resultados gerais da filtragem das amostras controles sobre o total de variantes das pacientes..... | 62 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b><i>ATM</i></b>       | Ataxia Telangiectasia Mutated                          |
| <b><i>ATRX</i></b>      | Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked |
| <b><i>BARD1</i></b>     | <i>BRCA1</i> - associated RING domain 1                |
| <b>BIC</b>              | Breast Cancer Information Core database                |
| <b><i>BRCA1</i></b>     | Breast Cancer 1  |
| <b><i>BRCA2</i></b>     | Breast Cancer 2  |
| <b><i>C9orf3</i></b>    | Chromosome 9 Open Reading Frame 3                      |
| <b>CEP</b>              | Comitê de Ética em Pesquisa                            |
| <b>CGH</b>              | Comparative Genomic Hybridization                      |
| <b><i>CHEK2</i></b>     | Checkpoint Kinase 2                                    |
| <b>CNV</b>              | Copy Number Variation                                  |
| <b>DNA</b>              | Deoxyribonucleic Acid                                  |
| <b>EBI</b>              | European Bioinformatics Institute                      |
| <b><i>FANCC</i></b>     | Fanconi Anemia Complementation Group C                 |
| <b>GATK</b>             | Genome Analysis Toolkit                                |
| <b>HGNC</b>             | HUGO Gene Nomenclature Committee                       |
| <b>HBOC</b>             | Hereditary Breast and Ovarian Cancer                   |
| <b><i>HIF1A</i></b>     | Hypoxia Inducible Factor 1 Alpha subunit               |
| <b>IARC</b>             | International Agency for Cancer Research               |
| <b>INCA</b>             | Instituto Nacional do Câncer                           |
| <b>INDEL</b>            | Alteração de Inserção ou Deleção                       |
| <b><i>KRTAP29-1</i></b> | Keratin Associated Protein 29-1                        |
| <b>LOVD</b>             | Leiden Open Variation Database                         |
| <b><i>LPAR6</i></b>     | Lysophosphatidic Acid Receptor 6                       |
| <b>MLPA</b>             | Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification       |
| <b>NCCN</b>             | National Comprehensive Cancer Network                  |
| <b>NGS</b>              | Next Generation Sequencing                             |
| <b>NYUMC</b>            | New York University Medical Centre                     |
| <b>OCCR</b>             | Ovarian Cancer Cluster Region                          |

|                        |   |
|------------------------|---|
| <b>OICR</b>            | Ontario Institute for Cancer Research         |
| <b><i>PALB2</i></b>    | Partner and Localizer of <i>BRCA2</i>         |
| <b>PCR</b>             | Polymerase Chain Reaction                     |
| <b>POP</b>             | Procedimento Operacional Padrão               |
| <b>PROVEAN</b>         | Protein Variation Effect Analyzer             |
| <b><i>PTEN</i></b>     | Phosphatase and Tensin Homolog                |
| <b><i>PTPRD</i></b>    | Protein Tyrosine Phosphatase Receptor type D  |
| <b>QDF</b>             | Quebra de Dupla Fita                          |
| <b>RE</b>              | Receptor de Estrógeno                         |
| <b>RH</b>              | Recombinação Homóloga                         |
| <b><i>ROS1</i></b>     | ROS Proto-Oncogene 1 Receptor Tyrosine Kinase |
| <b>RP</b>              | Receptor de Progesterona                      |
| <b>SIFT</b>            | Sorts Intolerant From Tolerant                |
| <b><i>SLC22A16</i></b> | Solute Carrier Family 22 Member 16            |
| <b>SNP</b>             | Single Nucleotide Polymorphism                |
| <b>SNV</b>             | Single Nucleotide Variant                     |
| <b>TCLE</b>            | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido    |
| <b><i>TET2</i></b>     | Tet Methylcytosine Dioxygenase 2              |
| <b>TN</b>              | Triplo Negativo                               |
| <b><i>TP53</i></b>     | Tumor Protein p53                             |
| <b>WES</b>             | Whole Exome Sequencing                        |
| <b><i>ZNF574</i></b>   | Zinc Finger Protein 574                       |

# ÍNDICE

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1      | Câncer de mama .....   | 1         |
| 1.1.1    | Epidemiologia .....  | 1         |
| 1.1.2    | Fatores de Risco .....   | 2         |
| 1.1.3    | Bases Moleculares de Genéticas .....   | 4         |
| 1.2      | Câncer de Mama Hereditário.....  | 7         |
| 1.3      | Genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> e a Via de Recombinação Homóloga .....                       | 14        |
| 1.3.1    | <i>BRCA1</i> .....   | 14        |
| 1.3.2    | <i>BRCA2</i> .....   | 18        |
| 1.3.3    | Outros Genes .....   | 20        |
| 1.4      | Ausência de Mutações Patogênicas nos Principais Genes Associados em Famílias com HBOC .....    | 26        |
| 1.5      | Identificação de novos genes associados ao aumento de risco .....                              | 28        |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS .....</b>   | <b>31</b> |
| 2.1      | Objetivo Geral.....  | 31        |
| 2.2      | Objetivos Específicos .....  | 31        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>   | <b>33</b> |
| 3.1      | Aspectos Éticos .....  | 33        |
| 3.2      | Delineamento Experimental.....   | 33        |
| 3.3      | Casuística e Critérios de Inclusão .....   | 35        |
| 3.4      | Seleção das Variantes Promissoras a Partir dos Dados de Sequenciamento do Exoma Completo ..... | 37        |
| 3.5      | Validação Técnica .....  | 42        |
| 3.5.1    | Por Sequenciamento Capilar.....  | 42        |
| 3.5.2    | Por Sequenciamento de Próxima Geração ( <i>next generation sequencing</i> -NGS) .....          | 44        |
| 3.6      | Pacientes do Grupo Controle .....  | 46        |



|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 3.7      | Coleta de Sangue ou Saliva e Extração do DNA.....                    | 47        |
| 3.8      | Análise de Co-Segregação.....  | 48        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>50</b> |
| 4.1      | Análise do Sequenciamento do Exoma e Seleção das Variantes .....     | 50        |
| 4.2      | Seleção de variantes por pacientes.....                              | 53        |
| 4.3      | Confecção do painel de validação.....                                | 55        |
| 4.4      | Análise amostras controle .....                                      | 61        |
| 4.5      | Análise de co-segregação .....                                       | 63        |
| 4.5.1    | Família MJ2001 .....   | 64        |
| 4.5.2    | Família SM001.049 .....  | 66        |
| 4.5.3    | Família MJ2007/MJ2012 .....  | 67        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO .....</b>   | <b>74</b> |
| 5.1      | Identificação de novos genes .....                                   | 74        |
| 5.2      | Genes mais promissores identificados na análise de co-segregação ... | 78        |
| 5.3      | Técnicas de sequenciamento.....                                      | 91        |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO .....</b>   | <b>94</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>                              | <b>95</b> |

## **ANEXOS**

- Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP
- Anexo 2** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido destinado às pacientes participantes
- Anexo 3** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido destinado aos familiares participantes
- Anexo 4** Lista de genes associados ao risco de câncer de mama
- Anexo 5** Lista de genes frequentemente mutados em tumores
- Anexo 6** 338 variantes validadas totais, agrupadas por paciente

- Anexo 7** Variantes resultantes pós análise dos controles normais e verificação nos programas de predição de patogenicidade
- Anexo 8** Referências utilizadas para cada gene cuja variante foi validada nos respectivos pacientes

# **1 INTRODUÇÃO**

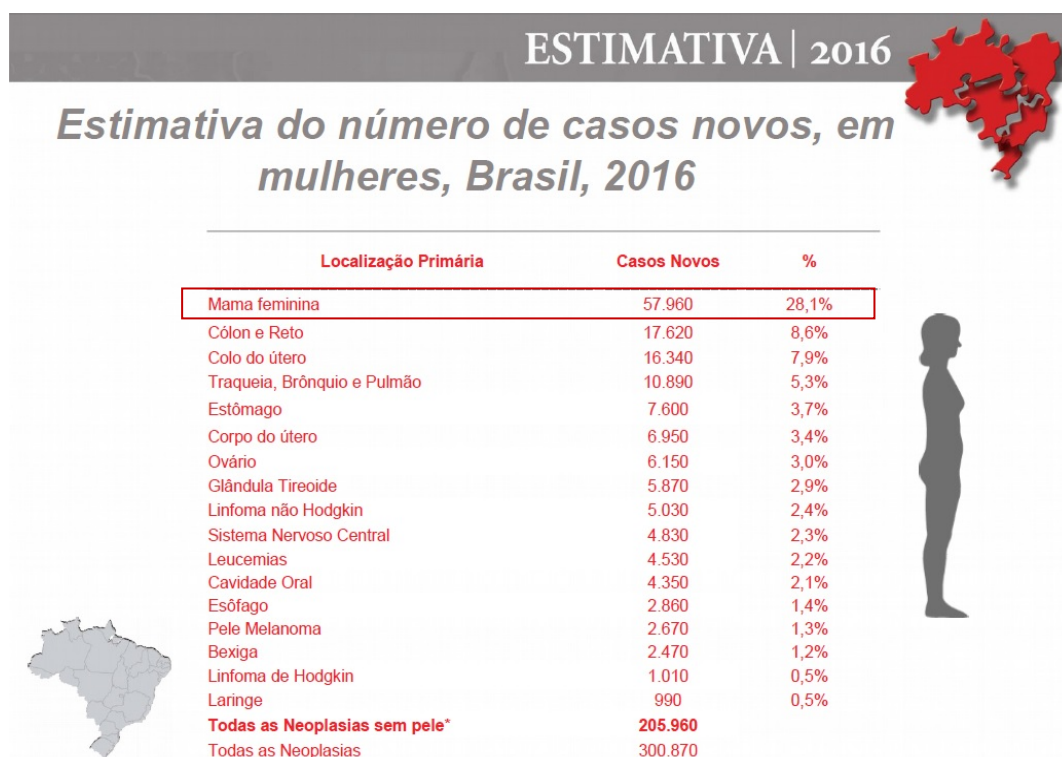
## **1.1 CÂNCER DE MAMA**

### **1.1.1 Epidemiologia**

O câncer de mama apresenta o maior número de casos entre mulheres no mundo e representa cerca de 20% de todos os casos de câncer. No Brasil, é o mais prevalente (exceto pele não melanoma), correspondendo a praticamente 30% dos tumores detectados em mulheres, apresentando, também, o maior índice de mortalidade no país, em todas as faixas etárias (URBAN et al. 2014; Ministério da Saúde 2016; SIEGEL et al. 2016). Estimativas realizadas pelo Instituto Nacional do Câncer - INCA para o ano de 2016 indicam uma ocorrência de 57.960 novos casos de câncer de mama no país (Ministério da Saúde 2016).

Entretanto, apesar da alta incidência, estudos indicam, pela taxa de sobrevida média no primeiro ano pós-diagnóstico e no decorrer de cinco anos, que esta neoplasia apresenta um bom prognóstico (PARKIN 2001; Ministério da Saúde 2016). Nos países da América do Sul, particularmente no Brasil, essa taxa de sobrevida no decorrer de cinco anos tem mudado, de 78% para 87%, enquanto nos países desenvolvidos se aproxima de 90%, o que também representa um discreto aumento (HOWLADER et al. 2015; Ministério da Saúde 2016). Moderadamente raro até os 35 anos, a incidência do câncer de mama cresce, de forma progressiva e de acordo

com a idade, tanto em países subdesenvolvidos quanto em desenvolvidos. Em países subdesenvolvidos esta neoplasia é a principal causa de morte por câncer, enquanto nos países desenvolvidos o câncer de mama é a segunda principal causa de morte, atrás apenas do câncer de pulmão (URBAN et al. 2014; Ministério da Saúde 2016; SIEGEL et al. 2016).



**Fonte:** Ministério da Saúde (2016).

**Figura 1** - Estimativa do número de casos novos, em mulheres, Brasil, 2016 de todas as neoplasias, exceto pele não melanoma.

### 1.1.2 Fatores de Risco

Nos últimos anos, a incidência do câncer de mama tem crescido no mundo todo, sobretudo em função do estilo de vida moderno nas sociedades atuais. Assim como nos demais tumores malignos, o câncer de mama possui fatores de risco gerais e mais específicos, entre os quais estão a

alimentação, sedentarismo, ingestão de álcool, menarca em idade precoce, menopausa tardia, taxa hormonal, densidade aumentada da mama, idade à primeira gestação, ausência de amamentação, ausência de gestação (nuliparidade) durante a vida, uso de contraceptivos a base de hormônios e/ou reposição hormonal pós-menopausa, exposição a substâncias radioativas, químicas ou poluentes, idade ao diagnóstico, além do fator hereditário (MCPHERSON et al. 2000; COLDITZ et al. 2006; MA et al. 2006; IYEYASU 2013; URBAN et al. 2014).

No caso dos hormônios femininos, a exposição tanto aos estrógenos endógenos, quanto aos estrógenos e progesterona exógenos, é um fator determinante para o risco de desenvolvimento do câncer de mama, somada as constantes variações destes hormônios nas mulheres ao longo da vida (URBAN et al. 2014). Além disso, a prolactina, os andrógenos e até mesmo os hormônios da tireoide estão associados a carcinogênese da mama (VORHERR 1987; NOGUEIRA e BRENTANI 1996; DENG e BRODIE 2001). Da mesma forma, a reposição hormonal também eleva o risco de desenvolvimento desta neoplasia em mulheres que apresentam histórico familiar positivo para tal, bem como nas demais, fazendo com que a atividade mitótica das células mamárias aumente de forma similar ao que ocorre durante o ciclo menstrual (VORHERR 1987; CARREÑO et al. 1999; HENDERSON e FEIGELSON 2000).

O fator hereditário está vinculado às síndromes hereditárias de câncer, descritas como doenças genéticas caracterizadas por uma maior predisposição ao desenvolvimento de tumores em uma mesma família.

Atualmente é possível afirmar um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama é a história familiar positiva para tal (SADDI et al. 2013; Ministério da Saúde 2015). Mulheres que apresentem algum parente de primeiro grau afetado (mãe, irmã ou filha), possuem um risco de desenvolvimento aumentado, principalmente nos casos em que esses tumores tenham surgido em idade mais precoce, antes do início da menopausa. Lesões atípicas da mama, como hiperplasia atípica, também estão associadas com um risco aumentado para o desenvolvimento de tumores malignos em até cinco vezes quando a paciente apresenta histórico familiar (URBAN et al. 2014).

### **1.1.3 Bases Moleculares e Genéticas**

Sabe-se que o processo de formação do câncer de mama, isto é, a carcinogênese deste tumor, ocorre de forma lenta e gradativa, fazendo com que a progressão da célula cancerígena em massa tumoral (visível e diagnosticável), em muitos casos, leve anos até sua conclusão. O surgimento das células tumorais ocorre em função de alterações no DNA dos genes – mutações genéticas – provocadas por agentes carcinógenos herdados ou adquiridos, estando entre eles agentes hormonais, químicos, radioativos, entre outros (Ministério da Saúde 1996; LESTER e COTRAN 2000).

Considerando-se que o desenvolvimento e diferenciação celular das mamas decorrem mesmo após o nascimento, apesar de terem início ainda na fase intrauterina, as células deste tecido ficam constantemente

susceptíveis a danos, visto que células mais diferenciadas são menos resistentes a falhas ficando, conseqüentemente, mais sujeitas ao mecanismo de morte celular programada – apoptose – a fim de evitar a proliferação de células tumorais (PAPA et al. 2013).

Neste processo, quando o mecanismo de controle responsável pela regulação do crescimento celular, pelo reparo aos danos ou por provocar a apoptose deixa de ser eficiente, promove-se uma formação desenfreada de células imaturas, proporcionando condições para o início da proliferação tumoral na mama (PAPA et al. 2013), cuja origem ocorre principalmente no epitélio ductal (TAVASSOLI e DEVILEE 2003).

Dentro da classificação histológica, os tumores de mama podem ser classificados como carcinoma in situ e invasivo. O primeiro é subdividido entre ductal (DCIS) e lobular (LCIS), devido a diferenças de padrões de crescimento e características citológicas entre os dois tipos. O DCIS é mais comum do que o carcinoma lobular invasivo, compreendendo um grupo heterogêneo de tumores (CONNOLLY et al. 2004).

O carcinoma invasivo também é subdividido histologicamente em ductal, lobular, misto, mucinoso, medular, papilar, micropapilar, cribriforme, metaplásico, apócrino e tubular, bem como com características de tipo medular e neuroendócrino (LAKHANI et al. 2012). Destes, o ductal invasivo é o mais frequente, correspondendo a até 80% dos casos (LI et al. 2005). Além disso, o carcinoma ductal invasivo também é classificado, com base no índice mitótico, formação glandular e tubular e pleomorfismo nuclear, em pouco, moderadamente ou bastante diferenciado, sendo o último o menos

agressivo (LESTER et al. 2009). No carcinoma ductal invasivo, assim como nos demais subtipos do carcinoma invasivo, em relação a classificação imunofenotípica estão o receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e HER2 (pela amplificação do oncogene que codifica este receptor) – é amplamente empregada (HARRIS et al. 2007; National Comprehensive Cancer Network - NCCN 2015), auxiliando na escolha de propostas terapêuticas (MAUGHAN et al. 2010), visto que estes marcadores podem indicar a resposta a uma determinada terapia alvo (PAYNE et al. 2008; RAKHA et al. 2010).

Os carcinomas de mama que apresentam positividade para os marcadores RE e RP, tendo seu crescimento, conseqüentemente, dependente destes hormônios, demonstram um melhor prognóstico, com uma sobrevida 10% maior, em média, do que os tumores negativos (GRANN et al. 2005).

Em relação aos subtipos moleculares, através de análises do perfil de expressão gênica, definiu-se uma classificação que vai além dos tipos definidos como receptores hormonais positivos ou negativos (SCHNITT 2010). Assim, os subtipos moleculares do câncer de mama são classificados em basal, HER2 positivo (apresentando amplificação deste gene), *normal like* e luminais A e B. Há, entre cada um dos tipos da classificação, diferenças significativas na sobrevida geral e sobrevida livre de doença. O subtipo basal, por frequentemente não apresentar positividade para nenhum dos receptores hormonais, nem amplificação do gene *HER2*, é amplamente associado ao tumor triplo negativo (TN) (apesar de não serem sinônimos)



(BERTUCCI et al. 2008; FOULKES et al. 2008), apresentando menor sobrevida, com pior prognóstico e comportamento mais agressivo, somado ao fato de que não existe terapia alvo específica para este subtipo. O subtipo que apresenta amplificação elevada do gene *HER2*, não manifesta positividade para RE, tendo, da mesma forma, comportamento mais agressivo. O Luminal A é o que apresenta melhor prognóstico visto que manifesta fenótipo RE positivo e HER2 negativo, enquanto o Luminal B apresenta positividade para ambos marcadores (PEROU et al. 2000; SORLIE et al. 2001, 2003).

Assim, de forma geral, o câncer de mama tem sido descrito como uma doença heterogênea apresentando diversos subtipos diferentes que manifestam perfil de expressão gênico distintos entre si, tendo implicações diretas com os índices de prognóstico e sobrevida em cada caso (PEROU et al. 2000).

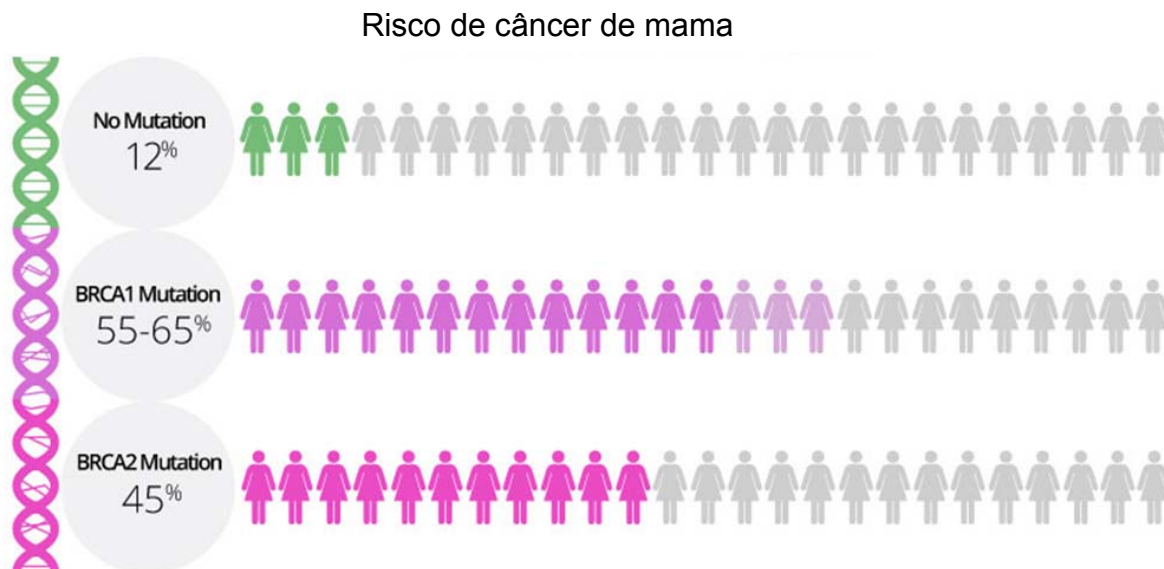
## **1.2 CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO**

Dentre as síndromes hereditárias associadas ao câncer de mama, a principal é a síndrome de câncer de mama e ovário hereditário (do inglês, hereditary breast and ovarian cancer, HBOC), caracterizada pelo surgimento da neoplasia mamária a partir da região ductal ou lobular e ocorrência de carcinoma de origem epitelial nos ovários. Esta síndrome representa cerca de 10% de todos os casos de câncer de mama e de ovário, sendo causada, principalmente, por mutações gênicas em *BRCA1* ou *BRCA2* (MIKI et al.

1994; NATHANSON et al. 2001; SCHNEIDER 2002; ANTONIOU et al. 2003). Mulheres com mutações germinativas nestes genes, carregam um alto risco cumulativo para o desenvolvimento do câncer de mama (FORD et al. 1994; THORLACIUS et al. 1996; KING et al. 2003; PETRUCELLI et al. 2010), ao passo que a história familiar de câncer e a detecção do tumor em idade jovem são fatores de risco para mutação germinativa nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (EVANS et al. 2010).

O risco de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres portadoras de mutação nestes genes é indiscutível em todas as populações, independente de raça ou etnia, devido, principalmente, a alta penetrância destes, que culmina no alto risco de acometimento (PETRUCELLI et al. 2010). Assim, mutações deletérias no gene *BRCA1* elevam o risco de desenvolvimento do câncer de mama de 12% (em relação à população geral que não apresenta nenhuma alteração genética) (HOWLADER et al. 2016) para cerca de 55-65% naquelas que apresentam, enquanto em portadoras de mutação no gene *BRCA2* o risco é estimado em aproximadamente 45% (ANTONIOU et al. 2003; CHEN e PARMIGIANI 2007), conforme observado na Figura 2. Para os casos de câncer de ovário, esse risco varia entre 40-65% em portadoras de mutação em *BRCA1* e cerca de 20% para *BRCA2* (FORD et al. 1998), à medida que na população em geral é inferior a 2% (CHEN e PARMIGIANI 2007). Entretanto, vale ressaltar que o risco de desenvolvimento pode ser influenciado por fatores genéticos e não genéticos, resultando em estimativas variáveis dentre as populações, sem

deixar de apresentar, porém, elevados índices como um todo (LEVY-LAHAD e FRIEDMAN 2007; PETRUCELLI et al. 2010).



**Fonte:** ArcherDX© [archerdx.com/variantplex/brca?mid=nav](http://archerdx.com/variantplex/brca?mid=nav)

**Figura 2** – Risco de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres na população em geral e em mulheres portadoras de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Além destas diferenças entre o risco desencadeado por cada gene, o fenótipo apresentado por mulheres portadoras de mutação também pode variar em função da posição da alteração nos genes. GAYTHER et al. (1997) observaram, utilizando uma coorte de 25 famílias com múltiplos casos de câncer de mama e ovário e através da análise de mutações do tipo *frameshift* (inserções e deleções) e *nonsense* no gene *BRCA2*, uma significativa correlação entre genótipo e fenótipo. Em famílias com maior risco de desenvolvimento de câncer de ovário, quando comparado ao de câncer de mama, as mutações identificadas foram detectadas em uma região do éxon 11 de aproximadamente 3.3kb deste gene, denominada,

então, como cluster de câncer de ovário (do inglês, ovarian cancer cluster region – OCCR). Posteriormente, estes achados foram verificados também por LUBINSKI et al. (2004) que constataram, em famílias que apresentavam casos de câncer de ovário, uma maior propensão da presença de mutações no cluster de câncer de ovário do que em qualquer outra região do gene *BRCA2*.

Ademais, tumores associados com mutações nestes genes parecem estar restritos a malignidades epiteliais, tanto nas mamas quanto nos ovários (PETRUCELLI et al. 2010). Já em relação aos subtipos moleculares (diretamente correlacionados com o prognóstico, como mencionado), mulheres com mutações no gene *BRCA1* tendem a desenvolver tumores do tipo triplo negativo (majoritariamente de alto grau), ao passo que em mulheres com mutações no gene *BRCA2*, os subtipos mais comuns são os luminais (WADDELL et al. 2010; JÖNSSON et al. 2010, 2012; NAGEL et al. 2012).

Logo, estes genes, descritos na década de 1990, são os principais genes associados ao câncer de mama de origem hereditária, tendo sido os primeiros a serem relacionados com a síndrome (HALL et al. 1990; WOOSTER et al. 1994). Atualmente há diversas diretrizes clínicas direcionadas as mulheres portadoras de mutações patogênicas nestes genes, com foco na redução de risco e no aumento da sobrevivência (BEVERS et al. 2009; FINCH et al. 2014).

Entre as demais síndromes também vinculadas ao câncer de mama estão a síndrome de Li-Fraumeni (causada por alteração genéticas no gene

*TP53*) (LALLOO e EVANS 2012), e uma mutação gênica em *PTEN*, descrita na síndrome Cowden de câncer de mama hereditário (BUBIEN et al. 2013). No caso da síndrome hereditária de câncer de mama-cólon, os casos estão associados a alterações de linhagens germinativas no gene *CHEK2*, que é constituído por 15 éxons e codifica uma proteína quinase. Sabe-se que a maioria dos casos envolvendo essa síndrome estão relacionados à variante de 1100delC deste gene (NASEEM et al. 2006; HAN et al. 2013).

O tumor de mama associado a uma mutação gênica tende a ser pouco diferenciado e manifestar-se de forma mais precoce do que os de origem esporádica, o que agrava as condições gerais do quadro da paciente, uma vez que o câncer de mama precoce está relacionado com um pior prognóstico, apesar dos intensos tratamentos e terapias disponíveis (GONZALEZ-ANGULO et al. 2005; EL SAGHIR et al. 2006; CANCELLO et al. 2010; HAN et al. 2010; PENG et al. 2011). Além disso, o cunho hereditário das neoplasias em pacientes mais jovens é observado em 10-37% dos casos, sendo que destes, 10-40% estão associados com mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, ao contrário do que ocorre nos casos esporádicos, em que apenas 1-10% estão relacionados a estes genes (LALLOO et al. 2006; FACKENTHAL e OLOPADE 2007; HAFFTY et al. 2009).

Em estudo desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, utilizando uma casuística composta por 54 pacientes afetadas com câncer de mama antes dos 36 anos de idade, os autores verificaram que 20,4% (11 de 54) apresentaram mutações patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Apenas uma paciente apresentou mutação no gene *TP53*. Mutações no gene

*BRCA1* foram associadas a 71,4% (5 de 7) dos tumores triplo negativos (CARRARO et al. 2013). Essa associação de tumores TN com mutação germinativa no gene *BRCA1* também foi observada em outro estudo desenvolvido pelo grupo, cuja porcentagem de identificação de mutações neste gene em mulheres que apresentavam tumores TN foi de 12,2%, ao passo que, quando foram consideradas apenas pacientes acometidas precocemente (até 40 anos de idade), esse percentual foi de 28% (BRIANESE et al. – em preparação).

Os tumores associados ao gene *BRCA2* não são tão facilmente diferenciados dos tumores esporádicos quanto à classificação histológica, porém apresentam perfil de expressão diferente destes tumores e dos associados a mutações no gene *BRCA1* (HEDENFALK et al. 2001). Tumores associados ao *BRCA2* habitualmente expressam positividade para os receptores hormonais de estrogênio e progesterona (LAKHANI et al. 1998; DA SILVA e LAKHANI 2010). Essas diferenças indicam que o desenvolvimento tumoral resultante de mutações em um destes genes ocorre por indução de vias tumorigênicas distintas entre um e outro (SOTIRIOU et al. 2005).

Assim como tumores de pacientes portadoras de mutação germinativa em *BRCA1* e *BRCA2* são distintos entre si, tumores associados a estes genes também divergem dos esporádicos e dos hereditários que estão relacionados a outros genes ainda não identificados (LAKHANI et al. 2000; HEDENFALK et al. 2003; JÖNSSON et al. 2005; PALACIOS et al. 2005; BREKELMANS et al. 2007).

Portanto, mutações germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* elevam, consideravelmente e de forma majoritária, a predisposição e o risco de desenvolvimento do câncer de mama e de ovários, além de estarem associadas, também, ao advento de outros tipos. Mutações no gene *BRCA1* aumentam o risco de acometimento por melanoma. Já o gene *BRCA2* foi associado a uma maior predisposição de desenvolvimento de câncer de próstata, cervical, pancreático, de mama em homens (MERSCH et al. 2015) e, em menor frequência, de câncer de garganta (DUROCHER et al. 1996).

No Brasil, estudos de rastreamento de mutações patogênicas nos principais genes, *BRCA1* ou *BRCA2*, descrevem frequências de mutação patogênicas divergentes devido a adoção de diferentes critérios de seleção, e pela utilização de diversas metodologias (observando suas particularidades e limitações), apresentam taxas de mutação que variam de 0,78 a 16,6% para *BRCA1* (LOURENÇO et al. 2004; GOMES et al. 2007; ESTEVES et al. 2009; EWALD et al. 2011; DILLENBURG et al. 2012; CARRARO et al. 2013; FELIX et al. 2014; SILVA et al. 2014) e para *BRCA2* de 0,4 a 9,6% (DUFLOTH et al. 2005; GOMES et al. 2007; ESTEVES et al. 2009; DILLENBURG et al. 2012; CARRARO et al. 2013; SILVA et al. 2014).

Em relação ao gene *TP53*, também associado ao câncer de mama, sendo, porém menos prevalente, GIACOMAZZI et al. (2014) observaram a prevalência da alteração R337H - mutação fundadora identificada em cerca de 0,3% da população brasileira (PALMERO et al. 2008; CUSTÓDIO et al. 2013) - em pacientes com câncer de mama que preenchem critérios de síndrome hereditária de câncer, sem características, porém, de

acometimento pela síndrome Li-Fraumeni e em um outro grupo de pacientes sem histórico familiar, formado por mulheres diagnosticadas com câncer de mama antes dos 45 anos ou a partir de 55 anos. Destas, 3,4% apresentaram a mutação, enquanto para o grupo de pacientes sem critérios de histórico familiar, a taxa de detecção foi de 8,6%. Outros estudos corroboram com essa baixa taxa de detecção de mutação neste gene nos casos de câncer de mama, como descrito por PALMERO et al. (2016), que não identificaram nenhuma mutação neste gene em pacientes que atendiam aos critérios para síndrome hereditária de câncer de mama, enquanto nos estudos desenvolvidos pelo nosso grupo, as taxas de detecção de mutação neste gene em pacientes jovens ou com histórico familiar positivo foram de 1,9% e 2,5%, respectivamente (CARRARO et al. 2013; SILVA et al. 2014).

Estes dados reforçam a necessidade de identificação de novos genes de susceptibilidade ao câncer de mama hereditário, visto que há um significativo percentual de mulheres brasileiras que não apresentam mutações germinativas nos genes mais importantes, apesar da evidente presença de um fator hereditário predisponente.

### **1.3 GENES *BRCA1* E *BRCA2* E A VIA DE RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA**

#### **1.3.1 *BRCA1***

O gene *BRCA1*, formado por 24 éxons, sendo 22 codificantes de uma proteína de 1.863 aminoácidos, foi mapeado em 1990 no cromossomo



17q21 pela pesquisadora Mary-Claire King e colaboradores (HALL et al. 1990), em uma época em que poucos genes haviam sido caracterizados e mapeados até então (KING 2014), tendo sido clonado poucos anos depois (MIKI et al. 1994). Em famílias com histórico de câncer de mama e ovário, já foram verificadas neste gene mais de 600 mutações pontuais distintas, de relevância clínica (SADDI et al. 2013).

O papel biológico do deste gene, mais de 20 anos após sua identificação, ainda não foi totalmente esclarecido (KING 2014). Sabe-se que o desenvolvimento do câncer ocorre pela perda germinativa de função de um alelo, sucedida por uma mutação somática que leva à perda de função do alelo remanescente (KNUDSON 1971), porém o fator que promove o desencadeamento do câncer permanece inconclusivo, visto que a proteína codificada por este gene atua em diversas funções biológicas essenciais (VENKITARAMAN 2014).

No entanto, é notório que essa proteína detém diversas funções, como regulação do ciclo celular, reparo a danos causados na fita dupla do DNA e regulação dos genes envolvidos nesse processo, apoptose e preservação da estabilidade cromossômica (YOSHIDA e MIKI 2004; VENKITARAMAN 2014), interagindo com diversas proteínas nesses processos (DENG 2006; ROSEN et al. 2006). A transcrição deste gene, induzida no final da fase G1 do ciclo celular e mantida em níveis elevados na fase S, sugere que este desempenha alguma função na síntese do DNA (GUDAS et al. 1996; RAJAN et al. 1996). O mesmo se aplica ao gene *BRCA2* (RAJAN et al. 1996; VAUGHN et al. 1996).

Durante o processo de replicação, o genoma está sobremaneira susceptível a erros no DNA, uma vez que danos causados em uma fita simples podem levar a ocorrência de danos na outra fita, ocasionando a quebra de dupla fita (QDF), que por sua vez pode induzir ao desenvolvimento de rearranjos cromossômicos, resultando, conseqüentemente, na instabilidade genômica, uma vez que ambas as fitas estão danificadas simultaneamente (ROY et al. 2012; CAESTECKER e VAN DE WALLE 2013).

A atuação deste gene no processo de reparo do DNA, especificamente em casos de QDF, ocorre, juntamente com diversas proteínas, por meio da recombinação homóloga (RH) (EAKIN et al. 2007). A RH é definida como um sistema essencial de reparo do DNA, que atua no reparo fidedigno da QDF, através da utilização da cromátide irmã não afetada como molde. A RH é considerada o processo preponderante para proteção da integridade genômica durante a proliferação celular, visto que, ao contrário dela, as demais vias de reparo de QDF estão susceptíveis a erros e acarretam deleções e translocações cromossômicas (SCHLACHER et al. 2011).

O reparo de QDF através da RH ocorre durante as fases S e G2 do ciclo celular, por meio da utilização de uma cromátide irmã íntegra como modelo para o reparo, sendo primordial para a efetiva manutenção da replicação. Durante o processo de execução da RH, as quinases do *ATM* e *ATR*, que reconhecem o dano ao DNA, recrutam outras proteínas tais como *BRCA1*, *TP53* e *CHK2*, a sinalização é mediada por *CHK2* e *BRCA1* e, por

fim, as proteínas BRCA2 e RAD51 iniciam o processo de reparo. Ainda há outros genes cujas proteínas atuam na RH, como o *BRIP1* e o *PALB2* (ROY et al. 2012; WALSH 2015), que também estão relacionados com a síndrome de câncer de mama e ovário hereditários, indicando que a via de recombinação homóloga do *BRCA1* e *BRCA2* suprime a atividade tumoral (ROY et al. 2012).

De forma mais detalhada, durante o reconhecimento da QDF do DNA, o *BRCA1* forma um heterodímero com o *BARD1*, através dos seus domínios proteicos (EAKIN et al. 2007) e, juntamente com o *BRIP1*, coordenam outras proteínas envolvidas no processo de reparo (WALSH 2015). Esta interação entre *BRCA1* e *BARD1* está associada com a ativação das fases G1 e S do ciclo celular e com os checkpoints das fases G2 e M (SILICIANO et al. 1997). O gene *BARD1* é, ao que parece, indispensável, visto que a ligação entre os genes é fundamental para a estabilidade de ambos (MCCARTHY et al. 2003; SHAKYA et al. 2008). A proteína *BRCA1* recruta, então, a proteína *BRCA2* para o local de QDF por meio de uma interação com a proteína de *PALB2*, que a conecta a esta (XIA et al. 2006; SY et al. 2009; ZHANG et al. 2009a, b). A interação entre eles é importante no desempenho da *RAD51* (PRAKASH et al. 2015).

Há fortes indícios de que a perda de função do gene *BRCA1*, supressor de tumor, resulte em instabilidade genômica, elevando, conseqüentemente, a susceptibilidade da célula a uma transformação maligna, pois, como relatado anteriormente, quando há um alelo do gene *BRCA1* mutado de forma germinativa, o segundo alelo fica mais propenso a

ser inativado ou deletado, fazendo com que o gene apresente inativação em homozigose (SMITH et al. 1992; DENG 2006).

Além disso, KING et al. (2003) observaram que fatores não genéticos, tais como sedentarismo e obesidade, podem influenciar de forma expressiva o processo de penetrância das mutações, mesmo das pertencentes a genes altamente penetrantes como *BRCA1* e *BRCA2*.

### 1.3.2 *BRCA2*

O gene *BRCA2*, segundo gene a ser associado com o câncer de mama hereditário, descrito em 1995, contém 27 éxons e localiza-se no cromossomo 13q12.3, sendo todos codificantes, resultando em uma proteína de 3.418 aminoácidos (WOOSTER et al. 1994; TAVTIGIAN et al. 1996). Em famílias com histórico de câncer de mama já foram detectadas neste gene mais de 100 mutações pontuais distintas, de relevância clínica (SADDI et al. 2013).

Este também atua no reparo do DNA em conjunto com o *BRCA1*, assim como na manutenção da integridade dos genes e do ciclo celular por sua atividade como supressor de tumor (CHEN et al. 1999; SY et al. 2009). Sua principal função é facilitar o processo de recombinação homóloga (YUAN et al. 1999), além de também atuar na proteção da replicação do DNA (ROY et al. 2012).

A proteína do gene *BRCA2* interage com a proteína do gene *RAD51*, cuja atividade é importante no mecanismo da RH e no reparo de quebra de dupla fita (SHARAN et al. 1997; WONG et al. 1997). Esta interação,

fundamental para a recombinação homóloga (MOYNAHAN et al. 2001a; ROY et al. 2012), permite que o *BRCA2* regule a disponibilidade e a atuação do *RAD51*, que envolve a fita simples do DNA, a fim de formar um filamento de nucleoproteína que, por sua vez, invade e pareia com um DNA homólogo (cromátide irmã), dando início ao processo de síntese e reparo do DNA (VENKITARAMAN 2002; WALSH 2015), sendo essencial também para a função de supressão tumoral deste processo de reparo (MOYNAHAN et al. 2001a).

Logo, tanto *BRCA1*, quanto *BRCA2*, desempenham papéis importantes para a proteção do genoma, participando da mesma via, a de recombinação homóloga, que é o único elo funcional comum entre estas. No entanto, apesar de atuarem no reparo de danos ao DNA, o fazem em etapas diferentes e com focos distintos. Enquanto *BRCA1* participa da resposta ao dano ao DNA, na ativação do checkpoint e diretamente no reparo ao dano, podendo atuar em outros processos de reparo do material genético, *BRCA2* está preponderantemente envolvido na RH, mediando este processo. Assim, é fortemente indicativo que a recombinação homóloga seja uma via primordial para a manutenção e proteção do genoma, sendo interrompida em tumores associados a mutações nestes genes (ROY et al. 2012).

Em consequência da atuação de ambos os genes no reparo da molécula de DNA, alguns estudos indicam que células tumorais detentoras dessas mutações danosas podem ser mais sensíveis a substâncias que combatem o câncer atuando diretamente no DNA, gerando danos no

mesmo. Um exemplo dessas substâncias é a cisplatina (YUAN et al. 1999; MOYNAHAN et al. 2001b; TASSONE et al. 2003).

### 1.3.3 Outros genes

Apesar da notável relevância dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, estes correspondem a apenas 25% de todas as neoplasias de mama hereditárias (KEAN 2014), fazendo com que os demais casos sejam causados, possivelmente, através de interações de genes de menor penetrância (já reconhecidos como associados ao câncer de mama ou não) cujos efeitos individuais apresentam menor intensidade ou a genes cuja associação ao câncer de mama ainda não foi estabelecida (EASTON 1999; ANTONIOU et al. 2001; MITCHELL et al. 2012).

Tem-se notado que genes que atuam no processo de reparo do DNA, na regulação do ciclo celular ou que participam da via do *BRCA*, interagindo, de alguma forma, com estes genes, são fortes candidatos a serem predisponentes ao câncer de mama e ovário (HEDENFALK et al. 2002; WALSH e KING 2007).

Diversas mutações patogênicas distintas já foram detectadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, sendo que cada mutação confere, isoladamente, um elevado risco de acometimento para estas neoplasias, apesar de serem individualmente raras. Os demais genes, do mesmo modo, apresentam muitas mutações raras, recentemente descobertas e classificadas como patogênicas, cujo risco de desenvolvimento varia entre um aumento de duas

vezes (para mutações no gene *CHEK2*) a dez vezes (para mutações no gene *TP53*) (KING 2014).

Desta forma, dentre os demais genes já associados ao câncer de mama, uma vez que desempenham papéis importantes no processo de reparo do DNA, estão o *TP53*, *CHEK2*, *PALB2*, *ATM*, *PTEN* e *BARD1* (DESMOND et al. 2015; EASTON et al. 2015; ECONOMOPOULOU et al. 2015).

O gene *TP53* codifica a proteína p53, que é responsável pelos processos celulares de replicação, proliferação, angiogênese, reparo do DNA e apoptose e atua no controle da transição entre as fases G1 e S do ciclo celular (podendo atuar também na transição das fases G2 e M). Assim, quando uma célula apresenta alguma alteração no DNA, a proteína p53 aglomera-se no núcleo, une-se à molécula de DNA e determina se há possibilidade de reparo do DNA ou se a célula sofrerá o processo de apoptose. Em caso de reparo do DNA, a proteína p53 estimula outros genes que desempenham esta função. Caso não seja possível repará-la, a p53 impede a divisão da célula, interrompendo a replicação da mesma, o que ocorre na fase G1 do ciclo celular, sinalizando para o processo apoptótico. Devido a tamanha importância e relevância, este gene, mutado somaticamente em um grande número de tumores (OLIVIER et al. 2006; PETITJEAN et al. 2007a, b; RIVLIN et al. 2011), foi apelidado de guardião do genoma (COTRAN et al. 2000; VOGELSTEIN et al. 2000; TAYLOR e STARK 2001). Assim, o estabelecimento e progressão tumoral são favorecidos pela inativação deste gene, normalmente por mutação somática,

que resulta na inibição do início da apoptose e na redução do combate a células com alterações genômicas (KIECHLE 2005). Nos casos associados ao câncer de mama, mutações somáticas neste gene estão relacionadas com 20-40% das ocorrências esporádicas (ELLEDEGE e ALLRED 1998; RUDOLPH et al. 1999), estando relacionadas também às ocorrências hereditárias por mutação nas linhagens germinativas, que caracterizam principalmente a síndrome de Li-Fraumeni que predispõe, também, a outros tipos de neoplasia (TAN et al. 2008). Além disso, mutações neste gene são substancialmente mais encontradas em casos de câncer de mama associados com *BRCA1* (56–100%) e *BRCA2* (29%) em comparação com casos não relacionados a estes genes (CHAPPUIS et al. 2000; HOLSTEGE et al. 2009).

A proteína CHK2, codificada pelo gene *CHEK2*, atua na regulação das fases G2 e M do ciclo celular e como supressor tumoral interagindo com diversas proteínas, tais quais as proteínas p53 e *BRCA1*, também envolvidas no processo de reparo do DNA (BARTEK et al. 2001; ZHANG et al. 2004). Desta forma, irregularidades germinativas neste gene foram relacionadas à predisposição ao câncer de mama hereditário, bem como outros tumores foram associados a este gene na presença de mutações somáticas (NEVANLINNA e BARTEK 2006). Estudos identificaram a associação da variante 1100delC, que gera um códon de parada prematuro após o aminoácido 380, anulando a atividade quinase, com o câncer de mama hereditário e com um risco intermediário de desenvolvimento desta neoplasia. Foi estimado, a partir destes dados, um aumento de 2 vezes no



risco de câncer de mama em mulheres portadoras desta mutação, o que representaria cerca de 1% de todos os casos de câncer de mama em indivíduos do sexo feminino (MEIJERS-HEIJBOER et al. 2002).

O gene *PALB2* (denominado *partner and localizer of BRCA2*) codifica uma proteína que se inter-relaciona com a proteína BRCA2. Ambas atuam juntamente a fim de reparar danos causados na fita do DNA, evitando que as células acumulem danos em seu material genético, o que, por sua vez, pode induzir a um processo desenfreado de divisão celular, sendo, portanto, descritas como supressoras de tumor. A proteína PALB2 estabiliza a proteína BRCA2, fixando-a no interior do núcleo, fazendo com que esta possa reparar os danos no DNA. Esses danos são ocasionados, especialmente, devido à exposição à radiação ou a outros elementos, por causas naturais ou quando ocorre um erro durante a divisão celular. Em resumo, o trabalho em conjunto dessas proteínas auxilia na manutenção da estabilidade do material genético celular (XIA et al. 2006; SY et al. 2009; BUISSON e MASSON 2012). Além disso, descobriu-se posteriormente que a proteína do gene *PALB2* também apresenta uma interação com BRCA1 (ZHANG et al. 2009a). Sobre o risco de desenvolvimento de câncer de mama, estima-se que para este gene varie de 33 a 58% (ANTONIOU et al. 2014).

Outro gene é o *ATM*, cuja proteína codificada fica localizada sobretudo na região nuclear, apresenta grande relevância nos processos neoplásicos. De forma semelhante às proteínas BRCA, esta proteína auxilia no monitoramento da integridade genômica e regulação do ciclo celular,

contribuindo para o controle do equilíbrio do crescimento e divisão celular, auxiliando também no processo de verificação de falhas no DNA e na indução da apoptose. Nestes casos, enzimas responsáveis pelo reparo do DNA, tais como p53, BRCA1 e CHK2 são estimuladas por esta proteína, para que haja, deste modo, manutenção da estabilidade celular (TERAOKA et al. 2001; SHILOH 2003; DERHEIMER e KASTAN 2010). O risco de desenvolvimento do câncer de mama em mulheres com mutações heterozigotas neste gene foi demonstrado, segundo estudos, ser em torno de duas vezes maior do que o da população em geral. Já mulheres acima de 50 anos, apresentam um risco cinco vezes maior (THOMPSON et al. 2005).

O gene *PTEN*, primeira fosfatase identificada como supressor tumoral, apresenta diversas funções, atuando no controle do ciclo celular, na regulação da apoptose e metástase (TAMURA et al. 1998; LU et al. 1999; WENG et al. 2001; WAITE e ENG 2002). Mutações germinativas nesse gene estão altamente relacionadas com a síndrome Cowden (ou síndrome do tumor hamartoma), sendo que 80% das famílias que apresentam essa síndrome são portadoras de mutações neste gene. Neste caso, o tipo de neoplasia mais frequentemente associado com a síndrome é o câncer de mama, havendo um risco de 25 a 50% de desenvolver a neoplasia (HANSSEN e FRYNS 1995; MARSH et al. 1998; PILARSKI 2009; TAN et al. 2012), contudo, a síndrome Cowden é responsável por menos de 1% de todos os casos de câncer de mama (PILARSKI 2009; TAN et al. 2012). Além disso, uma grande variedade de tumores também está associada com mutações ou inativação neste gene (TAMGUNEY e STOKOE 2007), tais

como neuroglioma, hepático, prostático, de mama e endometrial (LU et al. 1999).

Por fim, a proteína codificada pelo gene *BARD1* (assim denominado por estar associado com o domínio RING do gene *BRCA1*) apresenta consideráveis semelhanças com *BRCA1*, tanto funcionais quanto estruturais (WU et al. 1996). A ligação entre as duas proteínas aparenta ser de grande relevância para estabilidade das mesmas, bem como para as atividades de supressão tumoral desempenhadas por *BRCA1*, podendo ser, portanto, o ponto chave de mutações nos cânceres de mama e ovário. A interrupção desta ligação por uma substituição tumorigênica de aminoácidos (ou mutação *missense*) no *BRCA*, é sabidamente deletéria (WU et al. 1996; MEZA et al. 1999).

Estes genes podem ser classificados em três grupos – alta, moderada ou baixa – de acordo com a penetrância. Entre os de alta penetrância estão o *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, entre outros; entre os de penetrância moderada estão o *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, entre outros; e entre os de baixa penetrância, estão *FGFR2*, *TNRC9*, *LSP*, entre outros, que apenas acarretam no desenvolvimento da doença quando em associação com outros genes mutados e/ou fatores de risco (ANTONIOU et al. 2001; EASTON et al. 2007; FOULKES 2008; JENSEN et al. 2010).

#### **1.4 AUSÊNCIA DE MUTAÇÕES PATOGÊNICAS NOS PRINCIPAIS GENES ASSOCIADOS EM FAMÍLIAS COM HBOC**

Tem-se percebido, através de resultados sugeridos por estudos, que os genes de susceptibilidade ao câncer de mama, ainda que sejam importantes, são raros quando considerados individualmente, pois são responsáveis por apenas uma pequena parcela dos casos de susceptibilidade, estando, em outros casos, associados com outros genes (REHM 2013; ALORAIFI et al. 2015).

Como já citado anteriormente, cerca de 25% dos casos de câncer de mama hereditário no mundo estão associados aos genes *BRCA1* e *BRCA2* e 25% por interações de genes de menor penetrância. O restante dos casos permanece como uma incógnita (KEAN 2014).

De modo geral, mesmo em sociedades com abrangentes programas de rastreamento genético em pacientes com critérios clínicos para síndrome hereditária do câncer de mama, grande parte das pacientes recebe resultados negativos de alteração nos genes de susceptibilidade rastreados. As famílias, então, são rotuladas como casos não resolvidos, incertos ou como tendo risco de desenvolvimento semelhante ao que é atribuído aos casos esporádicos de câncer de mama (KURIAN et al. 2011). Isso se deve ao fato de que uma significativa parcela de famílias que preenchem os critérios clínicos das síndromes de câncer hereditário apresenta alterações em outros genes ainda não descritos. Entretanto, trabalhos indicam a necessidade de uma nova abordagem diagnóstica para esses casos negativos, utilizando painéis multigênicos expandidos, através do

sequenciamento de próxima geração, e que possam ser adaptados às diferentes populações e regiões, visto que os painéis utilizados atualmente nem sempre são tão detalhados neste aspecto.

Em um estudo desenvolvido pelo nosso grupo, os resultados obtidos condizem com os dados da literatura mundial, que estabelecem que a porcentagem de mulheres com câncer de mama hereditário portadoras de mutações patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* corresponde a apenas cerca de 20 a 25% (COUCH et al. 2014; KEAN 2014). Em um estudo citado anteriormente, utilizando uma casuística de 120 amostras com histórico familiar bem estabelecido para HBOC, a taxa de detecção de mutações germinativas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* (R337H) e *CHEK2* (1100delC) foi de 26%, demonstrando, conseqüentemente, que 74% não apresentaram mutações patogênicas nestes genes. Entretanto, considerando-se apenas as pacientes acometidas em idade menor ou igual a 35 anos, a taxa de detecção atingiu o patamar de 35% (SILVA et al. 2014). Igualmente, em outro estudo desenvolvido pelo grupo, no qual apenas pacientes acometidas com idade menor ou igual a 35 anos foram avaliadas para alterações nos principais genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* e *CHEK2* (1100delC), a taxa de detecção foi de 22,2%, porém em relação às pacientes que relataram possuir histórico familiar positivo, a taxa de detecção de mutação patogênica foi de 43,7% (CARRARO et al. 2013).

Portanto, mesmo considerando mulheres acometidas pelo câncer de mama hereditário em idade precoce e com história familiar positiva, a porcentagem de pacientes sem mutações patogênicas nestes genes é

superior à taxa de detecção de mutações, ratificando a necessidade de que outros genes associados sejam identificados.

## **1.5 IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS GENES ASSOCIADOS AO AUMENTO DE RISCO**

Observa-se, atualmente, um crescimento na conscientização da sociedade sobre os riscos familiares vinculados a uma síndrome hereditária e na demanda por aconselhamento de pacientes e seus membros familiares, inclusive devido ao maior acesso aos testes genéticos por valores mais acessíveis. Estudos demonstram, também, que há um real benefício da triagem de pacientes com critérios clínicos para câncer hereditário e que estão sob risco aumentado para o desenvolvimento de tumores. Em pacientes HBOC com diagnóstico molecular confirmado para mutação em *BRCA1*, por exemplo, um estudo mostrou um aumento significativo da sobrevida global (DOMCHEK et al. 2013), indicando que o acompanhamento correto e as opções terapêuticas disponíveis ao paciente diagnosticado geneticamente trazem benefício real de sobrevida.

Isso também se aplica aos que não apresentam mutações patogênicas nos principais genes relacionados, cuja identificação do agente responsável pelo acometimento por esta neoplasia fornece a informação primordial para sua completa caracterização e uma maior compreensão das bases moleculares do câncer hereditário, culminando em uma otimização do acompanhamento de pacientes e famílias portadoras, visando à sobrevivência e prevenção (SILVA et al. 2014; HIROTSU et al. 2015).

Sabe-se que as novas técnicas de sequenciamento, denominadas sequenciamento de nova geração (do inglês, *next generation sequencing* – NGS) ou sequenciamento paralelo massivo, lançadas a partir do ano de 2005, reduziram significativamente o custo por base sequenciada e o tempo demandado pela técnica até então, além da capacidade de gerar um grande volume de dados, tornando-as mais acessíveis e rotineiras, sendo utilizadas atualmente de maneira ampla em diversos laboratórios ao redor do mundo (MARDIS 2011; DOMCHEK et al. 2013; LADUCA et al. 2014; PABINGER et al. 2014; GRANT et al. 2015; YORCZYK et al. 2015). A evolução dessas tecnologias ampliou o âmbito de sua empregabilidade na ciência, possibilitando sua utilização para análise conjunta de genes distintos, sequenciamento do RNA, de regiões específicas do genoma, entre outras e não apenas para o estudo completo do genoma (SHENDURE e LIEBERMAN AIDEN 2012). Através destas técnicas é possível realizar um rastreamento mais amplo, em grande número de amostras simultaneamente, auxiliando de maneira eficaz no rastreamento dos genes conhecidos bem como na identificação de novos genes importantes para a predisposição à doença.

Por conseguinte, tendo em vista os dados relatados acima, nosso estudo tem por finalidade identificar novos genes candidatos à predisposição ao câncer de mama hereditário, através do sequenciamento do exoma e sequenciamento alvo (*targeted sequencing*) com painel de genes. Em um primeiro momento, a partir de uma coorte de quase 200 amostras avaliadas em dois trabalhos do grupo, 81 eram mulheres jovens diagnosticadas com

câncer de mama com idade inferior a 36 anos e estas foram avaliadas pelo grupo para mutações nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* e *CHEK2* (1100delC). Destas, 42 tinham história familiar positiva para câncer e, deste grupo, 21 (50%) apresentaram mutações patogênicas em um dos genes avaliados, sendo 10 no *BRCA1* (47,6%), 9 no *BRCA2* (42,9%) e duas no *TP53* (9,5%). As 21 (50%) restantes apresentaram variantes de significado incerto nestes genes ou eram selvagens para os genes avaliados (CARRARO et al. 2013; SILVA et al. 2014). E assim, 17 das 21 pacientes foram rastreadas através do sequenciamento completo do exoma (do inglês, *WES – whole exome sequencing*) (FIGUEIREDO 2014), sendo 16 delas não aparentadas e uma irmã. Assim, no presente trabalho foram realizadas, a seleção, validação e análise da co-segregação, em membros afetados e não afetados das famílias, de variantes reveladas no sequenciamento do exoma.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar novos genes cujas mutações estão potencialmente associadas à predisposição ao câncer de mama hereditário.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Selecionar variantes genéticas promissoras, através da implementação de critérios estridentes, a partir de dados de sequenciamento de exoma de leucócitos de pacientes acometidas com câncer de mama que preenchem critérios de história familiar para câncer de mama hereditário e que sejam negativas para mutação nos principais genes associados (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* e *CHEK2* (1100delC));
- 2 Validar por sequenciamento paralelo (*targeted sequencing*) as variantes selecionadas;
- 3 Avaliar as variantes validadas em um grupo de 25 amostras controle, formado por mulheres sem câncer, com o intuito de descartar as variantes presentes no grupo controle de mulheres do Brasil;
- 4 Realizar análise de segregação das variantes genéticas validadas nos

probandos, em membros afetados e não afetados de suas respectivas famílias;

- 5 Selecionar os genes mais promissores cujas mutações detectadas resultem em proteínas modificadas com potencial de estarem associadas ao câncer de mama hereditário.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 ASPECTOS ÉTICOS**

Este estudo aprovado no comitê de ética em pesquisa (CEP) do A.C.Camargo Cancer Center sob número 1754/13B, está vinculado ao projeto coordenado pela Dra. Dirce Maria Carraro, intitulado “Identificação de novos genes de susceptibilidade para câncer hereditário por sequenciamento de regiões exônicas” e com aprovação do mesmo CEP (nº 1754/13). Os recursos financeiros para sua realização foram provenientes do projeto temático FAPESP (nº 2013/23277-8) também coordenado pela Dra. Dirce Maria Carraro e aprovado no mesmo CEP (nº 1746/13). (Anexo 1)

### **3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

A partir de aproximadamente 200 amostras de pacientes com histórico pessoal de câncer de mama, previamente rastreadas para mutação pontual (por sequenciamento capilar) e rearranjos genômicos (por MLPA - do inglês, multiplex ligation-dependent probe amplification), nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, e *TP53*, além da mutação pontual 1100delC do gene *CHEK2* (CARRARO et al. 2013; SILVA et al. 2014), 42 pacientes apresentavam idade ao diagnóstico menor que 36 anos de idade e histórico familiar positivo para câncer (dados obtidos com o auxílio do departamento

de Oncogenética do A.C.Camargo Cancer Center, coordenado pela Dra. Maria Isabel Achatz). Destas, 21 não apresentaram mutação patogênica em nenhum dos genes rastreados.

A partir destas 21 pacientes, foram selecionadas 17 pacientes, sendo 16 mulheres não relacionadas e uma irmã de uma probanda, que foram submetidas ao sequenciamento completo do exoma, utilizando plataformas de nova geração. Estas etapas foram realizadas previamente e os resultados detalhados estão descritos em FIGUEIREDO (2014). No presente estudo, selecionamos as variantes genéticas resultantes deste sequenciamento, através de critérios descritos adiante para a customização de um painel de validação das mesmas, utilizando a técnica de sequenciamento alvo (*targeted sequencing*).

De forma mais detalhada, o trabalho anterior realizou o sequenciamento completo do exoma completo pelas plataformas SOLiD™5500xl e Ion Proton™ (ambos da Life Technologies) para detecção de mutação pontual. Das 17 amostras utilizadas, cinco eram provenientes do referente estudo de FIGUEIREDO (2014), enquanto as demais eram provenientes de um estudo prévio do grupo (CARRARO et al. 2013). Como controle, também foram incluídas no sequenciamento completo do exoma cinco pacientes que sabidamente apresentavam mutações patogênicas no gene *BRCA1* (CARRARO et al. 2013), para que as demais variantes genéticas encontradas nestes controles e em comum com as 17 pacientes fossem descartadas, assumindo que estas variantes não estão envolvidas no aumento de risco para desenvolvimento de câncer de mama, uma vez

que estavam presentes em pacientes com mutação patogênica para um dos genes mais importantes associados a esta síndrome.

Todas as amostras de DNA que foram submetidas para o sequenciamento do exoma apresentam Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) devidamente assinados permitindo a inclusão do DNA restante no Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center e sua utilização para projetos científicos aprovados pelo CEP. Assim este projeto iniciou sem a necessidade adicional de novos consentimentos.

Na etapa de análise de segregação das variantes em membros afetados e não afetados das probandas estudados, foram submetidos à aplicação de novo TCLE (Anexo 2) que foi aplicado tanto nas pacientes probandas como os membros selecionados que se dispuseram a colaborar com o estudo (Anexo 3).

Com base nestas informações o presente estudo é considerado como retrospectivo e prospectivo simultaneamente.

### **3.3 CASUÍSTICA E CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

O primeiro critério de inclusão utilizado foi referente a idade ao acometimento: Paciente e/ou familiares de primeiro grau diagnosticados com câncer de mama em idade precoce ( $\leq 35$  anos).

Na nossa casuística todas as 17 pacientes foram diagnosticadas com câncer de mama, 16 delas com 35 anos e uma delas, diagnosticada com 51, tinha uma irmã afetada que foi diagnosticada antes dos 35 anos. Todas

as pacientes deveriam preencher pelo menos um dos critérios de história familiar de câncer positiva relacionada à síndrome HBOC e descritas abaixo.

- Diagnóstico até 45 anos com um familiar também diagnosticado com câncer de mama até 45 anos de idade ou com tumor epitelial de ovário, tumor de trompa ou tumor peritoneal primário;
- Diagnóstico da paciente antes dos 50 anos de idade, tendo, também, um familiar afetado antes dos 50 anos ou com tumor epitelial de ovário, tumor de trompa ou tumor peritoneal primário;
- Diagnóstico da paciente de dois tumores de mama primários, sendo um diagnosticado antes dos 50 anos;
- Diagnóstico do tumor em qualquer idade, tendo dois ou mais familiares desenvolvido câncer de mama ou de ovário em qualquer idade;
- Ocorrência de um caso de câncer de mama masculino na família;
- Paciente com histórico pessoal de tumor epitelial de ovário, tumor de trompa ou tumor peritoneal primário;
- Família pertencente a etnias que apresentam índice elevado de mutações, tais como Judeus Ashkenazi, Islandeses, Suecos e Húngaros.

**Quadro 1** – Dados clínicos e histopatológico das pacientes incluídas no estudo

| <i>Paciente</i> | <i>Idade (diagnóstico)</i> | <i>Neoplasia</i>                    | <i>Tipo Histológico</i> | <i>RE</i> | <i>RP</i> | <i>HER2</i> |
|-----------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----------|-----------|-------------|
| SUBJ1007        | 25                         | Câncer de mama                      | CDI                     | neg       | neg       | neg         |
| SUBJ1011        | 33                         | Câncer de mama                      | CLI                     | pos       | pos       | neg         |
| MJ2001          | 28                         | Câncer de mama                      | CDI                     | pos       | pos       | pos         |
| MJ2003          | 26                         | Câncer de mama                      | CDI                     | neg       | neg       | neg         |
| MJ2004          | 34                         | Câncer de mama                      | CDI                     | pos       | pos       | neg         |
| MJ2007*         | 29                         | Câncer de mama                      | CDI                     | pos       | pos       | neg         |
| MJ2012*         | 29                         | Câncer de mama                      | CDI                     | neg       | neg       | neg         |
| MJ2013          | 29                         | Câncer de mama                      | CDI                     | pos       | pos       | neg         |
| MJ2014          | 35                         | Câncer de mama                      | MED                     | neg       | neg       | neg         |
| MJ2015          | 34                         | Câncer de mama                      | CDI                     | pos       | pos       | pos         |
| MJ2016          | 29                         | Câncer de mama                      | CDI                     | pos       | pos       | pos         |
| MJ2037          | 27                         | Câncer de mama                      | CDI                     | neg       | neg       | neg         |
| SM001.021       | 21                         | Câncer de ovário bilateral          | -                       | -         | -         | -           |
| SM001.040       | 51                         | Câncer de mama                      | ND                      | ND        | ND        | ND          |
| SM001.049       | 29/34                      | Melanoma/Câncer de mama             | MUC                     | neg       | pos       | neg         |
| SM001.068       | 37/44                      | Câncer de mama/<br>Câncer de ovário | ND                      | ND        | ND        | ND          |
| SM001.088       | 35                         | Câncer de mama                      | CDI                     | ND        | ND        | ND          |

\* Pacientes MJ2007 e MJ2012 são irmãs

ND: não disponível; CDI: carcinoma ductal invasivo; CLI: carcinoma lobular invasivo; MED: carcinoma medular; MUC: carcinoma mucinoso.

### **3.4 SELEÇÃO DAS VARIANTES PROMISSORAS A PARTIR DOS DADOS DE SEQUENCIAMENTO DO EXOMA COMPLETO**

Para acompanhar o avanço dos sequenciadores de nova geração que produzem um grande volume de dados e lidar com a crescente demanda, houve um estreitamento entre as áreas da biologia molecular e informática, vertente que atualmente é denominada bioinformática. Através do desenvolvimento de diversas ferramentas, pipelines específicos para NGS foram criados, no intuito de acelerar as análises dos dados e permitir a organização dos mesmos, estando diretamente relacionados com a qualidade da análise resultante (PABINGER et al. 2014).

Desta forma, no presente estudo, foi realizado, com o envolvimento de colaboradores com experiência em bioinformática, como o Dr. Rodrigo Ramalho e Renan Valieris, juntamente com o grupo de genômica do nosso grupo, um aprimoramento da análise dos dados gerados no sequenciamento completo do exoma. Assim, com o intuito de otimizar a seleção das variantes, foram estabelecidos critérios mais restritos de chamada de variantes e adoção de diferentes filtros de seleção.

Inicialmente, as sequências geradas no SOLiD™ 5500xl foram alinhadas através do programa LifeScope (Life Technologies) a sequência do genoma humano de referência (UCSC hg19) e a um arquivo contendo as coordenadas genômicas das regiões alvo do kit usado na construção das bibliotecas (SureSelect Human All Exon Kit 50Mb – Agilent Technologies). As sequências geradas no Ion Proton™ foram avaliadas utilizando o próprio software de análise do equipamento (Torrent Suite Software), que realiza o mapeamento das sequências no genoma referência. Para a chamada de variantes (SNPs e Indels), foram utilizados pipelines desenvolvidos pelos nossos colaboradores externos Dr. Sandro José de Souza, Dr. Jorge Estéfano Santana de Souza e Renan Valieris Bueno de Almeida.

Os dados de sequenciamento foram submetidos à análise para chamada de variantes pela ferramenta GATK (do inglês, Genome Analysis Toolkit), produzida pelo Instituto Broad (pertencente às universidades MIT e Harvard). Para seleção das variantes, que ocorreu durante a realização do presente estudo, a primeira etapa foi excluir aquelas que também estavam presentes nas amostras das cinco pacientes positivas para mutações



patogênicas germinativas no gene *BRCA1*, utilizadas como controle. Como comentado anteriormente, a remoção destas variantes está embasada no fato das mesmas ocorrerem com mutações sabidamente patogênicas, assumindo, portanto, que não devem estar associadas com a predisposição ao câncer de mama nestas famílias. Em seguida, foram excluídas as variantes intrônicas, as alterações silenciosas (que não resultam em mudança na sequência de aminoácidos de uma proteína) e as presentes no banco de dados dbSNP com frequência maior que 1% (versão 1.31), a fim de eliminar polimorfismos frequentes presentes em populações avaliadas.

Em seguida, para selecionar variantes para a validação por sequenciamento alvo, utilizamos os parâmetros de QD maior que 2 e FS menor que 6. O parâmetro QD é mensurado pela divisão do valor de qualidade da variante (Q=qualidade) pelo número de leituras feitas na posição onde a variante se encontra (D=densidade). Assim, quanto maior o valor de QD, mais confiável é a qualidade da variante observada. Já o parâmetro FS (calculado através do teste de Fisher) avalia o “viés de orientação”, tem base no princípio de que a variante observada é confiável quando identificada nas leituras provenientes de ambos os sentidos da fita, ou seja, fita positiva e negativa, de forma que haja equivalência entre as leituras. Isto posto, quando há uma discrepância entre as duas leituras, ou seja, se uma determinada variante aparece muito na leitura de uma das fitas e pouco na da outra, denotando um viés de orientação, pode sugerir existência de artefato de sequenciamento. Logo, quanto maior o valor de FS, menos confiável é a variante encontrada.

Por fim, excluímos as variantes presentes em mais de três pacientes, a fim de evitar a seleção de artefatos de sequenciamento ou alinhamento ou mesmo a seleção de variantes frequentes, que possivelmente não estão associadas ao risco de desenvolvimento de câncer de mama.

Após a utilização dos filtros e eliminação das variantes consideradas artefatuais ou pouco importantes para o estudo, nós selecionamos as variantes que impactam na sequência da proteína. Primeiramente selecionamos variantes que acarretam perda de função, sendo que nesta categoria foram incluídos eventos de inserção e deleção (INDEL) de nucleotídeos que levem a alteração da matriz de leitura dos aminoácidos (*frameshift*) e as substituições pontuais (SNV - do inglês, *single nucleotide variants*) que levam a inserção de códon de parada prematuro ou que ocorrem em sítios de *splice*. Em relação as demais SNVs, selecionamos as variantes que originam uma mutação *missense*, isto é, que levam a troca de amino ácido na proteína. Para este último grupo de variantes, adotamos alguns critérios para selecionar aquelas que ocorrem em genes com maior potencial de estarem associadas ao risco de desenvolvimento de câncer. Assim, privilegiamos as variantes cujos genes pertenciam a dois grupos – um composto por genes participantes da via de recombinação homóloga (RH) de quebra de DNA fita dupla (via de *BRCA*) juntamente com genes já associados a tumores hereditários, a qual denominamos de lista de genes associados ao risco de câncer de mama (Anexo 4); e o segundo contendo uma lista de genes relacionados com câncer, ou seja, genes frequentemente mutados em tumores (mutação somática), especialmente

em tumores de mama, a qual denominamos de lista de genes frequentemente mutados em tumores (Anexo 5).

Para a primeira lista (lista de genes associados ao risco de câncer de mama) buscamos genes frequentemente associados ao câncer de mama (especialmente em casos hereditários) no GENETests (ferramenta de informações e testes genéticos, que reúne grande parte dos painéis diagnósticos utilizados em todo o mundo, descrevendo em cada um deles os genes pesquisados), nos dados disponíveis do National Institute of Health, bem como no painel BROCA. Este refere-se a um painel, livre de patentes, que reúne os genes sabidamente relacionados ao câncer de mama para casos de síndromes hereditárias, tendo sido desenvolvido em 2010, na Universidade de Washington – Estados Unidos Este painel detecta todas as mutações de troca de bases, inserções, deleções ou alteração no número de cópias nestes genes. Além disso, incluímos nesta lista os genes pertencentes à via de reparo de quebra de dupla fita de DNA disponibilizados no banco de dados Reactome, formado por um grupo multidisciplinar do Ontario Institute for Cancer Research (OICR – Canadá), New York University Medical Centre (NYUMC – Estados Unidos) e European Bioinformatics Institute (EBI).

Para a segunda lista (lista de genes frequentemente mutados em tumores), utilizamos como referência o painel de genes comercial Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel (Thermo Fisher Scientific) e listas de genes relacionados com o câncer de mama provenientes de publicações importantes (STEPHENS et al. 2012; KEAN 2014).

As variantes do tipo SNV que resultaram em mutações *missenses* (com alteração do amino ácido) selecionadas foram submetidas à classificação por programas de predição de patogenicidade, tais como SIFT (NG e HENIKOFF 2001), PROVEAN (CHOI e CHAN 2015) e Mutation Taster (SCHWARZ et al. 2014). O critério foi somente selecionar variantes *missenses* classificadas como patogênica em pelo menos um dos programas utilizados.

Além disso, definimos critérios de seleção individuais para cada amostra presente no estudo baseado em algumas peculiaridades, e estes serão detalhados nos resultados.

### **3.5 VALIDAÇÃO TÉCNICA**

#### **3.5.1 Por Sequenciamento Capilar**

Algumas variantes detectadas foram validadas por sequenciamento capilar. Para isso foi realizada uma reação de PCR, com o kit Master Mix High Fidelity (Invitrogen®, SP, Brasil). Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corado com gel syber safe (invitrogen®, SP, Brasil), em uma corrida com duração média de 60 minutos, com voltagem de 110V.

Os produtos da amplificação foram purificados utilizando-se 10 unidades de exonuclease I (EXO) e 1 unidade de fosfatase alcalina (SAP), 1X tampão de diluição e água em um volume final de 3 µL. A reação

enzimática foi, então, incubada por 30 minutos a 37°C, ocorrendo em seguida a inativação das enzimas a 80°C por 15 minutos.

Os produtos amplificados genes purificados foram sequenciados com o kit BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, SP, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. O volume total da reação foi de 10µL com 1 µL de BigDye e 5 pmoles de oligonucleotídeos iniciadores *forward* ou *reverse* para cada fragmento particular. A ciclagem utilizada foi de 95°C durante 1 minuto e 30 segundos, 40 ciclos de 95°C por 18 segundos, 52°C por 18 segundos e 60°C por 4 minutos. A precipitação foi realizada utilizando Etanol/EDTA. As amostras foram, posteriormente, ressuspensas em 13µL de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, SP, Brasil), desnaturadas a 95°C em termociclador durante 5 minutos e acondicionadas, rapidamente, em gelo por 3 minutos e encaminhadas ao aparelho Sequenciador Automático de DNA, ABI Prism 3130 XL (Applied Biosystems).

### **3.5.2 Por Sequenciamento de Próxima Geração (Next Generation Sequencing - NGS)**

#### **✓ Preparo de Biblioteca e Sequenciamento Alvo**

Todas as mutações selecionadas a partir dos resultados do sequenciamento do exoma foram confirmadas por sequenciamento alvo (*targeted sequencing*) nas mesmas amostras (validação técnica) na plataforma Ion-PGM.

A confecção do painel de validação para as variantes selecionadas foi realizada considerando apenas a posição da variante a ser avaliada, com auxílio da ferramenta IonDesign (Life Technologies). Foi desenhado um painel com 363 amplicons, compreendendo um total de 108,64 kb. Este painel baseia-se na técnica de PCR multiplex, que permite a amplificação de todos os genes, a partir de dois *pools* de primers.

Para a construção das bibliotecas, seguimos o protocolo Ion AmpliSeq Library Preparation, utilizando DNA numa concentração de 10 ng por pool (quantificação feita no Qubit Fluorometric Quantitation, Thermo Fisher Scientific) para amplificação das regiões alvo. Os *amplicons* gerados foram tratados com a enzima FuPa e em seguida, os adaptadores P1 e A juntamente com barcodes, são ligados pela enzima ligase aos amplicons, que são então, purificados por beads magnéticas (Agencourt AMPure XP - Beckman Coulter).

Em seguida, ocorre a etapa de amplificação da biblioteca, com reação de PCR em emulsão, na qual ocorre a amplificação clonal dos fragmentos no interior de milhares de micelas geradas nesta solução. O sequenciamento realizado pela plataforma Ion PGM com o Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing (Thermo Scientific), segundo as orientações do fabricante. A reação foi realizada em um chip Ion 318 v2™, sendo possível obter uma quantidade de dados de cerca de 800 Mb de sequências. Para sequenciamento realizado pelo Ion Proton, feito segundo as orientações do fabricante, utilizou-se o Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit, em um Ion PI™ Chip, que gera cerca de 10 Gb de sequências.

O sequenciamento é baseado na liberação cíclica dos nucleotídeos em uma ordem conhecida e a incorporação de cada nucleotídeo na cadeia crescente por ligação fosfodiéster libera uma molécula de hidrogênio, modificando o pH da solução. A detecção de alterações no pH da solução, a cada ciclo do sequenciamento que permite a identificação da sequência.

#### ✓ **Análises do Sequenciamento Alvo**

A partir das chamadas de variantes feitas pelo servidor do Torrent Suite Software (cujos critérios foram frequência mínima de 2% e cobertura mínima de 20x) avaliamos o total de variantes validadas em cada paciente (Tabela 1). Para uma análise mais criteriosa, utilizamos o software CLC Genomics Workbench 6.5, da QIAGEN, que permite a visualização dos dados gerados pelo sequenciamento de nova geração para detecção de potenciais artefatos gerados pelo sequenciamento e também de imperfeições dos programas de chamadas de variantes. Assim, alinhamos os dados obtidos no sequenciamento de cada amostra com as respectivas sequências referências (Anexo 8). As anotações das variantes foram descritas considerando as sequências referências.

### **3.6 PACIENTES DO GRUPO CONTROLE**

Para constituição do grupo controle de mulheres do Brasil, selecionamos 25 amostras do Biobanco da instituição. Esses pacientes foram obtidos em um projeto anterior, aprovado no CEP do A.C.Camargo Cancer Center sob o número 1169/08, cujos critérios de inclusão foram

ausência de histórico pessoal e familiar de câncer colo retal e outros tipos relacionados à síndrome de colorretal hereditário, que também tem câncer de mama como um tipo de tumor associado com a síndrome. Além disso, não foram incluídos indivíduos que fossem asiáticos ou descendentes. Para este estudo, selecionamos amostras de indivíduos do sexo feminino, com idade igual ou inferior a 35 anos de idade. Esta análise também foi realizada no mesmo painel de sequenciamento alvo utilizado para as pacientes. O intuito foi filtrar polimorfismos frequentes na nossa população e que não estavam presentes nos bancos de dados internacionais (dbSNP e ClinVar). Para esta avaliação, fizemos um pool de 5 controles com quantidades de DNA equimolares, com intuito de reduzir os custos com reagentes. Para obtenção de dados robustos, o sequenciamento destas 5 bibliotecas foi de alta cobertura (com média de 1115 vezes de leitura) para possibilitar a detecção de variantes em baixa frequência, em decorrência da junção de DNA de cinco controles na mesma amostra. Considerando que a seleção das pacientes com história familiar positiva incluiu análise de heredogramas característicos de doença monogênica dominante, é esperado que as variantes a serem selecionadas estivessem em heterozigose. Assim, o sequenciamento paralelo massivo, em teoria, apresentaria frequência da variante em torno de 50%, salvo os vieses de sequenciamento. Desta forma, de acordo com a experiência do nosso grupo, esse tipo de variante é detectado preferencialmente no intervalo de frequência de 40 a 60%. Portanto, em um pool de 5 amostras, a frequência teórica de uma variante pertencente a um único paciente do pool seria de 10% (50/5) ou estaria no



intervalo de 8% a 12% (40/5 a 60/5). No entanto, é de nosso conhecimento que a quantificação de DNA, realizadas antes do início da confecção de bibliotecas e antes do sequenciamento massivo, pode apresentar variações entre pacientes, mesmo com a utilização de métodos de quantificação considerados precisos, podendo resultar em proporções bastante divergentes das amostras no pool. Assim, nosso critério para considerar a variante presente na população controle foi de no mínimo 2%, sendo também uma forma de evitar artefatos de sequenciamento que podem ser detectados em frequências bastante baixas.

### **3.7 COLETA DE SANGUE OU SALIVA E EXTRAÇÃO DO DNA**

As amostras de saliva foram coletadas no tubo Oragene•DNA OG-500 (DNA Genotek), segundo as especificações do fabricante e mantidas a 4°C até o momento da extração do DNA.

O DNA foi extraído de forma automatizada no equipamento QIASymphony SP (QIAGEN) a partir de 1100 µl de saliva, utilizando o QIASymphony DNA Midi Kit (QIAGEN), de acordo com o procedimento operacional padrão (POP) utilizado no Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center, com um rendimento médio de 9 µg.

Posteriormente mediu-se a concentração e pureza do DNA no equipamento Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific), cujas leituras para as razões OD260/280 e OD260/230 deviam estar em torno de 1,8-2,0.

Por fim, verificou-se a integridade da molécula por eletroforese em gel de agarose 0,8% utilizando 0,5 µg de DNA em 5 µl de água e 2 µl de loading

buffer 6X. As amostras de DNA, então, foram estocadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização.

Para alguns casos fizemos a extração do DNA a partir da coleta do sangue em tubos BD Vacutainer®/Hemogard™ EDTA K2 Plus 4 ml (7,2mg EDTA K2), de acordo com o procedimento operacional padrão (POP) utilizado no Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center.

O DNA foi extraído a partir da papa leucocitária de forma automatizada no equipamento QIASymphony SP (QIAGEN) a partir de 500  $\mu\text{l}$  de amostra, utilizando o kit QIASymphony DNA Midi Kit (QIAGEN) de acordo com o procedimento operacional padrão (POP) utilizado no Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center. As mesmas análises para quantificação e qualidade descritas acima foram utilizadas e as amostras de DNA foram estocadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até que fossem utilizadas.

### **3.8 ANÁLISE DE CO-SEGREGAÇÃO**

Para análise da co-segregação familiar, só foram avaliadas três famílias que puderam ser contactadas e que aceitaram participar do estudo. Esta etapa foi realizada com a primordial participação do departamento de oncogenética. De cada uma dessas famílias foram selecionados, na medida do possível, um indivíduo afetado e um não afetado (exceto para a família SM001.049), para determinar se a mutação em questão é segregada com a doença.

Desta forma, foi possível recrutar e coletar amostra de material biológico (sangue ou saliva) de dois membros da família MJ2001 (um afetado e um não afetado), sendo uma amostra de sangue pertencente ao Biobanco da instituição e uma amostra de saliva; de um membro da família SM001.049 (afetado), cuja amostra de sangue também pertencia ao Biobanco; e de 4 membros da família das pacientes irmãs MJ2007/MJ2012 (um afetado e três não afetados), sendo todas amostras de saliva. Cada um destes familiares foi avaliado apenas para as variantes genéticas analisados em sua respectiva família, através do sequenciamento alvo.

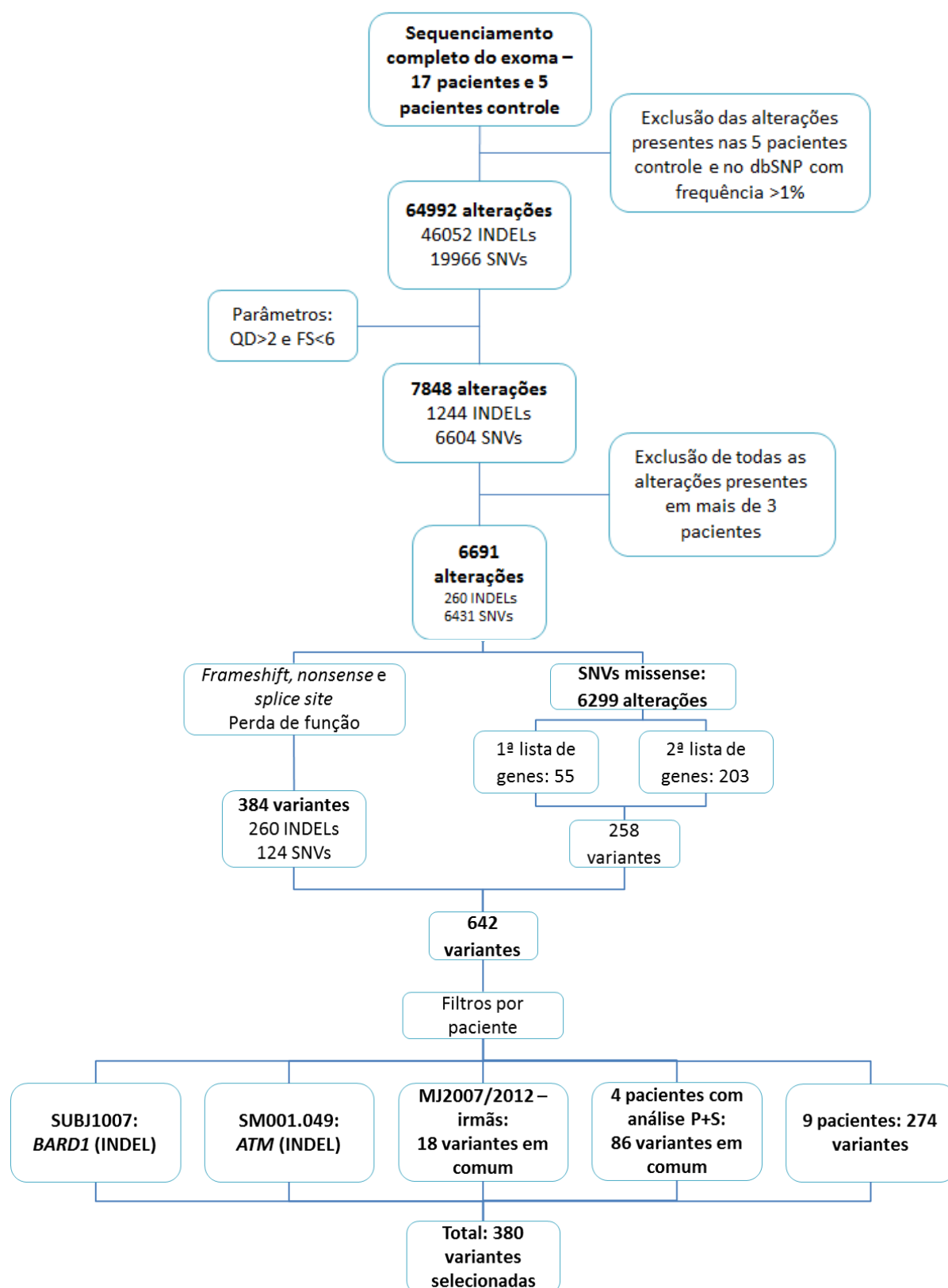
Todas as pacientes receberam, antes da realização do teste, um aconselhamento genético prévio, quando foi aplicado, também, o novo TCLE pela equipe do Departamento de Oncogenética do A.C.Camargo Cancer Center colaboradores do estudo, coordenados pela Dra. Maria Isabel Achatz.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DO SEQUÊNCIAMENTO DO EXOMA E SELEÇÃO DAS VARIANTES

A partir do sequenciamento completo do exoma de 17 pacientes com câncer de mama (16 mulheres não relacionadas e uma irmã de uma probanda) que preencheram os critérios de histórico familiar positivo e apresentaram resultados negativos para alterações patogênicas nos principais genes relacionados com a síndrome (*BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* – cujas regiões codificadoras foram avaliadas completamente, e c.1100delC do gene *CHEK2*), utilizamos critérios bem estabelecidos de seleção, a fim de selecionar de forma mais segura os genes mais promissores.

Os resultados do WES das 17 amostras e das cinco amostras controle gerou uma lista de 130.000 variantes genéticas.



**Figura 3** - Fluxograma dos resultados de sequenciamento e chamada, seleção e validação das variantes genéticas.

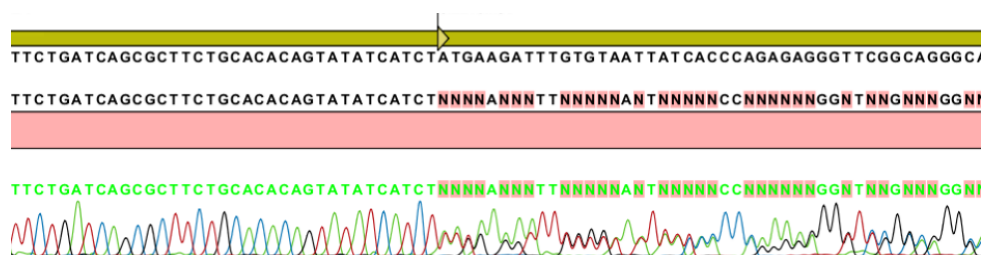
Na primeira etapa de seleção, excluímos variantes que também foram presentes nas cinco pacientes positivas para mutações patogênicas germinativas no gene *BRCA1*, bem como excluímos as variantes presentes no banco de dados dbSNP com frequência maior que 1%, atingindo um valor de 46.052 alterações do tipo INDEL e 19.966 alterações do tipo SNV. Em seguida, utilizamos os parâmetros de QD maior que 2 e FS menor que 6 para selecionar as variantes, a aplicação destes filtros foi especialmente importante para identificar e excluir variantes artefatuais. Nesta etapa, totalizamos 1.244 alterações do tipo INDEL e 6.604 alterações do tipo SNV. Por fim, excluímos as variantes presentes em mais de três pacientes, a fim de evitar a seleção de artefatos de sequenciamento ou alinhamento ou mesmo a seleção de variantes frequentes, que possivelmente não estão associadas com a neoplasia, resultando em 260 alterações INDELS e 6.431 SNVs.

Em seguida, selecionamos as variantes que acarretam na perda de função da proteína (inserções ou deleções *frameshift*, inserção de códon de parada prematuro ou mudança no sítio de splice). Essa análise gerou a seleção de 384 variantes, 260 INDELS e 124 SNVs. Em relação as SNVs que resultaram em uma mutação *missense* (não sinônimas), isto é, que leva a troca de amino ácido na proteína, selecionamos as variantes pertencentes as duas listas: de genes associados ao risco de câncer de mama e de genes frequentemente mutados em tumores (Anexos 4 e 5). Assim, das SNVs identificadas, 6.299 eram alterações não sinônimas (*missense*), das quais selecionamos 258 alterações (230 presentes em genes frequentemente

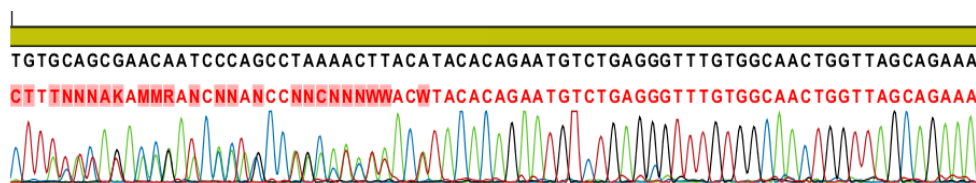
mutados em tumores e 55 de genes associados a risco de câncer de mama). Essa etapa gerou a seleção de 642 variantes.

## 4.2 SELEÇÃO DE VARIANTES POR PACIENTES

A partir das 642 variantes resultantes, definimos critérios de seleção individuais para cada amostra presente no estudo. Para as pacientes SUBJ1007 e SM001.049 selecionamos apenas uma única variante de cada, ambas do tipo INDEL, nos genes *BARD1* e *ATM*, respectivamente, tendo em vista que o *BARD1* faz parte da via do *BRCA1* e o *ATM*, quando mutado, tem sido frequentemente associado com o aumento do risco de desenvolvimento de diversos tipos de tumor. Estas variantes foram validadas através da técnica de sequenciamento Sanger (eletroforese capilar), conforme ilustrado nas figuras abaixo (Figuras 4 e 5).



**Figura 4** - Validação por Sanger da alteração c.2215dupT, no gene *BARD1*, identificada na paciente SUBJ1007.



**Figura 5** - Validação por Sanger da alteração c.7000\_7003delTACA, no gene *ATM*, identificada na paciente SM001.049.

Para as 4 pacientes cujo sequenciamento do exoma foi realizado tanto pela plataforma SOLiD quanto pela Ion Proton, selecionamos apenas as variantes que foram encontradas nos dados de sequenciamento de ambas plataformas, para cada amostra - da paciente MJ2001 foram selecionadas 17 alterações (2 do tipo INDEL e 15 do tipo SNV); da paciente SM001.021 foram selecionadas 23 alterações (5 do tipo INDEL e 18 do tipo SNV); da paciente SM001.068 foram selecionadas 25 alterações (5 do tipo INDEL e 20 do tipo SNV); da paciente SM001.088 foram selecionadas 21 alterações (3 do tipo INDEL e 18 do tipo SNV) - totalizando 86 variantes (15 do tipo INDEL e 71 alterações do tipo SNV). Além disso, uma vez que temos dois probandos que são irmãs (MJ2007 e MJ2012), comparamos a lista de variantes e selecionamos somente as 18 variantes presentes nas duas pacientes (2 do tipo INDEL e 16 variantes do tipo SNV). Por fim, das demais 9 pacientes, selecionamos todas as variantes de cada amostra – da paciente SUBJ1011 foram selecionadas 19 alterações (5 do tipo INDEL e 14 do tipo SNV); da paciente MJ2003 foram selecionadas 22 alterações (apenas do tipo SNV); da paciente MJ2004 foram selecionadas 29 alterações (4 do tipo INDEL e 25 do tipo SNV); da paciente MJ2013 foram selecionadas 21



alterações (apenas do tipo SNV); da paciente MJ2014 foram selecionadas 25 alterações (1 do tipo INDEL e 24 do tipo SNV); da paciente MJ2015 foram selecionadas 20 alterações (1 do tipo INDEL e 19 do tipo SNV); da paciente MJ2016 também foram selecionadas 20 alterações (3 do tipo INDEL e 17 do tipo SNV); da paciente MJ2037 foram selecionadas 48 alterações (5 do tipo INDEL e 43 do tipo SNV); da paciente SM001.040 foram selecionadas 70 alterações (28 do tipo INDEL e 42 do tipo SNV) - totalizando 274 variantes (227 variantes do tipo SNV e 47 do tipo INDEL).

Com estes novos critérios de seleção, identificamos um total de 380 variantes, pertencentes a 282 genes distintos, selecionadas para as 17 pacientes, sendo uma variante comum a 3 pacientes e 17 variantes comuns a 2 pacientes, resultando em 361 variantes distintas utilizadas para a confecção do painel.

### **4.3 CONFECÇÃO DO PAINEL DE VALIDAÇÃO**

Assim, essas 361 variantes distintas, em 248 genes, fortemente candidatas a serem fatores predisponentes ao câncer de mama hereditário foram utilizadas para a confecção de um painel de validação para sequenciamento de região alvo (*targeted sequencing*). Destas, 320 variantes distintas, selecionadas a partir dos dados de NGS, foram validadas (Anexo 6) por *target sequencing* na plataforma Ion Torrent (Life Technologies) nas mesmas amostras (42 do tipo INDEL e 278 do tipo SNV, o que representa 88,64% de validação em relação as 361 variantes distintas), conforme

detalhado na Tabela 2, de acordo com os critérios de seleção utilizados. O resultado das variantes selecionadas por paciente, assim como o número de variantes validadas está apresentado na Tabela 1. Nesta tabela também estão apresentados os valores de validação por tipo de alteração, verificando-se que o percentual de validação das alterações do tipo SNV foi consideravelmente superior ao percentual resultante da validação das alterações do tipo INDEL, indicando que os critérios para a seleção das variantes do tipo SNV foram bem ajustados. A partir da análise destes dados foi possível observar também que, apesar da plataforma SOLiD ser atualmente uma tecnologia já substituída por outras e estar em desuso, a porcentagem dos dados validados que por ela foram gerados foi superior ao observado na plataforma Ion Proton.

**Tabela 1 - Número de variantes selecionadas e validadas por paciente**

| Paciente               | Plataforma de Sequenciamento | Variantes selecionadas | Total de validação      |                        | SNV                     |               | INDEL                  |               |
|------------------------|------------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|---------------|------------------------|---------------|
|                        |                              |                        | Validadas               | Não validadas          | Validadas               | Não validadas | Validadas              | Não validadas |
| <b>SUBJ1007</b>        | SOLiD                        | 1                      | 1<br>(100%)             | 0                      | -                       | -             | 1                      | 0             |
| <b>SUBJ1011</b>        | SOLiD                        | 19                     | 19<br>(100%)            | 0                      | 14                      | 0             | 5                      | 0             |
| <b>MJ2001</b>          | SOLiD e Ion Proton           | 17                     | 16<br>(94,12%)          | 1<br>(5,88%)           | 14                      | 1             | 2                      | 0             |
| <b>MJ2003</b>          | SOLiD                        | 22                     | 20<br>(90,9%)           | 2<br>(9,1%)            | 20                      | 2             | -                      | -             |
| <b>MJ2004</b>          | SOLiD                        | 29                     | 27<br>(93,1%)           | 2<br>(6,9%)            | 23                      | 2             | 4                      | 0             |
| <b>MJ2007 / MJ2012</b> | SOLiD                        | 18                     | 16<br>(88,89%)          | 2<br>(11,11%)          | 14                      | 2             | 2                      | 0             |
| <b>MJ2013</b>          | SOLiD                        | 21                     | 19<br>(90,5%)           | 2<br>(9,5%)            | 19                      | 2             | -                      | -             |
| <b>MJ2014</b>          | SOLiD                        | 25                     | 22<br>(88%)             | 3<br>(12%)             | 21                      | 3             | 1                      | 0             |
| <b>MJ2015</b>          | SOLiD                        | 20                     | 19<br>(95%)             | 1<br>(5%)              | 19                      | 0             | 0                      | 1             |
| <b>MJ2016</b>          | SOLiD                        | 20                     | 20<br>(100%)            | 0                      | 17                      | 0             | 3                      | 0             |
| <b>MJ2037</b>          | SOLiD                        | 48                     | 45<br>(93,75%)          | 3<br>(6,25%)           | 40                      | 3             | 5                      | 0             |
| <b>SM001.021</b>       | SOLiD e Ion Proton           | 23                     | 23<br>(100%)            | 0                      | 18                      | 0             | 5                      | 0             |
| <b>SM001.040</b>       | Ion Proton                   | 70                     | 45<br>(64,29%)          | 25<br>(35,71%)         | 36                      | 6             | 9                      | 19            |
| <b>SM001.049</b>       | SOLiD e Ion Proton           | 1                      | 1<br>(100%)             | 0                      | -                       | -             | 1                      | 0             |
| <b>SM001.068</b>       | SOLiD e Ion Proton           | 25                     | 25<br>(100%)            | 0                      | 20                      | 0             | 5                      | 0             |
| <b>SM001.088</b>       | SOLiD e Ion Proton           | 21                     | 20<br>(95,24%)          | 1<br>(4,76%)           | 18                      | 0             | 2                      | 1             |
| <b>Total final</b>     | —                            | <b>380</b>             | <b>338<br/>(88,95%)</b> | <b>42<br/>(11,05%)</b> | <b>293<br/>(93,31%)</b> | 21            | <b>45<br/>(68,18%)</b> | 21            |

Entre os dados estão a quantidade de variantes do tipo SNV e do tipo INDEL validadas por paciente e no total de todas as pacientes, e a plataforma de sequenciamento utilizada para cada amostra.

**Tabela 2 - Genes cujas variantes foram validadas por paciente, de acordo com os critérios de seleção**

| Pacientes       | Variantes Validadas        | Perda de função           | Lista genes associados ao risco de câncer de mama | Lista de genes frequentemente mutados em câncer | Genes Validados   |
|-----------------|----------------------------|---------------------------|---|---|---|
| SUBJ1007        | 1<br>(1 INDEL)             | 1<br>(1 INDEL)            | 1<br>(1 INDEL)                                    | —   | <b>BARD1(c.2215dupT;Tyr739Leufs*2)</b>  |
| SUBJ1011        | 19<br>(14 SNVs / 5 INDELS) | 6<br>(1 SNV / 5 INDELS)   | 1<br>(1 SNV)                                      | 12<br>(12 SNVs)                                 | <b>ADAMTS20(c.4090T&gt;A,p.Tyr1364Asn),APC(c.1604C&gt;T,p.Ser535Phe),ASXL1(c.3498C&gt;G,p.Ser1166Arg),ATRX(c.1606A&gt;G,p.Met536Val),CCRS5(c.550_582del,p.Tyr184_Gln194del),CSMD3(c.3644A&gt;C,p.Glu1215Ala),LPP(c.926G&gt;A,p.Gly309Aasp),MAML2(c.851C&gt;T,p.Thr284Ile),NCOA2(c.1882G&gt;A,p.Gly628Arg),OR52K2(c.798dupA,p.Ala267Serfs*37),PKD2L1(c.413T&gt;G,p.Leu138*),PTGS2(c.1532T&gt;C,p.Val511Ala),PTPRT(c.1613A&gt;T,p.Gln538Leu),SYNE1(c.7156A&gt;G,p.Ile2386Val),SYNE1(c.9764C&gt;T,p.Ser3255Leu),TAS1R1(c.2070delG,p.Gln690Hisfs*6),UTRN(c.4247A&gt;G,p.Gln1416Arg),WWTR1(c.1199_1200insAATT,p.*401lleext*10),ZNF117(c.435dupC,p.Ala145X)</b>   |
| MJ2001          | 16<br>(14 SNVs / 2 INDELS) | 5<br>(3 SNVs / 2 INDELS)  | 5<br>(5 SNVs)                                     | 7<br>(7 SNVs)                                   | <b>ATRX(c.2595C&gt;G;p.His865Gln),C9orf3(c.813delT;p.Val272Trpfs*5),DNAH1(c.2241C&gt;A;p.Tyr747*),FAM20A(c.1012G&gt;A;p.Gly338Ser),FANCC(c.416G&gt;A;p.Gly139Glu),HIF1A(c.1957A&gt;G;p.Lys653Glu),KRTAP29-1(c.518_531del;p.Pro173Argfs*2),LPAR6(c.921G&gt;T;p.Trp307Cys),PDGFRB(c.3287C&gt;T;p.Ala1096Val),PTPN22(c.1859G&gt;A;p.Trp620*),RP111(c.6118G&gt;T;p.Glu2040*),STK36(c.1429C&gt;T;p.Arg477Trp),TET2(c.2429A&gt;G;p.Gln810Arg),USP35(c.2063C&gt;T;p.Thr688Met),UTRN(c.143G&gt;A;p.Ser48Asn),ZNF574(c.1831G&gt;A;p.Glu611Lys)</b>   |
| MJ2003          | 20<br>(20 SNVs)            | 2<br>(2 SNVs)             | 3<br>(3 SNVs)                                     | 15<br>(15 SNVs)                                 | <b>ATM(c.5558A&gt;T;p.Asp1853Val),ATR(c.2290A&gt;G;p.Lys764Glu),EP300(c.6488C&gt;T;p.Pro2163Leu),FANCD2(c.3416T&gt;C;p.Met1139Thr),IL7R(c.376A&gt;C;p.Ile126Leu),ITGA10(c.3481A&gt;G;p.Arg1161Gly),KAT6A(c.5926A&gt;G;p.Met1976Val),KIAA1919(c.545T&gt;A;p.Leu182*),MAML2(c.1440C&gt;G;p.Ile480Met),MARK1(c.1643G&gt;A;p.Arg548Gln),MTR(c.1982T&gt;C;p.Ile661Thr),OAS3(c.2530C&gt;T;p.Arg844*),PLEKHG5(c.325C&gt;T;p.Arg109Cys),SAMD9(c.257C&gt;T;p.Ser86Phe),SUFU(c.1325A&gt;G;p.Lys442Arg),SYNE1(c.12061T&gt;C;p.Cys4021Arg),TGM7(c.307G&gt;C;p.Val103Leu),TGM7(c.1391G&gt;A;p.Arg464Gln),ZNF217(c.2743C&gt;T;p.Pro915Ser),ZNF217(c.2742G&gt;T;p.Glu914Asp)</b>   |
| MJ2004          | 27<br>(23 SNVs / 4 INDELS) | 10<br>(6 SNVs / 4 INDELS) | 2<br>(2 SNVs)                                     | 15<br>(15 SNVs)                                 | <b>AKAP9(c.10249C&gt;T;p.Arg3417Cys),APC(c.3949G&gt;C;p.Glu1317Gln),ARHGAP8(c.244delC;p.Arg82Glyfs*55),ARID1B(c.2419C&gt;T;p.Pro807Ser),AXL(c.2414A&gt;C;p.Asn805Thr),BCL9(c.3633G&gt;A;p.Met1211Ile),C11orf40(c.344_345delCT;p.Ser115Tyrfs*20),CD33(c.466_469del;p.Gly156Thrfs*5),CSMD3(c.9623A&gt;T;p.Asn3208Ile),DMKN(c.528C&gt;A;p.Tyr176*),EP400(c.5324G&gt;T;p.Ser1775Ile),ERCC4(c.1031A&gt;T;p.Tyr344Phe),FOLR3(c.595C&gt;T;p.Gln199*),LPP(c.869C&gt;G;p.Ala290Gly),MALT1(c.824A&gt;G;p.Tyr275Cys),MCM9(c.3241C&gt;T;p.Arg1081*),MMP8(c.925C&gt;T;p.Gln309*),NRG3(c.1612C&gt;T;p.Arg538*),NUMA1(c.2170A&gt;G;p.Arg724Gly),OVGP1(c.1808C&gt;T;p.Thr603Ile),PKHD1(c.9577G&gt;A;p.Val3193Ile),POT1(c.1211G&gt;T;p.Gly404Val),SLC22A16(c.1664T&gt;C;p.Leu555Pro),TAS2R8(c.46G&gt;T;p.Glu16*),TET2(c.3251A&gt;C;p.Gln1084Pro),TOPBP1(c.847A&gt;G;p.Lys283Glu),WWTR1(c.1199_1200insAATT;p.*401lleext*10)</b> |
| MJ2007 / MJ2012 | 16<br>(14 SNVs / 2 INDELS) | 5<br>(3 SNVs / 2 INDELS)  | 7<br>(5 SNVs / 2 INDELS)                          | 7<br>(7 SNVs)                                   | <b>BRCA1(c.4963T&gt;C;p.Ser1655Pro),CAS5(c.43A&gt;G;p.Ile15Val),ERBB2(c.563G&gt;A;p.Arg188His),MAB21L3(c.739G&gt;T;p.Glu247*),MET(c.1451A&gt;G;p.His484Arg),PDGFRB(c.581T&gt;C;p.Ile194Thr),POLA1(c.3908T&gt;C;p.Met1303Thr),PTPRD(c.1856C&gt;T;p.Thr619Ile),ROS1(c.1108T&gt;C;p.Ser370Pro),ROS1(c.6733G&gt;A;p.Gly2245Ser),SLC22A16(c.226delG;p.Ala76Profs*66),SLC5A4(c.427delG;p.Val143Serfs*15),SLC5A4(c.415G&gt;T;p.Glu139*),SLC5A4(c.1007G&gt;A;p.Arg336His),UBE2J1(c.577G&gt;C;p.Gly193Arg),UHRF1(c.2066C&gt;A;p.Ser689*)</b>   |
| MJ2013          | 19<br>(19 SNVs)            | 6<br>(6 SNVs)             | 4<br>(4 SNVs)                                     | 8<br>(8 SNVs)                                   | <b>AKAP9(c.10840A&gt;G;p.Met3614Val),CD79B(c.566C&gt;T;p.Ala189Val),DNAH5(c.5131C&gt;T;p.Arg1711*),KMT2C(c.9245C&gt;T;p.Pro3082Leu),MAATS1(c.925G&gt;T;p.Glu309*),NBN(c.643C&gt;T;p.Arg215Trp),OCEL1(c.748C&gt;T;p.Gln250*),PARVG(c.952C&gt;T;p.Gln318*),PTPMT1(c.605G&gt;C;p.*202Serext*38),PUS7L(c.922C&gt;T;p.Arg308*),RNF213(c.6289G&gt;A;p.Val2097Ile),SLC22A16(c.599C&gt;T;p.Ala200Val),</b>  |

|           |                            |                            |               |                         |  |
|-----------|----------------------------|----------------------------|---------------|-------------------------|--|
|           |                            |                            |               |                         | <p><b>SLC5A4(c.1250C&gt;T;p.Ala417Val), SLX4(c.4766G&gt;A;p.Arg1589His), SYNE1(c.5227G&gt;C;p.Asp1743His), TPR(c.5227G&gt;C;p.Asp1743His), TSGA10(c.2047C&gt;T;p.Arg683*), ZNF217(c.756C&gt;G;p.Asp252Glu), ZNF521(c.2579C&gt;T;p.Thr860Ile)</b><br/> <b>BCO2(c.211C&gt;T;p.Arg71*), CHIT1(c.1048A&gt;T;p.Lys350*), DNAH7(c.10359T&gt;G;p.Tyr3453*), EFCAB5(c.1832_1833delAG;p.Glu611Valfs*66), FLT1(c.3602C&gt;T;p.Pro1201Leu), GALNT3(c.484C&gt;T;p.Arg162*), GCKR(c.1618C&gt;T;p.Arg540*), GRM8(c.593C&gt;G;p.Pro198Arg), HRNR(c.2299C&gt;T;p.Arg767*),</b><br/> <b>KDR(c.1116G&gt;C;p.Glu372Asp), KMT2D(c.14957G&gt;A;p.Arg4986His), MRE11A(c.529G&gt;A;p.Ala177Thr), NLRP1(c.2815G&gt;A;p.Val939Met), NOSTRIN(c.394C&gt;T;p.Gln132*), ORSH6(c.931A&gt;G;p.Lys311Glu), PDGFRA(c.499G&gt;A;p.Val167Met), PLEKHH1(c.4042C&gt;; p.Arg1348*), SLC2A8(c.802C&gt;T;p.Gln268*), SLX4(c.3383A&gt;C;p.Gln1128Pro), TSC2(c.3584C&gt;T;p.Ala1195Val), UTRN(c.6679A&gt;G;p.Ile2227Val), WDR31(c.283G&gt;A;p.Val95Met)</b></p>  |
| MJ2014    | 22<br>(21 SNVs / 1 INDEL)  | 10<br>(9 SNVs / 1 INDEL)   | 4<br>(4 SNVs) | 8<br>(8 SNVs)           |  |
| MJ2015    | 19<br>(19 SNVs)            | 7<br>(7 SNVs)              | 3<br>(3 SNVs) | 9<br>(9 SNVs)           | <p><b>A4GNT(c.796C&gt;T;p.Arg266*), ASPM(c.4213C&gt;T;p.Arg1405Cys), ATRX(c.2484G&gt;C;p.Met828Ile), BRCA2(c.865A&gt;C;p.Asn289Hi), BRIP1(c.577G&gt;A;p.Val193Ile), CDK12(c.3824C&gt;T;p.Pro1275Leu), CFHR2(c.760C&gt;T;p.Arg254*), CSF1R(c.1237G&gt;A;p.Gly413Ser), GJB4(c.384G&gt;A;p.Trp128*), HSP90AB1(c.784G&gt;A;p.Gly262Ser),</b><br/> <b>KRT76(c.826G&gt;T;p.Glu276*), LPAR6(c.921G&gt;T;p.Trp307Cys), LPHN3(c.1394G&gt;A;p.Arg465Gln), MTNR1A(c.541C&gt;T;p.Gln181*), PKD1L2(c.4201C&gt;T;p.Arg1401*), PRKAR1A(c.1373A&gt;G;p.Lys458Arg), RPE(c.237G&gt;A;p.Trp79*), STK36(c.365T&gt;C;p.Leu122Pro), XPC(c.872C&gt;G;p.Ser291Cys)</b></p>   |
| MJ2016    | 20<br>(17 SNVs / 3 INDELS) | 9<br>(6 SNVs / 3 INDELS)   | 5<br>(5 SNVs) | 7<br>(6 SNVs / 1 INDEL) | <p><b>ATM(c.2442C&gt;A;p.Asp814Glu), ATRX(c.2680A&gt;C;p.Thr894Pro), BRIP1(c.577G&gt;A;p.Val193Ile), CCDC27(c.454G&gt;T;p.Glu152*), CEACAM20(c.1536C&gt;A;p.Cys512*), DNAH7(c.10359T&gt;G;p.Tyr3453*), EVI2B(c.1283T&gt;C;p.Ile428Thr), ITGA9(c.2845C&gt;G;p.Leu949Val), KDELC2(c.930_931delAG;p.Arg310Serfs*6), LRRC39(c.148_154del;p.Thr50*), MAML2(c.521G&gt;A;p.Gly174Asp), MTOR(c.985G&gt;A;p.Ala329Thr), MYO1A(c.277C&gt;T;p.Arg93*), PON3(c.94C&gt;T;p.Arg32*), PTPRD(c.2164G&gt;T;p.Ala722Ser), PZP(c.2038C&gt;T;p.Arg680*),</b><br/> <b>RAF1(c.1241dupA;p.Asp415Glyfs*33), SLX4(c.3662C&gt;T;p.Ala1221Val), ZNF217(c.2743C&gt;T;p.Pro915Ser), ZNF217(c.2742G&gt;T;p.Glu914Asp), AFF1(c.2651C&gt;T;p.Pro884Leu), ANKRD2(c.349G&gt;T;p.Glu117*), ANKRD35(c.1510C&gt;T;p.Arg504*), BAALC(c.409C&gt;T;p.Arg137*), BDH1(c.528delG;p.Lys177Asnfs*39), BMPR1A(c.1327C&gt;T;p.Arg443Cys), BRCA1(c.5006C&gt;T;p.Ala1669Val), C20orf96(c.786delT;p.Gln263Argfs*8), CCR5(c.550_582del;p.Tyr184_Gln194del), CD4(c.571A&gt;G;p.Lys191Glu),</b><br/> <b>CSMD3(c.3059G&gt;A;p.Arg1020His), E2F7(c.2572G&gt;C;p.Val858Leu), EFCAB13(c.706C&gt;T;p.Arg236*), ERCC1(c.875G&gt;A;p.Trp292*), FAM217A(c.1525T&gt;C;p.*509Glnext*31), FN1(c.1070G&gt;A;p.Gly357Glu), HSP90AA1(c.37C&gt;T;p.Pro13Ser), IKBKE(c.755G&gt;A;p.Arg252Gln), IL4(c.313C&gt;T;p.Arg105*), ITGA10(c.668G&gt;A;p.Arg223Gln), ITIH3(c.925A&gt;T;p.Arg309*), KAT6B(c.581C&gt;T;p.Ser194Leu), KDR(c.2312C&gt;T;p.Thr771Met), KDR(c.2525G&gt;A;p.Arg842His), KMT2C(c.4802A&gt;G;p.Asn1601Ser), LCN10(c.456C&gt;G;p.Tyr152*), LIFR(c.1937C&gt;A;p.Thr646Asn), LPHN3(c.2782C&gt;G;p.Leu928Val), LRRC39(c.149_155del;p.Thr50Lysfs*14), MMP21(c.1203G&gt;A;p.Trp401*), MYH11(c.4261G&gt;A;p.Ala1421Thr), NLRP1(c.3691G&gt;A;p.Val1231Ile), NTRK1(c.1331G&gt;A;p.Arg444Gln), NUP214(c.4840A&gt;G;p.Thr1614Ala), NUP214(c.2667A&gt;C;p.Lys889Asn), PDE4DIP(c.2667A&gt;C;p.Lys889Asn),</b><br/> <b>PKD1L2(c.3551G&gt;A;p.Trp1184*), PKHD1(c.9577G&gt;A;p.Val3193Ile), RB1(c.2091C&gt;G;p.Asp697Glu), SIGLEC12(c.1522A&gt;C;p.Lys508Gln), SPNS3(c.319C&gt;T;p.Arg107*), UCMA(c.93delC;p.Met32Cysfs*176), USP35(c.1655C&gt;A;p.Pro552His), ZNF25(c.13C&gt;T;p.Gln5*), ZNF491(c.451C&gt;T;p.Arg151*)</b></p> |
| MJ2037    | 45<br>(40 SNVs / 5 INDELS) | 18<br>(13 SNVs / 5 INDELS) | 3<br>(3 SNVs) | 24<br>(24 SNVs)         |  |
| SM001.021 | 23<br>(18 SNVs / 5 INDELS) | 9<br>(4 SNVs / 5 INDELS)   | 1<br>(1 SNV)  | 13<br>(13 SNVs)         | <p><b>ASPM(c.676C&gt;T;p.Pro226Ser), ASPM(c.6965A&gt;C;p.Tyr2322Ser), C19orf55(c.261G&gt;A;p.Trp87*), C7orf31(c.1375_1379del;p.Asp459Leufs*5), CAS5(c.4457T&gt;C;p.Ile1486Thr), DST(c.4898A&gt;T;p.Asn1633Ile), KL(c.3033C&gt;A;p.Tyr1011*), LIPM(c.711delG;p.Gly238Aspfs*26), MAS1L(c.568delT;p.Ser190Leufs*17), MTRR(c.820C&gt;T;p.Pro274Ser), MUC1(c.76C&gt;G;p.Pro26Ala), MUC1(c.613G&gt;A;p.Gly205Ser), MYH11(c.3396G&gt;C;p.Glu1132Asp), PDGFRB(c.590G&gt;A;p.Arg197Lys), POT1(c.1211G&gt;T;p.Gly404Val), PRIM2(c.910G&gt;T;p.Gly304*), RNF213(c.910G&gt;T;p.Gly304*), SLX4(c.3662C&gt;T;p.Ala1221Val), TLR4(c.842G&gt;A;p.Cys281Tyr),</b><br/> <b>TMPRSS11E(c.666_669del;p.Ile222Metfs*6), TTC33(c.677C&gt;G;p.Ser226*), WDR20(c.1423G&gt;T;p.Gly475Cys), ZNF844(c.1044_1048del;p.Tyr348*)</b></p>  |
| SM001.040 | 45<br>(36 SNVs / 9 INDELS) | 17<br>(7 SNVs / 5 INDELS)  | 7<br>(7 SNVs) | 21<br>(21 SNVs)         | <p><b>ABCA4(c.3285C&gt;A;p.Tyr1095*), ANGPTL3(c.575delA;p.Gln192Argfs*5), APOA5(c.990_993del;p.Asp332Valfs*5), BRCA2(c.9292T&gt;C;p.Tyr3098His), CARD11(c.1742C&gt;T;p.Ala581Val), CIB3(c.556C&gt;T;p.Arg186*), CRYGA(c.295C&gt;T;</b></p>   |

|           |                            |                           |                |                 |   |
|-----------|----------------------------|---------------------------|----------------|-----------------|---|
|           | INDELS)                    | 9 INDELS)                 |                |                 | <p>p.Arg99*),CSF1R(c.1237G&gt;A;p.Gly413Ser),DST(c.3458G&gt;A;p.Ser1153Asn),ERBB2(c.170A&gt;G;p.Gln57Arg),ETS1(c.860G&gt;A;p.Arg287His),EXT2(c.1072C&gt;T;p.Arg358Trp),GPR179(c.6847_6848delCT;p.Leu2283Glyfs*36),IKBK(c.2028G&gt;A;p.Met676Ile),ITGA9(c.2362G&gt;A;p.Val788Met),KIAA1430(c.1217delG;p.Gly406Glyfs*38),LRRC2(c.1114T&gt;G;p.*372Glyext*25),LTK(c.2437G&gt;T;p.Glu813*),MAMDC4(c.3286delC;p.Arg1096Alafs*54),MARK1(c.230C&gt;G;p.Ala77Gly),MDC1(c.2526A&gt;T;p.Arg842Ser),MDC1(c.998C&gt;T;p.Ala333Val),MET(c.1444G&gt;A;p.Asp482Asn),MFS6L(c.1267_1274del;p.Thr423*),MICAL2(c.414delT;p.Gly139Alafs*33),MUC13(c.197C&gt;T;p.Thr66Ile),NTRK1(c.2272G&gt;A;p.Ala758Thr),NTRK1(c.2339G&gt;A;p.Arg780Gln),NUP98(c.5135G&gt;A;p.Arg1712Gln),ODF1(c.463G&gt;A;p.Glu155Lys),PIK3R2(c.1643C&gt;T;p.Ala548Val),PKHD1(c.5125C&gt;T;p.Leu1709Phe),PRIM2(c.910G&gt;T;p.Gly304*),RGS11(c.970G&gt;T;p.Glu324*),SAMD9(c.257C&gt;T;p.Ser86Phe),SEPT9(c.829G&gt;A;p.Gly277Ser),SETMAR(c.80A&gt;C;p.Gln27Pro),SLC5A4(c.1769A&gt;G;p.Asp590Gly),TET2(c.5152G&gt;T;p.Val1718Leu),TICAM2(c.694C&gt;T;p.Gln232*),TMEM159(c.166dupC;p.Leu56Profs*90),TNFRSF10C(c.271delT;p.Cys91Valfs*13),WRN(c.970A&gt;G;p.Thr324Ala),WRN(c.436A&gt;G;p.Lys146Glu),ZNF543(c.203G&gt;A;p.Trp68*)</p>   |
| SM001.049 | 1<br>(1 INDEL)             | 1<br>(1 INDEL)            | 1<br>(1 INDEL) | —               | ATM(c.7000_7003delTACA;p.Tyr2334Glnfs*4)  |
| SM001.068 | 25<br>(20 SNVs / 5 INDELS) | 11<br>(6 SNVs / 5 INDELS) | 3<br>(3 SNVs)  | 11<br>(11 SNVs) | <p>CCL26(c.132G&gt;A;p.Trp44*),CFAP74(c.2214delC;p.Gly739Valfs*33),CFHR5(c.993C&gt;A;p.Cys331*),FRY(c.5137A&gt;G;p.Thr1713Ala),HERC1(c.6693C&gt;G;p.Tyr2231*),IGF2R(c.1987G&gt;T;p.Val663Leu),IGF2R(c.6575A&gt;C;p.Asn2192Thr),KIF24(c.3478_3479delGT;p.Val1160Thrfs*9),LIFR(c.1937C&gt;A;p.Thr646Asn),MLH1(c.1852A&gt;G;p.Lys618Glu),MLH1(c.1853A&gt;C;p.Lys618Thr),NLRP1(c.3518A&gt;G;p.Gln1173Arg),NR3C1(c.1088A&gt;G;p.Asn363Ser),NUP214(c.5017G&gt;C;p.Val1673Leu),PAX7(p.Arg215His c.644G&gt;A),PKHD1(c.9577G&gt;A;p.Val3193Ile),PLEKHH1(c.4042C&gt;T;p.Arg1348*),PTPRD(c.2164G&gt;T;p.Ala722Ser),RSC1A1(c.1601_1604del;p.Asp534Glyfs*36),SPANXN4(c.87_89del;p.Lys29del),SPTBN5(c.3643C&gt;T;p.Arg1215*),TAS2R10(c.912_913delCA;p.Arg305Serfs*),TRAF3IP1(c.713A&gt;G;p.Glu238Gly),WDR31(c.282T&gt;G;p.Asn94Lys),ZNF124(c.633C&gt;A;p.Tyr211*)</p> <p>BCL11B(c.553T&gt;A;p.Cys185Ser),DPP7(c.673C&gt;T;p.Arg225*),DST(c.13760T&gt;G;p.Ile4587Ser),EP300(c.1540A&gt;G;p.Met514Val),ERBB2(c.1157C&gt;A;p.Ala386Asp),EXO1(c.1378G&gt;C;p.Val460Leu),FAM154A(c.1189C&gt;T;p.Arg397*),IRF4(c.541T&gt;C;p.Tyr181His),KRTAP241(c.96delT;p.Thr33Leufs*7),LPHN3(c.3936C&gt;G;p.His1312Gln),MAP3K19(c.1069C&gt;T;p.Arg357*),NCOA1(c.1716A&gt;T;p.Arg572Ser),NOTCH2(c.4922A&gt;C;p.Lys1641Thr),NTRK1(c.14T&gt;A;p.Leu5Gln),SDHD(c.34G&gt;A;p.Gly12Ser),SYNE1(c.22516A&gt;G;p.Ser7506Gly),TBRG4(c.33delC;p.Met12Trpfs*6),VIT(c.702C&gt;G;p.Tyr234*),ZG16B(c.22G&gt;T;p.Glu8*),ZNF544(c.1843C&gt;T;p.Arg615*)</p> |
| SM001.088 | 20<br>(18 SNVs / 2 INDELS) | 8<br>(6 SNVs / 2 INDELS)  | 1<br>(1 SNV)   | 11<br>(11 SNVs) |   |

Estão destacados em negrito os genes cujas variantes não estavam presentes nas amostras controle e, portanto, continuaram na análise. Destes, estão destacados em vermelho os genes cujas variantes *missense* foram classificadas como patogênicas por pelo menos um dos programas de predição consultados, fazendo com que estas fossem mantidas na análise.

#### 4.4 ANÁLISE AMOSTRAS CONTROLE

Utilizamos como grupo controle 25 amostras de mulheres com até 35 anos de idade sem história pessoal ou familiar de câncer colorretal e que não tivessem ascendência asiática e, a partir do mesmo painel utilizado para as pacientes, avaliamos a presença das variantes selecionadas nesta população como forma de excluir potenciais polimorfismos frequentes na nossa população.

Os resultados do sequenciamento para esta análise estão descritos a seguir (Tabela 3). Das 338 variantes totais (considerando repetições), 60 foram descartadas por esta análise (57 SNVs e 3 INDELS), por estarem presentes nos controles, sinalizando que pelo menos um indivíduo dos 25 era portador da variante. De forma mais detalhada, 2 variantes foram descartadas das análises da paciente MJ2013; 3 variantes foram descartadas das pacientes MJ2007/MJ2012, MJ2015 e SM001.068; 4 variantes foram descartadas das pacientes SUBJ1011, MJ2001, MJ2016 e SM001.040; 5 variantes foram descartadas das amostras MJ2003, MJ2014 e SM001.088; 6 variantes foram descartadas das amostras MJ2004, MJ2037 e SM001.021. Uma variante, da paciente SM001.040, cuja cobertura foi insuficiente em todos os pools, também foi descartada, conforme detalhado na Tabela 4.

Esta análise resultou em 277 variantes pertencentes a 220 genes. Os genes selecionados desta etapa foram destacados em negrito na Tabela 2.

**Tabela 3** - Resultados gerais do sequenciamento das amostras controle

|   | Pool 1  | Pool 2  | Pool 3    | Pool 4  | Pool 5    |
|---|---------|---------|-----------|---------|-----------|
| <b>Número total de leituras</b>                     | 806.846 | 925.612 | 1.022.131 | 786.979 | 1.099.404 |
| <b>Porcentagem das leituras nas sequências alvo</b> | 97,79%  | 97,93%  | 97,12%    | 97,76%  | 97,81%    |
| <b>Cobertura média</b>                              | 990,3X  | 1.123X  | 1.211X    | 934,4X  | 1.314X    |

**Tabela 4** - Resultados gerais da filtragem das amostras controles sobre o total de variantes das pacientes

| Pacientes          | Variantes Validadas | Variantes filtradas pelos controles | Total resultante |
|--------------------|---------------------|-------------------------------------|------------------|
| <b>SUBJ1007</b>    | 1                   | -                                   | 1                |
| <b>SUBJ1011</b>    | 19                  | 4                                   | 15               |
| <b>MJ2001</b>      | 16                  | 4                                   | 12               |
| <b>MJ2003</b>      | 20                  | 5                                   | 15               |
| <b>MJ2004</b>      | 27                  | 6                                   | 21               |
| <b>MJ2007/2012</b> | 16                  | 3                                   | 13               |
| <b>MJ2013</b>      | 19                  | 2                                   | 17               |
| <b>MJ2014</b>      | 22                  | 5                                   | 17               |
| <b>MJ2015</b>      | 19                  | 3                                   | 16               |
| <b>MJ2016</b>      | 20                  | 4                                   | 16               |
| <b>MJ2037</b>      | 45                  | 6                                   | 39               |
| <b>SM001.021</b>   | 23                  | 6                                   | 17               |
| <b>SM001.040</b>   | 45                  | 5                                   | 40               |
| <b>SM001.049</b>   | 1                   | -                                   | 1                |
| <b>SM001.068</b>   | 25                  | 3                                   | 22               |
| <b>SM001.088</b>   | 20                  | 5                                   | 15               |

O outro critério utilizado para filtrar as variantes (do tipo SNV), visando aprimorar a seleção das variantes foi a verificação de cada uma das variantes nos programas de predição de patogenicidade SIFT, PROVEAN e Mutation Taster, pelos quais as variantes que fossem categorizadas como



tolerada, neutra e polimorfismo, respectiva e simultaneamente, também fossem descartadas, isto é, as variantes classificadas como patogênicas em pelo menos um dos programas de predição, foram mantidas na análise. Assim, das 277 variantes restantes (considerando repetições), 40 variantes foram descartadas, a saber 2 variantes nas análises das amostras MJ2016, SM001.021 e SM001.068; 3 variantes das amostras MJ2004, MJ2015 e SM001.088; 4 variantes da amostra MJ2013; 5 variantes da amostra MJ2003; 6 variantes da amostra MJ2037 e 10 variantes da amostra SM001.040.

Por fim, esta análise resultou em 237 variantes, pertencentes a 198 genes, listadas no Anexo 7. Esses genes foram destacados em vermelho na Tabela 2.

#### **4.5 ANÁLISE DE CO-SEGREGAÇÃO**

Em 3 famílias distintas das 16 famílias do estudo, as variantes validadas foram avaliadas, de forma concomitante, em uma análise de co-segregação. Nesta etapa do estudo, feita mediante a comparação entre indivíduos afetados e não afetados da mesma família, recrutamos ao todo 7 membros das 3 famílias. Da família da paciente MJ2001 obtivemos 2 amostras de sangue pertencente a mãe (afetada) e uma irmã (não afetada). A mãe foi diagnosticada com câncer de mama aos 39 anos de idade e de sua irmã, atualmente com 48 anos não manifestou a doença (Figura 6).

Da paciente SM001.049, avaliamos o DNA de uma irmã (afetada) que desenvolveu câncer de mama aos 36 anos (Figura 7).

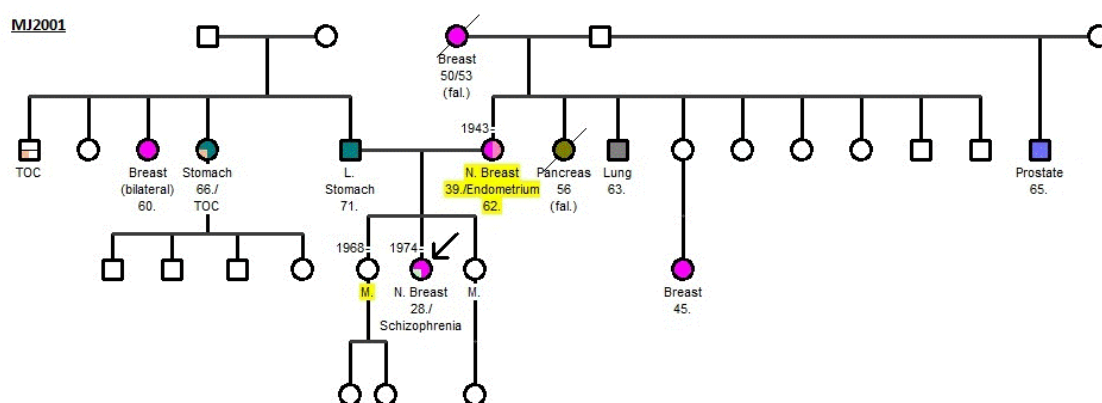
Finalmente das probandas irmãs, MJ2007/MJ2012, avaliamos DNA de 4 membros, mãe e outra irmã (não afetadas), e duas tias paternas (uma afetada e outra não afetada). Vale ressaltar que esta irmã, é irmã gêmea de uma das pacientes, porém não são idênticas (dizigótica) e que a tia paterna afetada foi diagnosticada com câncer de ovário há mais de 10 anos (Figura 8). Considerando os dados do heredograma tem-se a forte impressão de que o fator genético responsável pela predisposição ao câncer seja oriundo do lado paterno da família.

A análise de co-segregação, atentando para os critérios em cada uma das três famílias, resultou em 11 alterações altamente sugestivas de estarem relacionadas com a síndrome familiar, devido a subtração de 14 variantes que foram desconsideradas por não estarem co-segregando, indicando, portanto, que não estejam associadas com a doença. Cabe atentar que uma das variantes analisadas nesta etapa foi uma variante INDEL no gene *ATM*, o qual já foi previamente associado com o câncer de mama, sendo esta análise apenas para confirmar a presença da mesma em outro membro afetado da família.

#### **4.5.1 Família MJ2001**

Da primeira família, além da paciente MJ2001, diagnosticada com câncer de mama aos 28 anos de idade, foi possível coletar amostras de material biológico de dois membros de primeiro grau, da irmã não afetada

com 48 anos de idade atualmente (ainda podendo desenvolver a neoplasia no futuro) e da mãe, afetada aos 39 anos de idade (Figura 6). Deste modo, o critério para confirmação de co-segregação, neste caso, foi a variante presença da variante na mãe afetada, independente da presença ou ausência na irmã não afetada. Portanto, das 12 variantes identificadas nesta família, 8 variantes co-segregam, pelo critério de estarem presentes na mãe, estando 5 destas ausentes na irmã. Estas variantes, nos genes *ATRX*, *C9orf3*, *FANCC*, *HIF1A*, *KRTAP29-1*, *LPAR6*, *TET2* e *ZNF574* estão destacadas em negrito e, juntamente com as demais, estão descritas no Quadro 1. Vale ressaltar que a variante pertencente ao gene *LPAR6* foi identificada também na paciente MJ2015.



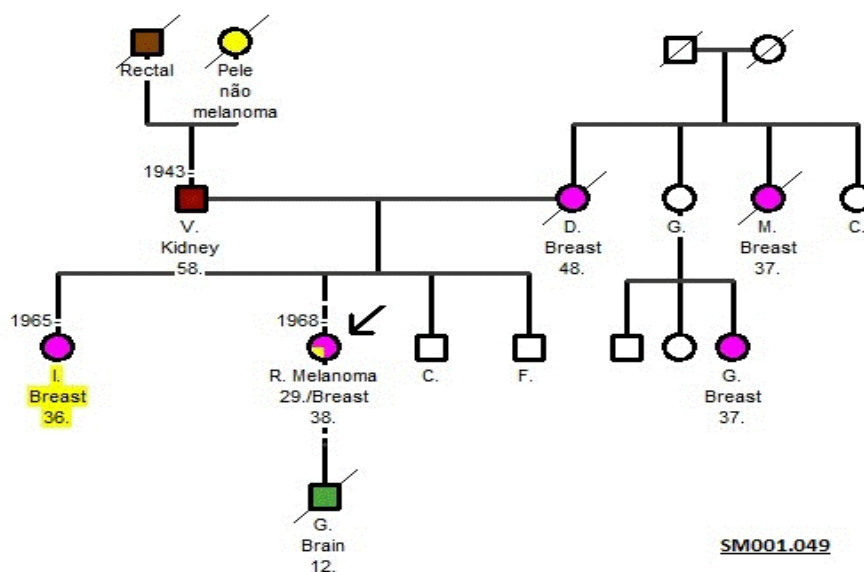
**Figura 6** - Heredograma pertencente à família da paciente MJ2001. A probanda está indicada pela seta e os demais membros participantes estão destacados em amarelo. Cada cor corresponde a um determinado tipo de neoplasia e/ou enfermidade, conforme descrito abaixo de cada indivíduo, juntamente com a idade ao acometimento.

**Quadro 2** - Análise de co-segregação da família da paciente MJ2001

| Família MJ2001   |              |                 |                   |   |  |
|------------------|--------------|-----------------|-------------------|---|--|
| Gene             | Alteração    |                 | Tipo de alteração | Mãe (afetada)<br>Ano de nascimento:<br>1943 | Irmã (não afetada)<br>Ano de nascimento:<br>1968 |
| <i>ATRX</i>      | c.2595C>G    | p.His865Gln     | <i>Missense</i>   | sim   | não  |
| <i>C9orf3</i>    | c.813delT    | p.Val272Trpfs*5 | <i>Frameshift</i> | sim   | não  |
| <i>DNAH1</i>     | c.2241C>A    | p.Tyr747*       | <i>Nonsense</i>   | não   | sim  |
| <i>FANCC</i>     | c.416G>A     | p.Gly139Glu     | <i>Missense</i>   | sim   | não  |
| <i>HIF1A</i>     | c.1957A>G    | p.Ser653Gly     | <i>Missense</i>   | sim   | sim  |
| <i>KRTAP29-1</i> | c.518_531del | p.Pro173Argfs*2 | <i>Frameshift</i> | sim   | sim  |
| <i>LPAR6</i>     | c.921G>T     | p.Trp307Cys     | <i>Missense</i>   | sim   | não  |
| <i>PDGFRB</i>    | c.3287C>T    | p.Ala1096Val    | <i>Missense</i>   | não   | não  |
| <i>PTPN22</i>    | c.1859G>A    | p.Trp620*       | <i>Nonsense</i>   | não   | não  |
| <i>RP1L1</i>     | c.6118G>T    | p.Glu2040*      | <i>Nonsense</i>   | não   | sim  |
| <i>TET2</i>      | c.2429A>G    | p.Gln810Arg     | <i>Missense</i>   | sim   | sim  |
| <i>ZNF574</i>    | c.1831G>A    | p.Glu611Lys     | <i>Missense</i>   | sim   | não  |

#### 4.5.2 Família SM001.049

Nesta família, além da paciente, diagnosticada com câncer de mama aos 38 anos e melanoma aos 29, pudemos coletar material biológico da irmã, também afetada, e que desenvolveu câncer de mama aos 36 anos (Figura 7). Neste caso, cuja única variante analisada foi uma do tipo INDEL no gene *ATM*, foi possível observar que a irmã afetada mostrou-se portadora da mesma mutação, conforme detalhado no Quadro 2, confirmando que mutação de perda de função neste gene está associada com risco de câncer de mama.



**Figura 7** - Heredograma pertencente à família da paciente SM001.049. A probanda está indicada pela seta e a irmã participante está destacada em amarelo. Cada cor corresponde a um determinado tipo de neoplasia e/ou enfermidade, conforme descrito abaixo de cada indivíduo, juntamente com a idade ao acometimento.

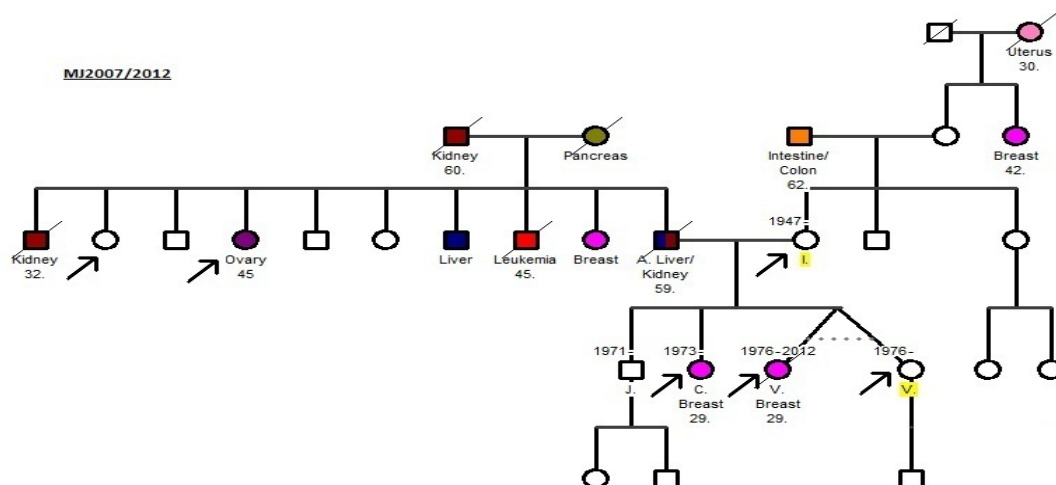
### Quadro 3 - Análise de co-segregação da família da paciente SM001.049

| Família SM001.049 |                    |                  |                   |   |
|-------------------|--------------------|------------------|-------------------|---|
| Gene              | Alteração          |                  | Tipo de alteração | Irmã (afetada)<br>Ano de nascimento: 1965 |
| <i>ATM</i>        | c.7000_7003delTACA | p.Tyr2334Glnfs*4 | Frameshift        | sim                                       |

#### 4.5.3 Família MJ2007/MJ2012

Desta família, da qual foi possível coletar o maior número de membros (de primeiro e segundo grau), coletamos amostra biológica da mãe e de uma irmã das pacientes, nenhuma delas afetadas, e de duas tias paternas, uma afetada e outra não afetada, além das irmãs MJ2007/MJ2012, ambas diagnosticadas com câncer de mama aos 29 anos.

Considerando as análises do heredograma (Figura 8) julgamos que o alelo que carrega a variante genética de risco, responsável pelo desencadeamento da neoplasia hereditária seja de origem paterna. Neste caso, nosso critério de determinação e verificação da variante co-segregam com a doença foi que a mesma esteja presente na tia paterna afetada e ausente em ambas, tia e mãe não afetadas das probandas. Desta forma, das 13 variantes identificadas e avaliadas nesta família, três delas co-segregaram, estando presentes na tia (afetada) e ausentes na mãe e na tia não afetada, sendo as candidatas mais promissoras. Estas, pertencentes aos genes *PTPRD*, *ROS1* e *SLC22A16*, estão destacadas em negrito e descritas no Quadro 3, juntamente com as demais.



**Figura 8** - Heredograma pertencente à família das pacientes MJ2007 e MJ2012. As duas probandas irmãs e as tias participantes do estudo estão indicadas pelas setas. As demais participantes também estão destacadas em amarelo. Cada cor corresponde a um determinado tipo de neoplasia e/ou enfermidade, conforme descrito abaixo de cada indivíduo, juntamente com a idade ao acometimento.

**Quadro 4 - Análise de co-segregação da família das pacientes MJ2007/MJ2012**

| Família MJ2007/2012    |                     |                        |                          |  |   |   |  |
|------------------------|---------------------|------------------------|--------------------------|--|---|---|--|
| Gene                   | Alteração           |                        | Tipo de alteração        | Mãe (não afetada)<br>Ano de nascimento: 1947 | Irmã (não afetada)<br>Ano de nascimento: 1976 | Tia paterna (afetada – câncer de ovário)<br>Ano de nascimento: 1960 | Tia paterna (não afetada)<br>Ano de nascimento: 1955 |
| <i>BRCA1</i>           | c.4963T>C           | P.Ser1655Pro           | <i>Missense</i>          | não  | sim   | sim   | sim  |
| <i>CASC5</i>           | c.43A>G             | p.Ile15Val             | <i>Missense</i>          | não  | sim   | não   | sim  |
| <i>ERBB2</i>           | c.563G>A            | p.Arg188His            | <i>Missense</i>          | não  | sim   | sim   | sim  |
| <i>MAB21L3</i>         | c.739G>T            | p.Glu247*              | <i>Nonsense</i>          | sim  | sim   | não   | não  |
| <i>MET</i>             | c.1451A>G           | p.His484Arg            | <i>Missense</i>          | sim  | sim   | não   | não  |
| <i>PDGFRB</i>          | c.581T>C            | p.Ile194Thr            | <i>Missense</i>          | sim  | sim   | não   | não  |
| <i>POLA1</i>           | c.3908T>C           | p.Met1303Thr           | <i>Missense</i>          | não  | sim   | sim   | sim  |
| <b><i>PTPRD</i></b>    | <b>c.1856C&gt;T</b> | <b>p.Thr619Ile</b>     | <b><i>Missense</i></b>   | <b>não</b>                                   | <b>sim</b>                                    | <b>sim</b>  | <b>não</b>   |
| <b><i>ROS1</i></b>     | <b>c.1108T&gt;C</b> | <b>p.Ser370Pro</b>     | <b><i>Missense</i></b>   | <b>não</b>                                   | <b>sim</b>                                    | <b>sim</b>  | <b>não</b>   |
| <i>ROS1</i>            | c.6733G>A           | p.Gly2245Ser           | <i>Missense</i>          | sim  | sim   | não   | não  |
| <b><i>SLC22A16</i></b> | <b>c.226delG</b>    | <b>p.Ala76Profs*66</b> | <b><i>Frameshift</i></b> | <b>não</b>                                   | <b>sim</b>                                    | <b>sim</b>  | <b>não</b>   |
| <i>SLC5A4</i>          | c.427delG           | p.Val143Serfs*15       | <i>Frameshift</i>        | sim  | sim   | não   | não  |
| <i>UBE2J1</i>          | c.577G>C            | p.Gly193Arg            | <i>Missense</i>          | sim  | sim   | não   | não  |

Em vista disto, identificamos 3 genes mais fortemente candidatos, oriundos da família MJ2007/2012, uma vez que foi possível desempenhar uma análise mais abrangente e criteriosa neste núcleo familiar. As demais análises de co-segregação nos revelaram outros 8 genes que também são promissores, visto que estão presentes em indivíduos afetados da família MJ2001. O gene *ATM*, apesar de ter sido analisado, já havia sido previamente associado a neoplasia.

Alguns destes genes foram encontrados também em outras pacientes deste estudo, apresentando, porém, diferentes variantes (exceto pela variante c.921G>T do gene *LPAR6*, como relatado anteriormente), sendo eles descritos no Quadro 4 abaixo.



**Quadro 5** - Genes da análise de co-segregação presentes nas demais famílias do estudo

| Genes selecionados após a análise de co-segregação | Lista de genes associados com risco de câncer de mama | Lista de genes frequentemente mutados em tumores | Probando analisado | Alteração                               | Classificação ClinVar | dbSNP (MAF - %) | Demais Probandos   | Alteração   | Classificação ClinVar     | dbSNP (MAF - %) |
|--|---|--|--------------------|---|-----------------------|-----------------|--------------------|---|---------------------------|-----------------|
| <b>ATM</b>   | X   |  | SM001.049          | c.7000_7003delTACA;<br>p.Tyr2334Glnfs*4 | Pathogenic            | -               | MJ2003             | c.5558A>T;<br>p.Asp1853Val                            | With likely benign allele | 0,18            |
| <b>ATRX</b>  |   | X  | MJ2001             | c.2595C>G;<br>p.His865Gln               | Benign                | 0,19            | MJ2015             | c.2484G>C;<br>p.Met828Ile                             | -                         | -               |
| <b>C9orf3</b>                                      |   |  | MJ2001             | c.813delT;<br>p.Val272Trpfs*5           | -                     | -               | -                  | -   | -                         | -               |
| <b>FANCC</b>                                       | X   |  | MJ2001             | c.416G>A; p.Gly139Glu                   | Benign                | 1,26            | -                  | -   | -                         | -               |
| <b>HIF1A</b>                                       |   | X  | MJ2001             | c.1957A>G;<br>p.Ser653Gly               | -                     | -               | -                  | -   | -                         | -               |
| <b>KRTAP29-1</b>                                   |   |  | MJ2001             | c.518_531del;<br>p.Pro173Argfs*2        | -                     | 15,83           | -                  | -   | -                         | -               |
| <b>LPAR6</b>                                       | X   |  | MJ2001             | c.921G>T;<br>p.Trp307Cys                | -                     | 0,38            | MJ2015             | c.921G>T;<br>p.Trp307Cys                              | -                         | 0,38            |
| <b>TET2</b>  |   | X  | MJ2001             | c.2429A>G;<br>p.Gln810Arg               | NA                    | 0,22            | MJ2004             | c.3251A>C;<br>p.Gln1084Pro                            | With untested allele      | 0,22            |
| <b>ZNF574</b>                                      |   | X  | MJ2001             | c.1831G>A;<br>p.Glu611Lys               | -                     | -               | -                  | -   | -                         | -               |
| <b>PTPRD</b>                                       |   | X  | MJ2007/MJ2012      | c.1856C>T; p.Thr619Ile                  | -                     | -               | MJ2016 e SM001.068 | c.2164G>T;<br>p.Ala722Ser e c.2164G>T;<br>p.Ala722Ser | -                         | -               |
| <b>ROS1</b>  |   | X  | MJ2007/MJ2012      | c.1108T>C;<br>p.Ser370Pro               | -                     | 0,1             | -                  | -   | -                         | -               |
| <b>SLC22A16</b>                                    |   |  | MJ2007/MJ2012      | c.226delG;<br>p.Ala76Profs*66           | -                     | -               | MJ2013             | c.599C>T;<br>p.Ala200Val                              | -                         | -               |

Para os demais genes, listados no Quadro 5, identificados nas demais pacientes avaliadas, é necessário que análises mais criteriosas sejam conduzidas, a fim de restringir o número de genes candidatos nestes casos.

**Quadro 6 - Genes resultantes do estudo**

|          |          |           |         |          |           |
|----------|----------|-----------|---------|----------|-----------|
| A4GNT    | CD33     | GRM8      | MAMDC4  | OR5H6    | SPTBN5    |
| ABCA4    | CD4      | HERC1     | MAML2   | PARVG    | SUFU      |
| ADAMTS20 | CEACAM20 | HIF1A     | MARK1   | PAX7     | SYNE1     |
| AFF1     | CFHR2    | IGF2R     | MAS1L   | PDE4DIP  | TAS1R1    |
| AKAP9    | CFHR5    | IKBKB     | MCM9    | PKD1L2   | TAS2R10   |
| ANGPTL3  | CHIT1    | IL4       | MET     | PKD2L1   | TAS2R8    |
| ANKRD2   | CIB3     | IL7R      | MFSD6L  | PKHD1    | TBRG4     |
| ANKRD35  | CRYGA    | ITGA10    | MICAL2  | PLEKHG5  | TET2      |
| APC      | CSMD3    | ITGA9     | MLH1    | PLEKHH1  | TICAM2    |
| APOA5    | DMKN     | KAT6A     | MMP21   | PON3     | TMEM159   |
| ARHGAP8  | DNAH7    | KAT6B     | MMP8    | PTPMT1   | TMPRSS11E |
| ARID1B   | DPP7     | KDELC2    | MRE11A  | PTPRD    | TNFRSF10C |
| ASPM     | DST      | KDR       | MTNR1A  | PTPRT    | TOPBP1    |
| ATM      | E2F7     | KIAA1430  | MTOR    | PUS7L    | TPR       |
| ATRX     | EFCAB13  | KIAA1751  | MTRR    | PZP      | TRAF3IP1  |
| AXL      | EFCAB5   | KIF24     | MUC1    | RAF1     | TSC2      |
| BAALC    | EP300    | KL        | MUC13   | RB1      | TSGA10    |
| BARD1    | ERBB2    | KMT2C     | MYH11   | RGS11    | TTC33     |
| BCL11B   | ERCC1    | KMT2D     | MYO1A   | RNF213   | UCMA      |
| BCL9     | ERCC4    | KRT76     | NCOA2   | ROS1     | UTRN      |
| BCO2     | ETS1     | KRTAP24-1 | NF1     | RPE      | VIT       |
| BDH1     | EXT2     | KRTAP29-1 | NLRP1   | RSC1A1   | WDR20     |
| BMPR1A   | FAM20A   | LCN10     | NOSTRIN | SDHD     | WRN       |
| BRCA1    | FAM217A  | LIFR      | NOTCH2  | SEPT9    | XPC       |
| C19orf55 | FANCC    | LIPM      | NRG3    | SH2D2A   | ZG16B     |
| C20orf96 | FLT1     | LPAR6     | NTRK1   | SIGLEC12 | ZNF117    |
| C7orf31  | FN1      | LPHN3     | NUMA1   | SLC22A16 | ZNF124    |
| C9orf3   | FRY      | LPP       | NUP98   | SLC2A8   | ZNF25     |
| CASC5    | GALNT3   | LRRC2     | OAS3    | SLC5A4   | ZNF491    |
| CCDC27   | GCKR     | LRRC39    | OCEL1   | SLX4     | ZNF521    |
| CCL26    | GJB4     | MAATS1    | ODF1    | SPANXN4  | ZNF574    |
| CCR5     | GPR179   | MALT1     | OR52K2  | SPNS3    | ZNF844    |

Estão destacados, entre os genes observados, os mais promissores de estarem associados com a síndrome de câncer de mama e ovário hereditários, visto que estão co-segregando nas famílias analisadas.

## **4 DISCUSSÃO**

### **4.1 IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS GENES**

Segundo a estimativa mundial mais recente, realizada em 2012, esperava-se uma incidência de mais de 1.600.000 casos de câncer de mama, correspondendo a 25% de todos os casos de câncer em mulheres, com uma taxa de mortalidade equivalente a, aproximadamente, 30% deste total, sendo a neoplasia feminina de maior incidência e a segunda mais frequente em toda população, atrás apenas do câncer de pulmão (International Agency for Cancer Research IARC 2013). Considerando que uma parcela significativa das mulheres acometidas por esta neoplasia é formada por portadoras de câncer de mama de caráter hereditário, a correta identificação destas mulheres é indispensável para que estas possam receber um tratamento direcionado, tal como seus familiares possam usufruir de um acompanhamento adequado, a fim de prevenir e/ou tratar possíveis tumores, oferecendo todo suporte necessário. Diferentes genes associados ao câncer de mama hereditário têm sido massivamente investigados por centros de pesquisa ao redor do mundo, a fim de que haja uma melhor compreensão dos casos não relacionados com os principais genes de predisposição envolvidos. No entanto, ainda há muito a ser esclarecido em relação a estes novos genes de predisposição.

De modo geral, como relatado anteriormente, mutações nos genes

*BRCA1* e *BRCA2* retratam cerca de 25% dos casos de câncer de mama hereditário (e em torno de 22,2 a 26% na população brasileira, de acordo com estudos prévios do grupo (CARRARO et al. 2013; SILVA et al. 2014), estando outros 25%, segundo estimativas baseadas em outras populações, relacionados a mutações em outros genes (ou associação destes) de menor penetrância, enquanto o restante permanece obscuro (KEAN 2014). Contudo, mesmo com este cenário, estudos indicam que a existência de outro gene que, quando mutado, possa ser responsável por uma parcela significativa dos casos, tal qual um dos *BRCA*, é improvável. Apesar disto, o conhecimento de outros genes pode auxiliar na compreensão do câncer de mama, de casos até então inconclusivos, possibilitando um melhor posicionamento em relação a prevenção e tratamento dos mesmos (HILBERS et al. 2013a, b; KEAN 2014). Em relação aos genes do *BRCA*, por se tratar de uma herança autossômica dominante, os descendentes de indivíduos afetados possuem 50% de chance de herdar uma mutação nestes genes, da mesma forma, essas mutações podem ser herdadas de indivíduos não afetados na mesma proporção.

Em relação ao rastreamento de mutação dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, os genes mais importantes, tendo em vista que atualmente os núcleos familiares tendem a ser menos numerosos e que aproximadamente 50% das mulheres com mutação nestes genes possuem poucos ou nenhum familiar afetado com câncer de mama ou ovário, cogita-se ampliar a indicação de rastreamento destes genes. Isso pelo fato de o risco de desenvolvimento de câncer em famílias com poucos casos ser tão elevado

quanto o risco em famílias com vários indivíduos afetados (KING et al. 2003).

Da mesma forma, a identificação de outros genes que estejam relacionados ao câncer de mama tornou-se uma incumbência ainda mais desafiadora, visto que há uma restrição na possibilidade de realizar análises de co-segregação que envolvam um grande número de membros de uma mesma família. Porém, apesar desta condição desfavorável, a identificação destes genes é fundamental, tendo por exemplo os benefícios adquiridos com a descoberta das mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

No caso de indivíduos que possuem mutações patogênicas nestes genes, a descoberta dessas variantes de susceptibilidade demonstrou, ao longo dos anos, implicar em um grande impacto na condução clínica de pacientes e familiares, visto que a rápida detecção e a possibilidade de oferecer medidas profiláticas resultam em um aumento significativo das chances de sobrevivência e da expectativa de vida, uma vez que proporcionaram perspectivas para o desenvolvimento de tratamentos específicos e personalizados (MEIJERS-HEIJBOER et al. 2001; FARMER et al. 2005; WARNER et al. 2008).

Por conseguinte, identificar mutações predisponentes em genes associados ao risco de câncer de mama, incluindo os de menor penetrância; e identificar novos genes associados à predisposição ao câncer de mama, são de extrema importância, pois permitirá que o acompanhamento de um maior número de pacientes, possibilitando um acompanhamento mais abrangente. Além disso, a assistência pode ser feita de forma mais precoce

e cuidadosa, propiciando a rápida detecção do tumor, o que garante um tratamento mais eficaz, além de permitir a adoção de medidas profiláticas, tais como mastectomia preventiva, quimioprevenção e ooforectomia. Outro aspecto relevante é que, uma vez constatada a presença desses novos genes de predisposição, os demais familiares com elevado risco de desenvolvimento desta neoplasia também serão beneficiados, pois poderão realizar o teste genético e, assim, utilizar o resultado como uma ferramenta profilática e de redução de riscos, determinando as condutas necessárias para cada caso, através de um atendimento diferenciado e um aconselhamento específico (FARMER et al. 2005; PLEVRITIS et al. 2006; FONG et al. 2009; ROULEAU et al. 2010).

Entretanto, outro desafio, tendo em vista que no presente estudo trabalhamos com sequenciamento completo do exoma, que gera um imenso volume de dados, é identificar, dentre todas as variantes detectadas, as que estão diretamente relacionadas a predisposição ao câncer de mama. Existem bancos de dados, tais como o dbSNP, que descrevem a frequência das alterações em humanos, porém, muitas alterações podem não estar descritas nestes bancos, por serem mais comuns em determinadas populações do que em outras, especialmente no caso da população brasileira que apresenta tamanha diversidade. Desta forma, além de verificar a presença das variantes nos bancos, utilizamos 25 amostras de mulheres sem histórico de câncer, com até 35 anos, semelhante a nossa casuística, a fim de filtrar polimorfismos provavelmente não relacionados com o câncer na nossa população.

## 4.2 GENES MAIS PROMISSORES IDENTIFICADOS NA ANÁLISE DE CO-SEGREGAÇÃO

Neste estudo, identificamos uma mutação patogênica no gene *ATM*, que leva a uma interrupção prematura da proteína (c.7000\_7003delTACA; p.Tyr2334Glnfs\*4 identificada na paciente SM001.049). O *ATM* participa diretamente da via de reparo de quebra de dupla fita do DNA e já é reconhecido como associado a uma maior predisposição ao câncer de mama (ECONOMOPOULOU et al. 2015) com elevação de risco de desenvolvimento em torno de duas vezes ou até cinco vezes em mulheres abaixo dos 50 anos de idade (THOMPSON et al. 2005). Mutação patogênica em *ATM* tem sido identificada em diversos estudos em amostras de pacientes negativas para mutações em um dos *BRCA* e/ou com história familiar positiva. Em 144 amostras de pacientes com câncer de mama e/ou ovário, negativas para essas mutações, HIROTSU et al. (2015) customizaram um painel com 25 genes relacionados com o câncer de mama e identificaram uma mutação deletéria neste gene em uma paciente acometida pela neoplasia de mama aos 43 anos, com três familiares, de segundo e terceiro grau, também afetados. Em outro estudo, com 488 amostras de pacientes com câncer de mama, utilizando, similarmente, um painel de 25 genes associados a esta neoplasia (incluindo *BRCA1* e *BRCA2*), TUNG et al. (2016) identificaram 21 mutações deletérias em 6 genes distintos, excluindo os *BRCA*, sendo 4 delas no gene *ATM*. Destas, uma mutação foi identificada, de forma concomitante, em uma paciente com



*BRCA2* mutado e outra mutação em uma paciente com mutação em *CHEK2*. De forma semelhante, em um estudo realizado pelo grupo, a deleção do quarto éxon do gene *ATM* foi observada, através da técnica de hibridização genômica comparativa (do inglês, comparative genomic hybridization – CGH), em uma paciente portadora de uma mutação patogênica no gene *BRCA2* (SILVA et al. 2014).

O gene *BARD1*, também identificado no nosso estudo, na paciente SUBJ1007, apresentando uma alteração *frameshift* (c.2215dupT; p.Tyr739Leufs\*2), já foi caracterizado como associado com uma maior predisposição ao câncer de mama (DE BRAKELEER et al. 2010; SABATIER et al. 2010). Este gene atua no processo de iniciação da apoptose (IRMINGER-FINGER e LEUNG 2002; JEFFORD et al. 2004; RODRIGUEZ et al. 2004) e, juntamente com o *BRCA1*, no reparo a quebra de dupla fita do DNA (WU et al. 1996; MEZA et al. 1999) e, apesar da estreita relação e atuação entre estes genes, o *BARD1* tem sido considerado um supressor de tumor independente do *BRCA1* (GONZALEZ-HORMAZABAL et al. 2012). Variante mais analisada neste gene em casos de câncer de mama, a mutação c.1670G>C; Cys557Ser, foi identificada em amostras de indivíduos finlandeses (KARPPINEN et al. 2004, 2006), italianos (GHIMENTI et al. 2002) e islandeses (STACEY et al. 2006), porém, em um estudo realizado no Chile, primeiro a analisar a mutação na América do Sul, esta variante foi detectada em baixa frequência em amostras de câncer de mama negativas para mutações patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (GONZALEZ-HORMAZABAL et al. 2012). Entretanto, outras variantes deste gene também

foram associadas com o aumento de risco de desenvolvimento de câncer de mama. Em um estudo polonês, RATAJSKA et al. (2012) buscaram mutações germinativas no gene *BARD1* em 109 amostras de pacientes com câncer de mama e que haviam sido previamente testadas para mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Foram identificadas, a partir destas análises, 10 variantes nos éxons, duas delas reportadas pela primeira vez. Destas, uma mutação era *nonsense* (que leva a inserção de um códon de parada prematuro) e co-segregava na família analisada, sendo interpretada pelos autores como possivelmente deletéria, baseado na análise de co-segregação, na localização da mutação no gene e pela ausência nos controles. Até o presente momento, pelo nosso conhecimento, a mutação identificada em nosso estudo é a primeira relatada neste gene na população brasileira.

O gene *FANCC*, mutado na paciente MJ2001 (c.416G>A; p.Gly139Glu), é um grupo complementar que participa da via denominada Fanconi Anemia (FA), pertencente a via de reparo do DNA (BUCHWALD 1995; JOENJE et al. 2000). Este gene é altamente relacionado com a anemia fanconi, que por sua vez predispõe ao desenvolvimento da leucemia e de tumores sólidos (FANCONI 1967; GORDON-SMITH e RUTHERFORD 1991). Neste caso, as alterações associadas com a anemia são mutações que levam a inserção de um códon de parada prematuro e/ou alteram a matriz de leitura (GIBSON et al. 1993; MURER-ORLANDO et al. 1993; VERLANDER et al. 1994; DE VRIES et al. 2012), alterações em sítio de *splice* (WHITNEY et al. 1993) e *missense* (STRATHDEE et al. 1992). Alguns trabalhos correlacionam este gene com a susceptibilidade ao câncer de

mama, visto que, no processo de reparo ao DNA, quando ocorre algum dano ao mesmo, o complexo formado por genes da via FA e a via do *BRCA* se unem (GARCIA-HIGUERA et al. 2001; D'ANDREA e GROMPE 2003). Assim, THOMPSON et al. (2012) utilizaram amostras de 15 famílias de alto risco, sem mutação em *BRCA1* e *BRCA2*, e que foram submetidas ao sequenciamento completo do exoma, para identificação outros genes candidatos. Em 2 famílias foram identificadas mutações *nonsense* neste gene. Posteriormente, em grupos maiores de amostras (nem todas avaliadas para *BRCA1* e *BRCA2*), apenas os genes candidatos foram avaliados, confirmando a presença de outras mutações [uma *frameshift* e uma *missense* (c.1661T>C; p.Leu554Pro) sabidamente patogênica (GAVISH et al. 1993)] neste gene. Segundo os autores, estes resultados e sua atuação no processo de recombinação homóloga (WANG 2007) sugerem que este gene seja um forte candidato.

A maior parte dos genes mais recentemente identificados e que estão relacionados com o câncer de mama codifica proteínas envolvidas no processo de reparo de danos ao DNA, particularmente na via de reparo de quebra de dupla fita (KEAN 2014). Entretanto, há entre os novos genes identificados, genes cujas proteínas não estão propriamente relacionadas com esse processo, como o *CDHI*, *NFI* ou *PTEN*, sugerindo que genes que não fazem parte da via de reparo também podem estar associados a uma maior predisposição ao câncer de mama (RIPPERGER et al. 2009), como também foi observado pelos resultados obtidos através deste estudo.

Do nosso estudo, os genes *ATM*, *BARD1* e *FANCC*, detalhados

anteriormente, são os únicos participantes da via de reparo do DNA e sobre os quais existem evidências concretas da associação destes com o risco de desenvolvimento de câncer de mama (em casos de mutações que levam a perda de função da proteína codificada). No tocante aos demais genes, até o presente momento, não há fortes registros na literatura sobre a correlação direta destes com a neoplasia, havendo, porém, para a maior parte deles, relatos sobre a relação com outros tipos de tumor.

O gene *ATRX*, mutado na paciente MJ2001 (c.2595C>G; p.His865Gln) e cuja função não foi completamente elucidada ainda, é altamente associado com a talassemia alfa (GIBBONS et al. 1995; 2003; XUE et al. 2003) entretanto, também foi correlacionado com casos de leiomiossarcoma, que apresentam pior prognóstico e sobrevida quando há mutação neste gene, tendo sido identificadas mutações do tipo *missense*, *nonsense* e *frameshift*. Os tumores, neste caso, segundo estudos, apresentam uma menor taxa de diferenciação e presença de necrose (YANG et al. 2015). Em um estudo que incluía amostras de pais e de seus descendentes diagnosticados com tumores de partes moles, os leiomiossarcomas foram associados com um histórico materno de câncer de mama (JI et al. 2008). Da mesma forma, este gene também foi associado a outros tipos de tumores, especialmente do sistema nervoso central, como os gliomas (KANNAN et al. 2012; HABERLER E WÖHRER 2014).

As informações a respeito da função do gene *C9orf3* [que apresenta a mutação deletéria (c.813delT; p.Val272Trpfs\*5) na paciente MJ2001] são escassas e existem poucos relatos na literatura a seu respeito,

especialmente relacionados a câncer. A maior parte das informações sobre a correlação de mutações neste gene é com a síndrome do ovário policístico (CUI et al. 2015; XU et al. 2015), caracterizada por ser a endocrinopatia mais frequente entre as mulheres, acometendo especialmente aquelas em idade fértil. Esta enfermidade apresenta três características principais que são a anovulação, morfologia ovariana policística e hiperandrogenismo (VINK et al. 2006), sendo que a última demonstrou associação com o gene *C9orf3*, podendo indicar que este desempenha um papel importante no desenvolvimento da síndrome (CUI et al. 2015). Além disso, acredita-se que alterações neste gene podem ocasionar irregularidades no sistema renina-angiotensina que, por sua vez, poderiam levar ao desencadeamento da patogenicidade da síndrome do ovário policístico (XU et al. 2015). Por sua vez, a síndrome do ovário policístico amplia a susceptibilidade ao câncer endometrial, como confirmado pelo estudo meta-analítico de BARRY et al. (2014), porém, neste mesmo trabalho, não foi observado aumento significativo de risco nos casos de câncer de mama e ovário.

O gene *HIF1A*, também mutado na paciente MJ2001 (c.1957A>G; p.Ser653Gly), juntamente com o *HIF1B*, forma o complexo HIF1 (fator de indução a hipóxia) (O'DONNELL et al. 2006). Este complexo controla, tanto nos tecidos normais quanto nos tumorais, a resposta ao estado de hipóxia, fazendo com que a célula sobreviva e possa se adaptar a condições adversas, além de regular a homeostase de oxigênio. Sob essas condições, coordena o processo de regulação de mais de 100 genes responsáveis por diferentes e primordiais funções celulares, tais como proliferação,

eritropoiese, angiogenese, metástase e apoptose, que permitem a melhor adaptação a hipóxia (SEMENZA 2003; KE e COSTA 2006). Em diferentes estudos, a subunidade HIF1A tem sido relacionada, em diferentes tipos de câncer, a uma maior agressividade dos tumores e maior taxa de mortalidade (ZHONG et al. 1999; HARRIS 2002). Esse pior prognóstico associado ao gene foi observado, inclusive, em carcinomas neuroendócrinos de mama (MARTON et al. 2012), sugerindo que este pode ser considerado um novo candidato a marcador prognóstico (GUO et al. 2015).

Dentro da família de receptores dos ácidos lisofosfáticos, o gene *LPAR6* foi o último a ser detectado, havendo, ainda, pouco conhecimento a respeito da sua atuação e relevância em doenças como o câncer, tendo sido relacionado a casos hereditários de hipotricose (condição vinculada à alopecia, caracterizada pela ausência acentuada de pelos e/ou cabelos) e de *wolly hair* (variante anormal do cabelo) (PASTERNAK et al. 2008; SHIMOMURA et al. 2008). Em âmbito oncológico, apesar de pouco explorado, o gene *LPAR6*, mutado na paciente MJ2001 (c.921G>T; p.Trp307Cys), foi caracterizado como potencial biomarcador de predição para casos de carcinoma hepatocelular, mostrando atuação importante no desempenho das características tumorigênicas das células neoplásicas (MAZZOCCA et al. 2015).

Membro da família de genes TET, juntamente com outras duas subunidades, o gene *TET2* [que apresenta a mutação *missense* (c.2429A>G; p.Gln810Arg) na paciente MJ2001] foi correlacionado principalmente com doenças hematológicas, incluindo leucemias

mielomonocítica e mielóide aguda (ABDEL-WAHAB et al. 2009; CHUNG et al. 2012). Entretanto, em menor proporção, mutações neste gene foram detectadas em outros tipos de câncer, tais como próstata, câncer colorretal e carcinoma de células renais (SESHAGIRI et al. 2012; NICKERSON et al. 2013; SATO et al. 2013). YANG et al. (2015) desenvolveram um estudo para avaliação das três proteínas família TET em amostras de câncer de mama em estágios iniciais, porém obtiveram resultados estatisticamente significativos somente para os genes *TET1* e *TET3*, sugerindo apenas que o gene *TET2* pode estar relacionado com o prognóstico da paciente.

Ainda há poucos registros a respeito do gene *ZNF574*, também mutado na paciente MJ2001 (c.1831G>A; p.Glu611Lys), bem como sobre sua função, porém, em um estudo, BERG et al. (2010) compararam dois grupos de pacientes com câncer colorretal, um em idade precoce (média de 44 anos) e outro cujo desenvolvimento ocorreu em idade mais tardia (média de 79 anos), a fim de identificar as diferenças genômicas existentes nos tumores entre os dois grupos provenientes dos mesmos hospitais noruegueses. De uma lista de 107 genes detectados inicialmente e após análise da variação do número de cópias (do inglês, *copy number variation* – CNV) e da expressão do mRNA, sete apresentaram diferenças significativas nos casos de câncer em idade precoce em relação aos demais, entre eles o *ZNF574*, cuja expressão mostrou-se elevada. A partir destes resultados, os autores concluíram que estes sete genes são potenciais candidatos à predisposição ao câncer colorretal precoce.

Não há registros suficientes na literatura a respeito do gene

*KRTAP29-1*, mutado na paciente MJ2001 (c.518\_531del; p.Pro173Argfs\*2), nem mesmo relacionando-o a outras enfermidades, estando apenas descrito que este gene faz parte da família de proteínas associadas de queratina (HUGO Gene Nomenclature Committee HGNC 2016).

Primeiro gene da análise de co-segregação da família das pacientes MJ2007 e MJ2012, o *PTPRD* (que apresenta a variante c.1856C>T; p.Thr619Ile) pertence a uma família de receptores de tirosina fosfatase, da qual vários membros estão envolvidos no processo de tumorigênese (OSTMAN et al. 2006). Especificamente, o gene *PTPRD* atua na supressão da migração e no processo de adesão celular (FUNATO et al. 2011), sendo considerado um supressor tumoral (VEERIAH et al. 2009), estando expresso em tecidos normais em órgãos como cérebro, mama e cólon, enquanto outras subunidades da família estão envolvidas no crescimento celular e/ou na apoptose (CHAN et al. 2008). Em um estudo baseado em análises genômicas e epigenéticas em amostras de câncer de mama e cólon, CHAN et al. (2008) identificaram, a partir de uma lista de 189 genes candidatos à predisposição ao câncer, 18 genes (8 deles comuns aos dois tipos de neoplasias) que apresentaram diferenças de expressão e/ou atuação entre os tecidos normal e tumoral, incluindo o *PTPRD*. Além disso, alterações neste gene também foram associadas a casos de glioma e câncer de pulmão (VEERIAH et al. 2009). Deleções neste gene também foram observadas em tecidos de carcinoma hepatocelular, favorecendo o desenvolvimento do fenótipo neoplásico nos hepatócitos (NALESNIK et al. 2012).



O oncogene *ROS1* BIRCHMEIER et al. (1990), mutado nas pacientes MJ2007 e MJ2012, foi identificado, com a mesma mutação *missense* (c.1108T>C; p.Ser370Pro), em casos de câncer colorretal. Neste estudo, realizado por TANSKANEN et al. (2015), foram utilizadas 22 amostras de indivíduos não síndrômicos acometidos pela neoplasia em idade jovem (abaixo de 40 anos), sendo todos finlandeses (que, diferentemente da população brasileira, é reconhecida como uma população geneticamente homogênea), a fim de identificar variantes raras na população em questão. Como controle, foram utilizadas 95 amostras de casos de câncer colorretal familiar. Assim como no nosso estudo, como critério de seleção das variantes, das alterações do tipo *missense*, apenas as não sinônimas foram selecionadas para o sequenciamento do exoma. A variante encontrada neste gene foi identificada em apenas um indivíduo com câncer colorretal em idade jovem em homozigose. Desta forma, os autores concluíram que não seria possível afirmar que esta variante *missense* em homozigose predispõe ao câncer, visto que este é um oncogene dominante (RIKOVA et al. 2007), entretanto é uma hipótese que não deve ser descartada. Em outro estudo, realizado em 2008, verificou-se que a expressão de *ROS1* em fibroadenomas (tumor mamário benigno mais comum) era superior à de tecidos normais da mama, bem como este gene poderia estar expresso tanto em tumores benignos quanto malignos (EOM et al. 2008), podendo atuar na tumorigênese de ambos, estando, presumivelmente, associado com o desenvolvimento das neoplasias malignas (EOM et al. 2013). Em tecidos normais, também encontra-se expresso em outras topografias, tais como

pulmão, epidídimo, coração e fígado, porém, majoritariamente nos rins e no trato gastrointestinal (CHEN et al. 1994; EOM et al. 2008; ACQUAVIVA et al. 2009). Sabe-se, também, que a ROS1 faz parte do grupo dos receptores de tirosina quinase, juntamente com 58 outras proteínas (BLUME-JENSEN e HUNTER 2001), tendo sido descrita primeiramente em glioblastomas (BIRCHMEIER et al. 1987), apesar do gene não ser expresso em tecidos normais do cérebro (BIRCHMEIER et al. 1990). Mutações neste gene foram detectadas em linhagens celulares de carcinomas renais e de cólon (RUHE et al. 2007), enquanto rearranjos e fusões genômicas foram identificados em alguns tumores, tais como câncer de pulmão não pequenas células, adenocarcinoma gástrico e câncer colorretal (RIMKUNAS et al. 2012; LEE et al. 2013; AISNER et al. 2014).

Último gene detectado na análise de co-segregação das pacientes MJ2007 e MJ2012, o *SLC22A16* (que apresenta a mutação c.226delG; p.Ala76Profs\*66), também denominado CT2 (transportador de cartinina), mostrou-se expresso em tecidos normais dos testículos (ENOMOTO et al. 2002), rins (KOEPSELL 2013) e em células hematopoiéticas (GONG et al. 2002). Verificou-se a expressão do mesmo em células tumorais do cólon, do fígado (OTA et al. 2007) e, em um estudo realizado por SATO et al. (2007), observou-se a expressão de *SLC22A16* em 48% das 124 amostras teciduais de neoplasia de endométrio (do tipo endometrióide), sugerindo, pelas análises, que este gene atua no processo de diferenciação do tumor de maneira distinta à atuação da progesterona. A expressão deste gene também foi observada em adenomas benignos e carcinomas epiteliais de

ovário, estando mais expressa nos adenocarcinomas (OTA et al. 2007), além de uma superexpressão em casos de leucemia mielóide aguda, indicando ser um novo potencial alvo terapêutico, visto que redução da expressão do mesmo implica em uma diminuição da proliferação destas células malignas (WU et al. 2015).

Vale ressaltar que, especialmente no caso desta família (MJ2007/MJ2012), tendo em vista que estamos trabalhando com variantes genéticas de risco de desenvolvimento de câncer de mama, com os critérios que utilizamos para a determinação das variantes (estar presente na tia afetada e ausente na mãe e tia não afetadas) talvez estejamos perdendo alguma variante importante, que pode estar, por exemplo, na tia não afetada, não tendo ainda manifestado a doença, porém priorizamos aquelas que se mostraram mais robustas e incontestáveis no decorrer da análise. A variante *missense* no gene *BRCA1* (c.4963T>C; p.Ser1655Pro) presente também na tia não afetada, por exemplo, corrobora com os critérios utilizados pela nossa análise, visto que, até o presente momento, não foi relatada nos bancos de dados ClinVar, BIC ou LOVD IARC, sendo sugestivo que esta seja uma alteração benigna.

Por conseguinte, com base nos dados destes três genes (*PTPRD*, *ROS1* e *SLC22A16*) e através da observação do heredograma, julgando que o fator predisponente seja proveniente do lado paterno das pacientes, percebe-se que estes genes já foram relacionados com diferentes neoplasias, pelas quais outros membros da família também foram acometidos, tais como hepatocarcinoma, leucemia e carcinoma de ovário,

corroborando com a evidência de que pelo menos um destes genes seja determinante para o desencadeamento destes tumores.

Em grande parte dos trabalhos citados anteriormente e em tantos outros não citados, outros genes, além dos mencionados e descritos por este estudo, foram identificados como genes candidatos ao aumento da predisposição ao câncer de mama ou associados a esta neoplasia, corroborando com a existência de uma grande variabilidade genética, fazendo com que alterações em determinados genes sejam mais incidentes em determinadas populações do que em outras.

### 4.3 TÉCNICAS DE SEQUENCIAMENTO

Em relação as técnicas de NGS utilizadas no presente estudo para avaliação genômica das pacientes, o sequenciamento completo do exoma, e o sequenciamento alvo, usado em painéis de genes, têm sido amplamente empregados, particularmente, na pesquisa e diagnóstico clínico envolvendo síndromes hereditárias e de padrão mendeliano. Ambos compartilham o mesmo propósito: detectar alterações que estejam associadas diretamente à neoplasia observada em regiões específicas do genoma. O primeiro é um método que possibilita a determinação ampla das sequências dos genes codificadores de proteína (representa aproximadamente 2%), sendo, portanto, uma ferramenta determinante para a identificação de novos genes, bem como de mutações responsáveis pela susceptibilidade e desenvolvimento de determinadas neoplasias e outras enfermidades raras com padrão de herança mendeliana (BAMSHAD et al. 2011; YANG et al. 2013; XUE et al. 2015), sendo considerada uma ferramenta de melhor custo-benefício e com menor exigência analítica do que o sequenciamento do genoma inteiro.

Das duas plataformas utilizadas para o sequenciamento completo do exoma, cujos resultados gerados originaram o presente estudo, o sequenciador SOLiD™5500XL, que demonstra um rendimento elevado, apesar de demandar muito tempo e ler poucos pares de base por vez, em comparação com outras plataformas, inclusive com o Ion Proton, é o que apresenta a menor taxa de erro, sendo o seu erro mais comum os casos de

substituição, além de casos de regiões ricas em –AT que podem ser subestimadas (HARISMENDY et al. 2009; XUAN et al. 2013). O Ion Proton, apesar de não gerar tantos dados, o faz em um curto espaço de tempo, por um custo menor e lê um número maior de pares de base por vez, fazendo com que sua leitura seja mais extensa, sendo ideal para sequenciamento de genomas pequenos, validação e detecção de SNP (*single nucleotide polymorphisms*) (XUAN et al. 2013). Apresenta, porém, desempenho deficiente na detecção de alterações no tipo INDEL (ZHANG et al. 2015), o que pôde ser observado, da mesma forma, nos nossos resultados, pois na amostra da paciente SM001.040, sequenciada apenas pelo Proton, a taxa de validação foi a mais baixa (64,29%), dado que apenas 32,14% (9/28) das alterações do tipo INDEL foram validadas. Em contrapartida, nas amostras sequenciadas apenas pela plataforma SOLiD, a taxa de validação desse tipo de mutação foi de 95,45% (21/22), semelhante ao percentual de validação nas amostras sequenciadas por ambas plataformas, que foi de 93,75% (15/16).

Contudo, mesmo nos casos de alterações do tipo SNV, que apresentaram melhores resultados, a taxa de validação dos dados gerados pelo SOLiD foi superior à taxa correspondente do Proton, com percentuais de 93,03% (187/201) e 85,71% (36/42), respectivamente, atingindo um patamar de 98,6% (70/71) de validação nas amostras sequenciadas pelas duas plataformas.

Já o sequenciamento alvo (*targeted sequencing*), empregado neste estudo para a validação das variantes incluídas no painel customizado,

através da tecnologia de sequenciamento maciço ou em larga escala, permite que conjuntos de genes de interesse sejam sequenciados em um único teste, não apenas os genes altamente associados a determinadas síndromes são analisados, porém genes de menor prevalência também podem ser incluídos para o rastreamento de pacientes na investigação dessas desordens, tal qual o câncer de mama hereditário (REHM 2013; DESMOND et al. 2015; EASTON et al. 2015; ZENTNER et al. 2015). Esta técnica apresenta também melhoria em relação à capacidade de cobertura dos genes de interesse e maior objetividade, em comparação ao sequenciamento do exoma (REHM 2013; XUAN et al. 2013).

Painéis multigênicos têm sido cada vez mais utilizados e empregados na prática clínica para avaliação de genes de susceptibilidade a vários tipos de câncer (EASTON et al. 2015) e, tendo em vista que estes incluem genes de menor penetrância, além dos genes já relacionados com determinado tipo de câncer de forma bem estabelecida, é fundamental que haja uma interpretação apropriada dos resultados, para que o acompanhamento dos pacientes e familiares seja feito de forma adequada. Este tem sido um grande desafio no manejo destes casos (TUNG et al. 2016). Em relação ao câncer de mama, o sequenciamento de painéis gênicos, de acordo com o NCCN, é mais eficiente e apresenta melhor custo para avaliação de pacientes com alto risco de desenvolvimento (DALY et al. 2014). Além disso, o uso de painéis aumenta a taxa de detecção quando comparado com o rastreamento apenas dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, sem que haja diferenças entre etnias e/ou populações neste aspecto (LIN et al. 2016).

## 6 CONCLUSÃO

- A partir dos dados de sequenciamento e através de critérios estridentes de seleção, foram selecionadas 380 variantes promissoras para a confecção de um painel customizado e validação pela técnica de sequenciamento alvo (*targeted sequencing*), resultando em 338 variantes validadas que corresponde a um alta taxa de validação (88,94%).
- A partir da utilização de um grupo de 25 amostras de mulheres sem câncer, foi possível descartar 61 variantes das 338 totais.
- Em famílias distintas, realizamos a análise de co-segregação de 25 variantes, chegando a um total de 11 alterações potencialmente candidatas em 11 genes (*ATRX, C9orf3, FANCC, HIF1A, KRTAP29-1, LPAR6, PTPRD, ROS1, SLC22A16, TET2, ZNF574*).
- Dos 11 genes identificados na análise de co-segregação, os genes *PTPRD, ROS1* e *SLC22A16* são os candidatos mais robustos e promissores a estarem associados com risco de desenvolvimento de câncer de mama.
- Esse trabalho gerou os primeiros genes candidatos que podem, no futuro, contribuir com a geração de um painel de genes de susceptibilidade ao câncer de mama, que apresente elevado nível de sensibilidade e seja adaptado à realidade da nossa população, com o intuito de aperfeiçoar o rastreamento de pacientes de alto risco.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, et al. Genetic characterization of *TET1*, *TET2*, and *TET3* alterations in myeloid malignancies. **Blood** 2009; 114:144-7.

Acquaviva J, Wong R, Charest A. The multifaceted roles of the receptor tyrosine kinase ROS in development and cancer. **Biochim Biophys Acta** 2009; 1795:37-52.

Aisner DL, Nguyen TT, Paskulin DD, et al. *ROS1* and *ALK* fusions in colorectal cancer, with evidence of intratumoral heterogeneity for molecular drivers. **Mol Cancer Res** 2014; 12:111-8.

Aloraifi F, McDevitt T, Martiniano R, et al. Detection of novel germline mutations for breast cancer in non-*BRCA1/2* families. **FEBS J** 2015; 282:3424-37.

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, Pharoah PD, McMullan G, Day NE, Ponder BA, Easton D. Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to *BRCA1* and *BRCA2* in a population-based study. **Genet Epidemiol** 2001; 21:1-18.

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.

Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. **Nat Rev Genet** 2011; 12:745-55.

Barry JA, Azizia MM, Hardiman PJ. Risk of endometrial, ovarian and breast cancer in women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **Hum Reprod Update** 2014; 20:748-58.

Bartek J, Falck J, Lukas J. Chk2 Kinase a Busy Messenger. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2001; 2:877-86.

Berg M, Agesen TH, Thiis-Evensen E, et al. Distinct high resolution genome profiles of early onset and late onset colorectal cancer integrated with gene expression data identify candidate susceptibility loci. **Mol Cancer** 2010; 9:100.

Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, Birnbaum D. How basal are triple-negative breast cancers? **Int J Cancer** 2008; 123:236-40.

Bevers TB, Anderson BO, Bonaccio E, et al. NCCN clinical practice guidelines in oncology: breast cancer screening and diagnosis. **J Natl Compr Canc Netw** 2009; 7:1060-96.

Birchmeier C, Sharma S, Wigler M. Expression and rearrangement of the *ROS1* gene in human glioblastoma cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1987; 84:9270-4.

Birchmeier C, O'Neill K, Riggs M, Wigler M. Characterization of *ROS1* cDNA from a human glioblastoma cell line. **Proc Natl Acad Sci USA** 1990; 87:4799-803.

Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. **Nature** 2001; 411:355-65.

Brekelmans CT, Tilanus-Linthorst MM, Seynaeve C, et al. Tumour characteristics, survival and prognostic factors of hereditary breast cancer from *BRCA2*-, *BRCA1*- and non-*BRCA1/2* families as compared to sporadic breast cancer cases. **Eur J Cancer** 2007; 43:867-76.

Bubien V, Bonnet F, Brouste V, et al. High cumulative risks of cancer in patients with *PTEN* hamartoma tumour syndrome. **J Med Genet** 2013; 50:255-63.

Buchwald M. Complementation groups: one or more per gene? **Nat Genet** 1995; 11:228-330.

Buisson R, Masson JY. *PALB2* self-interaction controls homologous recombination. **Nucleic Acids Res** 2012; 40:10312-23.

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.

Canello G, Maisonneuve P, Rotmensz N, et al. Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer. **Ann Oncol** 2010; 21:1974-81.

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; 8:7-9.

Carreño MSR, Peixoto S, Giglio A. Reposição hormonal e câncer de mama. **Rev Soc Bras Cancerol** 1999; 7:41-50.

Chan TA, Glockner S, Yi JM, et al. Convergence of mutation and epigenetic alterations identifies common genes in cancer that predict for poor prognosis. **PLoS Med** 2008; 5:e114.

Chappuis PO, Nethercot V, Foulkes WD. Clinico-pathological characteristics of *BRCA1*- and *BRCA2*-related breast cancer. **Semin Surg Oncol** 2000; 18:287-95.

Chen J, Zong CS, Wang LH. Tissue and epithelial cell-specific expression of chicken proto-oncogene *c-ros* in several organs suggests that it may play roles in their development and mature functions. **Oncogene** 1994; 9:773-80.

Chen JJ, Silver D, Cantor S, Livingston DM, Scully R. *BRCA1*, *BRCA2*, and *Rad51* operate in a common DNA damage response pathway. **Cancer Res** 1999; 59:1752s-1756s.

Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of *BRCA1* and *BRCA2* penetrance. **J Clin Oncol** 2007; 25:1329-33.

Chung YR, Schatoff E, Abdel-Wahab O. Epigenetic alterations in hematopoietic malignancies. **Int J Hematol** 2012; 96:413-27.

Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. **Bioinformatics** 2015; 31:2745-7.

Colditz GA, Baer HJ, Tamimi RM. Breast cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni JF, editors. **Cancer Epidemiology and Prevention**. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 2006.

Connolly J, Kempson R, LiVolsi V, Page D, Patchefsky A, Silverberg S. **Recommendations for the reporting of breast carcinoma**. Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology; 2004

Cotran R, Kumar V, Robbins S. **Patologia estrutural e funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. Neoplasia; p.213-68.

Cui L, Li G, Zhong W, et al. Polycystic ovary syndrome susceptibility single nucleotide polymorphisms in women with a single PCOS clinical feature. **Hum Reprod** 2015; 30:732-6.

Custódio G, Parise GA, Kiesel Filho N, et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the *TP53* R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. **J Clin Oncol** 2013; 31:2619-26.

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

Da Silva L, Lakhani SR. Pathology of hereditary breast cancer. **Mod Pathol** 2010; 23 Suppl 2:S46-51.

Daly MB, Pilarski R, Axilbund JE, et al. Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian, version 1.2014. **J Natl Compr Canc Netw** 2014; 12:1326-38.

De Brakeleer S, De Grève J, Loris R, et al. Cancer predisposing missense and protein truncating *BARD1* mutations in non-*BRCA1* or *BRCA2* breast cancer families. **Hum Mutat** 2010; 31:E1175-85.

De Vries Y, Lwiwski N, Levitus M, et al. A Dutch Fanconi Anemia *FANCC* Founder Mutation in Canadian Manitoba Mennonites. **Anemia** 2012; 2012:865170.

Deng CX, Brodie SG. Knockout mouse models and mammary tumorigenesis. **Semin Cancer Biol** 2001; 11:387-94.

Deng CX. *BRCA1*: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. **Nucleic Acids Res** 2006; 34:1416-26.

Derheimer FA, Kastan MB. Multiple roles in monitoring and maintaining DNA integrity. **FEBS Lett** 2010; 584:3675-81.

Desmond A, Kurian AW, Gabree M, et al. Clinical actionability of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer risk assessment. **JAMA Oncol** 2015; 1:943-51.

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

Domchek S, Bradbury A, Garber J, Offit K, Robson M. Multiplex genetic testing for cancer susceptibility: out on the high wire without a net? **J Clin Oncol** 2013; 31:1267-70.

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

Durocher F, Tonin P, Shattuck-Eidens D, Skolnick M, Narod SA, Simard J. Mutation analysis of the *BRCA1* gene in 23 families with cases of cancer of the breast, ovary, and multiple other sites. **J Med Genet** 1996; 33:814-9.

Eakin CM, Maccoss MJ, Finney GL, Klevit RE. Estrogen receptor alpha is a putative substrate for the *BRCA1* ubiquitin ligase. **Proc Natl Acad Sci USA** 2007; 104:5794-9.

Easton DF. How many more breast cancer predisposition genes are there? **Breast Cancer Res** 1999; 1:14-7.

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

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.

Economopoulou P, Dimitriadis G, Psyrris A. Beyond BRCA: New hereditary breast cancer susceptibility genes. **Cancer Treat Rev** 2015; 41:1-8.

El Saghir NS, Seoud M, Khalil MK, et al. Effects of young age at presentation on survival in breast cancer. **BMC Cancer** 2006; 6:194.

Elledge RM, Allred DC. Prognostic and predictive value of p53 and p21 in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 1998; 52:79-98.

Enomoto A, Wempe MF, Tsuchida H, et al. Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis. Insights into the mechanism of carnitine recognition. **J Biol Chem** 2002; 277:36262-71.

Eom M, Han A, Yi SY, Shin JJ, Cui Y, Park KH. *RHEB* expression in fibroadenomas of the breast. **Pathol Int** 2008; 58:226-32.

Eom M, Lkhagvadorj S, Oh SS, Han A, Park KH. *ROS1* expression in invasive ductal carcinoma of the breast related to proliferation activity. **Yonsei Med J** 2013; 54:650-7.

Esteves VF, Thuler LC, Amêndola LC, et al. Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations in families with medium and high risk of breast and ovarian cancer in Brazil. **Braz J Med Biol Res** 2009; 42:453-7.

Evans DGR, Moran A, Hartley R, et al. Long-term outcomes of breast cancer in women aged 30 years or younger, based on family history, pathology and *BRCA1/BRCA2/TP53* status. **Br J Cancer** 2010; 102:1091-8.

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

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

Fanconi G. Familial constitutional panmyelocytopenia, Fanconi's anemia (F.A.). I. Clinical aspects. **Semin Hematol** 1967; 4:233-40.

Farmer H, McCabe N, Lord CJ, et al. Targeting the DNA repair defect in *BRCA* mutant cells as a therapeutic strategy. **Nature** 2005; 434:917-21.

Felix GE, Abe-Sandes C, Machado-Lopes TM, et al. Germline mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* and *TP53* in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population. **Hum Genome Var** 2014; 1:14012.

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



Finch AP, Lubinski J, Møller P, et al. Impact of oophorectomy on cancer incidence and mortality in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. **J Clin Oncol** 2014; 32:1547-53.

Fong PC, Boss DS, Yap TA, et al. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase in tumors from *BRCA* mutation carriers. **N Engl J Med** 2009; 361:123-34.

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

Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. **Am J Hum Genet** 1998; 62:676-89.

Foulkes WD. Inherited Susceptibility to Common Cancers. **N Engl J Med** 2008; 359:2143-53.

Funato K, Yamazumi Y, Oda T, Akiyama T. Tyrosine phosphatase *PTPRD* suppresses colon cancer cell migration in coordination with CD44. **Exp Ther Med** 2011; 2:457-63.

Garcia-Higuera I, Taniguchi T, Ganesan S, et al. Interaction of the Fanconi anemia proteins and *BRCA1* in a common pathway. **Mol Cell** 2001; 7:249-62.

Gavish H, dos Santos CC, Buchwald M. A Leu554-to-Pro substitution completely abolishes the functional complementing activity of the Fanconi anemia (FACC) protein. **Hum Mol Genet** 1993; 2:123-6.

Gayther SA, Mangion J, Russell P, et al. Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the *BRCA2* gene. **Nat Genet** 1997; 15:103-5.

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

Giacomazzi J, Graudenz MS, Osorio CA, et al. Prevalence of the *TP53* p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. **PLoS One** 2014; 9:e99893.

Gibbons RJ, Picketts DJ, Villard L, Higgs DR. Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with  $\alpha$ -thalassemia (ATR-X syndrome). **Cell** 1995; 80:837-45.

Gibbons RJ, Pellagatti A, Garrick D, et al. Identification of acquired somatic mutations in the gene encoding chromatinremodeling factor *ATRX* in the  $\alpha$ -thalassemia myelodysplasia syndrome (ATMDS). **Nat Genet** 2003; 34:446-9.

Gibson RA, Hajianpour A, Murer-Orlando M, Buchwald M, Mathew CG. A nonsense mutation and exon skipping in the Fanconi anaemia group C gene. **Hum Mol Genet** 1993; 2:797-9.

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

Gong S, Lu X, Xu Y, Swiderski CF, Jordan CT, Moscow JA. Identification of OCT6 as a novel organic cation transporter preferentially expressed in hematopoietic cells and leukemias. **Exp Hematol** 2002; 30:1162-9.

Gonzalez-Angulo AM, Broglio K, Kau S-W, et al. Women age < or = 35 years with primary breast carcinoma: disease features at presentation. **Cancer** 2005; 103:2466-72.

Gonzalez-Hormazabal P, Reyes JM, Blanco R, et al. The BARD1 Cys557Ser variant and risk of familial breast cancer in a South-American population. **Mol Biol Rep** 2012; 39:8091-8.

Gordon-Smith EC, Rutherford TR. Fanconi anemia: constitutional aplastic anemia. **Semin Hematol** 1991; 28:104-12.

Grann VR, Troxel AB, Zojwalla NJ, Jacobson JS, Hershman D, Neugut AI. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. **Cancer** 2005; 103:2241-51.

Grant RC, Selander I, Connor AA, et al. Prevalence of germline mutations in cancer predisposition genes in patients with pancreatic cancer. **Gastroenterology** 2015; 148:556-64.

Gudas JM, Li T, Nguyen H, Jensen D, Rauscher FJ 3rd, Cowan KH. Cell cycle regulation of *BRCA1* messenger RNA in human breast epithelial cells. **Cell Growth Differ** 1996; 7:717-23.

Guo X, Li D, Chen Y, et al. SNP rs2057482 in *HIF1A* gene predicts clinical outcome of aggressive hepatocellular carcinoma patients after surgery. **Sci Rep** 2015; 26:11846.

Haberler C, Wöhrer A. Clinical Neuropathology practice news 2-2014: ATRX, a new candidate biomarker in gliomas. **Clin Neuropathol** 2014; 33:108-11.

Haffty BG, Choi DH, Goyal S, et al. Breast cancer in young women (YBC): prevalence of *BRCA1/2* mutations and risk of secondary malignancies across diverse racial groups. **Ann Oncol** 2009; 20:1653-9.

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

Han FF, Guo CL, Liu LH. The effect of *CHEK2* variant I157T on cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. **DNA Cell Biol** 2013; 32:329-35.

Han W, Kang SY, Korean Breast Cancer Society. Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast cancer: age less than 35 years is a reasonable cut-off for defining young age-onset breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 119:193-200.

Hanssen AM, Fryns JP. Cowden syndrome. **J Med Genet.** 1995 Feb; 3:117-9.

Harismendy O, Ng PC, Strausberg RL, et al. Evaluation of next generation sequencing platforms for population targeted sequencing studies. **Genome Biol** 2009;10:R32.

Harris AL. Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:38-47.

Harris L, Fritsche H, Mennel R, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. **J Clin Oncol** 2007; 25:5287-312.

Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, et al. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. **N Engl J Med** 2001; 344:539-48.

Hedenfalk IA, Ringner M, Trent JM, Borg A. Gene expression in inherited breast cancer. **Adv Cancer Res** 2002; 84:1-34.

Hedenfalk I, Ringner M, Ben-Dor A, et al. Molecular classification of familial non-*BRCA1/BRCA2* breast cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:2532-7.

Henderson BE, Feigelson HS. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis** 2000; 21:427-33.

[HGNC] HUGO Gene Nomenclature Committee. **KRTAP29-1**. Available from: [http://www.genenames.org/cgi-bin/gene\\_symbol\\_report?hgnc\\_id=34211](http://www.genenames.org/cgi-bin/gene_symbol_report?hgnc_id=34211) [2016 jun 03].

Hilbers FS, Meijers CM, Laros JF, et al. Exome sequencing of germline DNA from non-*BRCA1/2* familial breast cancer cases selected on the basis of aCGH tumor profiling. **PLoS ONE** 2013a; 8 e55734.

Hilbers FS, Vreeswijk MP, van Asperen CJ, Devilee P. The impact of next generation sequencing on the analysis of breast cancer susceptibility: a role for extremely rare genetic variation? **Clin Genet** 2013b; 4:407-14.

Hirotsu Y, Nakagomi H, Sakamoto I, et al. Multigene panel analysis identified germline mutations of DNA repair genes in breast and ovarian cancer. **Mol Genet Genomic Med** 2015; 3:459-66.

Holstege H, Joosse SA, van Oostrom CT, Nederlof PM, de Vries A, Jonkers J. High incidence of protein-truncating *TP53* mutations in *BRCA1*-related breast cancer. **Cancer Res** 2009; 69:3625-33.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2012**, Released April, 2015. Available from: <URL:<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>> [2016 aug 01].

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. **SEER cancer statistics review, 1975-2011**, Released April 15, 2016. Available from: <URL:[http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2011](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2011)> [2016 mai 12].

[IARC] International Agency for Research on Cancer. **GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2012**. 2013. Available from: <URL:<http://globocan.iarc.fr>> [2016 may 06].

Irminger-Finger I, Leung WC. *BRCA1*-dependent and independent functions of *BARD1*. **Int J Biochem Cell Biol** 2002; 34:582-7.

Iyeyasu H. Câncer de mama. In: Lopes A, Chammas R, Iyeyasu H, editores. **Oncologia para graduação**. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Lemar; 2013. p.403-7.

Jefford CE, Feki A, Harb J, Krause KH, Irminger-Finger I. Nuclear-cytoplasmic translocation of *BARD1* is linked to its apoptotic activity. **Oncogene** 2004; 23:3509-20.

Jensen UB, Sunde L, Timshel S, et al. Mismatch repair defective breast cancer in the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 120:777-82.

Ji J, Eng C, Hemminki K. Familial risk for soft tissue tumors: a nation-wide epidemiological study from Sweden. **J Cancer Res Clin Oncol** 2008; 134:617-24.

Joenje H, Levitus M, Waisfisz Q, et al. Complementation analysis in Fanconi anemia: assignment of the reference FA-H patient to group A. **Am J Hum Genet** 2000; 67:759-62.

Jönsson G, Naylor TL, Vallon-Christersson J, et al. Distinct genomic profiles in hereditary breast tumors identified by array-based comparative genomic hybridization. **Cancer Res** 2005; 65:7612-21.

Jönsson G, Staaf J, Vallon-Christersson J, et al. Genomic subtypes of breast cancer identified by array-comparative genomic hybridization display distinct molecular and clinical characteristics. **Breast Cancer Res** 2010;12:R42.

Jönsson G, Staaf J, Vallon-Christersson J, et al. The retinoblastoma gene undergoes rearrangements in *BRCA1*-deficient basal-like breast cancer. **Cancer Res** 2012; 72:4028-36.

Kannan K, Inagaki A, Silber J, et al. Whole exome sequencing identifies *ATRX* mutation as a key molecular determinant in lower-grade glioma. **Oncotarget** 2012; 3:1194-203.

Karppinen SM, Heikkinen K, Rapakko K, Winqvist R. Mutation screening of the *BARD1* gene: evidence for involvement of the Cys557Ser allele in hereditary susceptibility to breast cancer. **J Med Genet** 2004; 41:e114.

Karppinen SM, Barkardottir RB, Backenhorn K, et al. Nordic collaborative study of the *BARD1* Cys557Ser allele in 3956 patients with cancer: enrichment in familial *BRCA1/BRCA2* mutation-negative breast cancer but not in other malignancies. **J Med Genet** 2006; 43:856-62.

Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). **Mol Pharmacol** 2006; 70:1469-80.

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

Kiechle M. Predisposition for breast cancer. In: Ross J, Hortobagyi G, editors. **Molecular oncology of breast cancer**. Boston: Jones & Bartlett; 2005. p.48-59.

King M, Marks J, Mandell J, New York Breast Cancer Study Group. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. **Science** 2003; 302:643-7.

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

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 1971; 68:820-3.

Koepsell H. The SLC22 family with transporters of organic cations, anions and zwitterions. **Mol Aspects Med** 2013; 34:413-35.

Kurian AW, Gong GD, John EM, et al. Breast cancer risk for noncarriers of family-specific *BRCA1* and *BRCA2* mutations: findings from the Breast Cancer Family Registry. **J Clin Oncol** 2011; 29:4505-9.

LaDuca H, Stuenkel AJ, Dolinsky JS, et al. Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients. **Genet Med** 2014; 16:830-7.

Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, et al. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving *BRCA1* and *BRCA2* mutations. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:1138-45.



Lakhani SR, Gusterson BA, Jacquemier J, et al. The pathology of familial breast cancer: histological features of cancers in families not attributable to mutations in *BRCA1* or *BRCA2*. **Clin Cancer Res** 2000; 6:782-9.

Lakhani SR, Ellis I, Schnitt S, et al. (Ed.) **WHO classification of tumours of the breast**. 4. ed. Lyon: IARC, 2012.

Laloo F, Varley J, Moran A, et al. *BRCA1*, *BRCA2* and *TP53* mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. **Eur J Cancer** 2006; 42:1143-50.

Laloo F, Evans DG. Familial breast cancer. **Clin Genet** 2012; 82:105-14.

Lee J, Lee SE, Kang SY, et al. Identification of ROS1 rearrangement in gastric adenocarcinoma. **Cancer** 2013; 119:1627-35.

Lester SC, Cotran RS. A mama. In: Cotran RS, Kumar V, Collins T, editores. **Patologia estrutural e funcional**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kugan; 2000. p.979-1002.

Lester SC, Bose S, Chen YY, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with invasive carcinoma of the breast. **Arch Pathol Lab Med** 2009; 133:1515-38.

Levy-Lahad E, Friedman E. Cancer risks among *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. **Br J Cancer** 2007; 96:11-5.

Li CI, Uribe DJ, Daling JR. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. **Br J Cancer** 2005; 93:1046-52.

Lin PH, Kuo WH, Huang AC, et al. Multiple gene sequencing for risk assessment in patients with early-onset or familial breast cancer. **Oncotarget** 2016; 7:8310-20.

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

Lu Y, Lin YZ, LaPushin R, et al. The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. **Oncogene**. 1999 Nov 25;18: 7034-45.

Lubinski J, Phelan CM, Ghadirian P, et al. Cancer variation associated with the position of the mutation in the *BRCA2* gene. **Fam Cancer** 2004; 3:1-10.

Ma H, Bernstein L, Pike MC, Ursin G. Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. **Breast Cancer Res** 2006; 8:R43.

Mardis ER. A decade's perspective on DNA sequencing technology. **Nature** 2011; 470:198-203.

Marsh DJ, Coulon V, Lunetta KL, et al. Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. **Hum Mol Genet**. 1998; 7:507-15.

Marton I, Knezevic F, Ramic S, Milosevic M, Tomas D. Immunohistochemical expression and prognostic significance of HIF-1 $\alpha$  and VEGF-C in neuroendocrine breast cancer. **Anticancer Res** 2012; 32:5227-32.

Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. **Am Fam Physician** 2010; 81:1339-46.

Mazzocca A, Dituri F, De Santis F, et al. Lysophosphatidic acid receptor *LPAR6* supports the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. **Cancer Res** 2015; 75:532-43.

McCarthy EE, Celebi JT, Baer R, Ludwig T. Loss of Bard1, the heterodimeric partner of the Brca1 tumor suppressor, results in early embryonic lethality and chromosomal instability. **Mol Cell Biol** 2003; 23:5056-63.

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

Meijers-Heijboer H, van Geel B, van Putten W, et al. Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with a *BRCA1* or *BRCA2* mutation. **N Engl J Med** 2001; 345:159-64.

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

Mersch J, Jackson MA, Park M, et al. Cancers associated with *BRCA1* and *BRCA2* mutations other than breast and ovarian. **Cancer** 2015; 121:269-75.

Meza JE, Brzovic PS, King MC, Klevit RE. Mapping the Functional Domains of *BRCA1*. **J Biol Chem** 1999; 274:5659-65.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. **Science** 1994; 266:66-71.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação Nacional de Controle de Tabagismo - CONTAPP. **Falando sobre câncer e seus fatores de risco.** 1996. Disponível em: <URL:[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=319](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=319)> [2015 nov 10].

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Câncer de mama.** Disponível em: <URL:[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer\\_mama](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama)> [2015 set 06].

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer Jose de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016/incidência de câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA; 2016.

Mitchell RN, Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. **Robbins & Cotran fundamentos de patologia.** 8<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2012. As mamas; p.493-504.

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

Moynahan ME, Cui TY, Jasin M. Homology-directed DNA repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a *BRCA1* mutation. **Cancer Res** 2001b; 61:4842-50.

Murer-Orlando M, Llerena JC Jr, Birjandi F, Gibson RA, Mathew CG. FACC gene mutations and early prenatal diagnosis of Fanconi's anaemia. **Lancet** 1993; 342:686.

Nagel JH, Peeters JK, Smid M, et al. Gene expression profiling assigns *CHEK2* 1100delC breast cancers to the luminal intrinsic subtypes. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 132:439-48.

Nalesnik MA, Tseng G, Ding Y, et al. Gene deletions and amplifications in human hepatocellular carcinomas: correlation with hepatocyte growth regulation. **Am J Pathol** 2012; 180:1495-508.

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

Nathanson KL, Wooster R, Weber BL. Breast cancer genetics: what we know and what we need. **Nat Med** 2001; 7:552-6.

[NCCN] National Comprehensive Cancer Network. **Breast cancer**. Available from: <URL:[https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/f\\_guidelines.asp](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp)> [2015 nov 10].

Nevanlinna H, Bartek J. The *CHEK2* gene and inherited breast cancer susceptibility. **Oncogene** 2006; 25:5912-9.

Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. **Genome Res** 2001; 11:863-74.

Nickerson ML, Im KM, Misner KJ, et al. Somatic alterations contributing to metastasis of a castration-resistant prostate cancer. **Hum Mutat** 2013; 34:1231-41.

Nogueira CR, Brentani MM. Triiodothyronine mimics the effects of estrogen in breast cancer cell lines. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1996; 59:271-9.

O'Donnell JL, Joyce MR, Shannon AM, Harmey J, Geraghty J, Bouchier-Hayes D. Oncological implications of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) expression. **Cancer Treat Rev** 2006; 32:407-16.

Olivier M, Langerød A, Carrieri P, et al. The clinical value of somatic *TP53* gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. **Clin Cancer Res** 2006; 12:1157-67.

Ostman A, Hellberg C, Böhmer FD. Protein-tyrosine phosphatases and cancer. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:307-20.

Ota K, Ito K, Akahira J, et al. Expression of organic cation transporter SLC22A16 in human epithelial ovarian cancer: a possible role of the adriamycin importer. **Int J Gynecol Pathol** 2007; 26:334-40.

Pabinger S, Dander A, Fischer M, et al. A survey of tools for variant analysis of next-generation genome sequencing data. **Brief Bioinform** 2014; 15:256-78.

Palacios J, Honrado E, Osorio A, et al. Phenotypic characterization of *BRCA1* and *BRCA2* tumors based in a tissue microarray study with 37 immunohistochemical markers. **Breast Cancer Res Treat** 2005; 90:5-14.

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

Palmero EI, Alemar B, Schüler-Faccini L. Screening for germline *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* and *CHEK2* mutations in families at-risk for hereditary breast cancer identified in a population-based study from Southern Brazil. **Genet Mol Biol** 2016; 39:210-22.

Papa AM, Murad AM, Murad Júnior M, Pirfo CBL. Fundamentos da oncologia mamária. In: Figueiredo E, Monteiro M, Ferreira A, editores. **Tratado de oncologia**. Rio de Janeiro: Revinter; 2013. p.985-7.

Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. **Lancet Oncol** 2001; 2:533-43.

Pasternack SM, von Kügelgen I, Al Aboud K, et al. G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. **Nat Genet** 2008; 40:329-34.

Payne SJ, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer-the present. **Histopathology**. 2008; 52:82-90.

Peng R, Wang S, Shi Y, et al. Patients 35 years old or younger with operable breast cancer are more at risk for relapse and survival: a retrospective matched case-control study. **Breast** 2011; 20:568-73.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 406:747-52.

Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. *TP53* mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene** 2007a; 26:2157-65.

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

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

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

Plevritis SK, Kurian AW, Sigal BM, et al. Cost-effectiveness of screening *BRCA1/2* mutation carriers with breast magnetic resonance imaging. **JAMA** 2006; 295:2374-84.

Prakash R, Zhang Y, Feng W, Jasin M. Homologous recombination and human health: the roles of *BRCA1*, *BRCA2*, and associated proteins. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2015; 7:a016600.

Rajan JV, Wang M, Marquis ST, Chodosh LA. *Brca2* is coordinately regulated with *Brca1* during proliferation and differentiation in mammary epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1996; 93:13078-83.

Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 120:293-308.

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

Rehm HL. Disease-targeted sequencing: a cornerstone in the clinic. **Nat Rev Genet** 2013; 14:295-300.

Rikova K, Guo A, Zeng Q, et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. **Cell** 2007; 131:1190-203.

Rimkunas VM, Crosby KE, Li D, et al. Analysis of receptor tyrosine kinase *ROS1*-positive tumors in non-small cell lung cancer: identification of a *FIG-ROS1* fusion. **Clin Cancer Res** 2012; 18:4449-57.

Ripperger T, Gadzicki D, Meindl A, Schlegelberger B. Breast cancer susceptibility: current knowledge and implications for genetic counseling. **Eur J Hum Genet** 2009; 17:722-31.



Rivlin N, Brosh R, Oren M, Rotter V. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene: Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. **Genes Cancer** 2011; 2:466-74.

Rodriguez JA, Schüchner S, Au WW, Fabbro M, Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of *BARD1* contributes to its proapoptotic activity and is regulated by dimerization with *BRCA1*. **Oncogene** 2004; 23:1809-20.

Rosen EM, Fan S, Ma Y. *BRCA1* regulation of transcription. **Cancer Lett** 2006; 236:175-85.

Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. PARP inhibition: PARP1 and beyond. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:293-301.

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.

Rudolph P, Olsson H, Bonatz G, et al. Correlation between p53, c-erbB-2, and topoisomerase II alpha expression, DNA ploidy, hormonal receptor status and proliferation in 356 node-negative breast carcinomas: prognostic implications. **J Pathol** 1999; 187:207-16.

Ruhe JE, Streit S, Hart S, et al. Genetic alterations in the tyrosine kinase transcriptome of human cancer cell lines. **Cancer Res** 2007; 67:11368-76.

Sabatier R, Adélaïde J, Finetti P, et al. *BARD1* homozygous deletion, a possible alternative to *BRCA1* mutation in basal breast cancer. **Genes Chromosomes Cancer** 2010; 49:1143-51.

Saddi VA, Manoel WJ, Silva AMCT. Genética e câncer de mama. In: Figueiredo E, Monteiro M, Ferreira A, editores. **Tratado de oncologia**. Rio de Janeiro: Revinter; 2013. p.1001-3.

Sato N, Ito K, Onogawa T, et al. Expression of organic cation transporter *SLC22A16* in human endometria. **Int J Gynecol Pathol** 2007; 26:53-60.

Sato Y, Yoshizato T, Shiraishi Y, et al. Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. **Nat Genet** 2013; 45:860-7.

Schlacher K, Christ N, Siaud N, Egashira A, Wu H, Jasin M. Double-strand break repair-independent role for *BRCA2* in blocking stalled replication fork degradation by *MRE11*. **Cell** 2011; 145:529-42.

Schneider KA. **Counseling about cancer: strategies for genetic counseling**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Wiley-Liss; 2002.

Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Mod Pathol** 2010; 23 Suppl 2:S60-4.

Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. **Nat Methods** 2014; 11:361-2.

Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:721-32.

Seshagiri S, Stawiski EW, Durinck S, et al. Recurrent R-spondin fusions in colon cancer. **Nature** 2012; 488:660-4.

Sharan SK, Morimatsu M, Albrecht U, et al. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. **Nature** 1997; 386:804-10.

Shakya R, Szabolcs M, McCarthy E, et al. The basal-like mammary carcinomas induced by Brca1 or Bard1 inactivation implicate the *BRCA1/BARD1* heterodimer in tumor suppression. **Proc Natl Acad Sci USA** 2008; 105:7040-5.

Shendure J, Lieberman Aiden E. The expanding scope of DNA sequencing. **Nat Biotechnol** 2012; 30:1084-94.

Shiloh Y. *ATM* and related protein kinases: safeguarding genome integrity. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:155-68.

Shimomura Y, Wajid M, Ishii Y, et al. Disruption of P2RY5, an orphan G protein-coupled receptor, underlies autosomal recessive woolly hair. **Nat Genet** 2008; 40:335-9.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J. Clin.** 2016; 66:7-30.

Siliciano JD, Canman CE, Taya Y, Sakaguchi K, Appella E, Kastan MB. DNA damage induces phosphorylation of the amino terminus of p53. **Genes Dev** 1997; 11:3471-81.

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.

Smith SA, Easton DF, Evans DG, Ponder BA. Allele losses in the region 17q12-21 in familial breast and ovarian cancer involve the wild-type chromosome. **Nat Genet** 1992; 2:128-31.

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

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

Sotiriou C, Desmedt C, Durbecq V, et al. Genomic and molecular classification of breast cancer. In: Ross JS, Hortobagyi GN, editors. **Molecular oncology of breast cancer**. Sudbury: Jones and Bartlett Pu; 2005. p.81-95.

Stacey SN, Sulem P, Johannsson OT, et al. The *BARD1* Cys557Ser variant and breast cancer risk in Iceland. **PLoS Med** 2006; 3:e217.

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

Strathdee CA, Duncan AM, Buchwald M. Evidence for at least four Fanconi anaemia genes including FACC on chromosome 9. **Nat Genet** 1992; 1:196-8.

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

Tamguney T, Stokoe D. New insights into PTEN. **J Cell Sci.** 2007; 120(Pt 23):4071-9.

Tamura M, Gu J, Matsumoto K, Aota S, Parsons R, Yamada KM. Inhibition of cell migration, spreading, and focal adhesions by tumor suppressor PTEN. **Science**. 1998; 280(5369):1614-7.

Tan DS, Marchiò C, Reis-Filho JS. Hereditary breast cancer: from molecular pathology to tailored therapies. **J Clin Pathol** 2008; 61:1073-82.

Tan MH, Mester JL, Ngeow J, Rybicki LA, Orloff MS, Eng C. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. **Clin Cancer Res**. 2012; 18(2):400-7.

Tanskanen T, Gylfe AE, Katainen R, et al. Systematic search for rare variants in Finnish early-onset colorectal cancer patients. **Cancer Genet** 2015; 208:35-40.

Tassone P, Tagliaferri P, Perricelli A, et al. *BRCA1* expression modulates chemosensitivity of *BRCA1*-defective HCC1937 human breast cancer cells. **Br J Cancer** 2003; 88:1285-91.

Tavassolil, FA, Devilee P (Ed.). Pathology and genetics: tumours of the breast and female genital organs. Lyon: **IARC**, 2003.

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

Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. **Oncogene** 2001; 20:1803-15.

Teraoka SN, Malone KE, Doody DR, et al. Increased frequency of *ATM* mutations in breast carcinoma patients with early onset disease and positive family history. **Cancer** 2001; 92:479-87.

Thompson D, Duedal S, Kirner J, et al. Cancer risks and mortality in heterozygous *ATM* mutation carriers. **J Natl Cancer Inst** 2005; 97:813-22.

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

Thorlacius S, Olafsdottir G, Tryggvadottir L, et al. A single *BRCA2* mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. **Nat Genet** 1996; 13:117-9.

Tung N, Lin NU, Kidd J, et al. Frequency of germline mutations in 25 cancer susceptibility genes in a sequential series of patients with breast cancer. **J Clin Oncol** 2016; 34:1460-8.

Urban L, Urban C, Mello GGN. Mama. In: Guimarães MD, Chojniak R, Müller IS, editores. **Oncologia**. Rio de Janeiro: Elsevier; 2014. p.429-31.

Vaughn JP, Cirisano FD, Huper G, et al. Cell cycle control of *BRCA2*. **Cancer Res** 1996; 56:4590-4.

Veeriah S, Brennan C, Meng S, et al. The tyrosine phosphatase PTPRD is a tumor suppressor that is frequently inactivated and mutated in glioblastoma and other human cancers. **Proc Natl Acad Sci USA** 2009; 106:9435-40.

Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of *BRCA1* and *BRCA2*. **Cell** 2002; 108:171-82.

Venkitaraman AR. Cancer suppression by the chromosome custodians, *BRCA1* and *BRCA2*. **Science** 2014; 343:1470-5.

Verlander PC, Lin JD, Udono MU, et al. Mutation analysis of the Fanconi anemia gene *FACC*. **Am J Hum Genet** 1994; 54:595-601.

Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, Boomsma DI. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. **J Clin Endocrinol Metab** 2006; 91:2100-4.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. **Nature** 2000; 408:307-10.

Vorherr H. Endocrinology of breast cancer. **Maturitas** 1987; 9:113-22.

Waddell N, Arnold J, Cocciardi S, et al. Subtypes of familial breast tumours revealed by expression and copy number profiling. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 123:661-77.

Waite KA, Eng C. Protean *PTEN*: form and function. **Am J Hum Genet.** 2002; 70(4):829-44.

Walsh CS. Two decades beyond *BRCA1/2*: Homologous recombination, hereditary cancer risk and a target for ovarian cancer therapy. **Gynecol Oncol** 2015; 137:343-50.

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

Wang W. Emergence of a DNA-damage response network consisting of Fanconi anemia and *BRCA* proteins. **Nat Rev Genet** 2007; 8:735-48.

Warner E, Messersmith H, Causer P, Eisen A, Shumak R, Plewes D. Systematic review: using magnetic resonance imaging to screen women at high risk for breast cancer. **Ann Intern Med** 2008; 148:671-9.

Whitney MA, Saito H, Jakobs PM, Gibson RA, Moses RE, Grompe M. A common mutation in the *FACC* gene causes Fanconi anaemia in Ashkenazi Jews. **Nat Genet** 1993; 4:202-5.

Weng LP, Brown JL, Eng C. *PTEN* coordinates G(1) arrest by down-regulating cyclin D1 via its protein phosphatase activity and up-regulating p27 via its lipid phosphatase activity in a breast cancer model. **Hum Mol Genet.** 2001; 10(6):599-604.

Wong AK, Pero R, Ormonde PA, Tavtigian SV, Bartel PL. *RAD51* interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. **J Biol Chem** 1997; 272:31941-4.

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. **Science** 1994; 265:2088-90.

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

Wu Y, Hurren R, MacLean N, et al. Carnitine transporter CT2 (*SLC22A16*) is over-expressed in acute myeloid leukemia (AML) and target knockdown reduces growth and viability of AML cells. **Apoptosis** 2015; 20:1099-108.

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

Xu Y, Li Z, Ai F, et al. Systematic Evaluation of Genetic Variants for Polycystic Ovary Syndrome in a Chinese Population. **PLoS One** 2015; 10:e0140695.



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

Xue Y, Gibbons R, Yan Z, et al. The ATRX syndrome protein forms a chromatin-remodeling complex with Daxx and localizes in promyelocytic leukemia nuclear bodies. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:10635-40.

Xue Y, Ankala A, Wilcox WR, Hegde MR. Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. **Genet Med** 2015; 17:444-51.

Yang Y, Muzny DM, Reid JG, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders. **N Engl J Med** 2013; 369:1502-11.

Yang L, Yu SJ, Hong Q, Yang Y, Shao ZM. Reduced expression of *TET1*, *TET2*, *TET3* and *TDG* mRNAs are associated with poor prognosis of patients with early breast cancer. **PLoS One** 2015;10:e0133896.

Yorczyk A, Robinson LS, Ross TS. Use of panel tests in place of single gene tests in the cancer genetics clinic. **Clin Genet** 2015; 88:278-82.

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

Yuan SS, Lee SY, Chen G, Song M, Tomlinson GE, Lee EY. *BRCA2* is required for ionizing radiation-induced assembly of Rad51 complex in vivo. **Cancer Res** 1999; 59:3547-51.

Zentner D, Thompson TN, James PA, et al. The cardiac genetics clinic: A model for multidisciplinary genomic medicine. **Med J Aust** 2015; 203:261.e1-6.

Zhang F, Fan Q, Ren K, Andreassen PR. *PALB2* functionally connects the breast cancer susceptibility proteins *BRCA1* and *BRCA2*. **Mol Cancer Res** 2009a; 7:1110-8.

Zhang F, Ma J, Wu J, et al. *PALB2* links *BRCA1* and *BRCA2* in the DNA-damage response. **Curr Biol** 2009b; 19:524-9.

Zhang J, Willers H, Feng Z, et al. Chk2 phosphorylation of *BRCA1* regulates DNA double-strand break repair. **Mol Cell Biol** 2004; 24:708-18.

Zhang G, Wang J, Yang J, et al. Comparison and evaluation of two exome capture kits and sequencing platforms for variant calling. **BMC Genomics** 2015; 16:581.

Zhong H, De Marzo AM, Laughner E, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. **Cancer Res** 1999; 59:5830-5.

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



**A.C. Camargo  
Cancer Center**

**Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 12 de Junho de 2015.

A

**Dra. Dirce Maria Carraro**  
**Aluna: Fernanda Gabriella dos Santos**

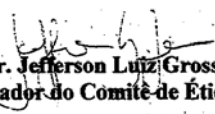
**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1754/13B**

**“Caracterização de novos genes candidatos de predisposição ao câncer de mama hereditário.”**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 09/06/2015, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 12/05/2015, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado “Identificação de novos genes de susceptibilidade para câncer hereditário por seqüenciamento de regiões exônicas”, registrado neste CEP sob nº 1754/13. O projeto afiliado em referência será Dissertação de Mestrado da aluna: Fernanda Gabriella dos Santos.
- Dissertação de Mestrado, datado de 2015.

Atenciosamente,

  
**Dr. Jefferson Luiz Gross**  
**1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

1/1

**Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido destinado às  
pacientes participantes**

A.C.Camargo Cancer Center  
**Fundação Antônio Prudente**

Rua Professor Antônio Prudente, 211 - 01509-900 - São Paulo – SP. Fone: 2189-5172

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos- Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) No 466, de 12 de dezembro de 2012,e Res CNS 251/97 do Ministério da Saúde

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

**1.NOME DO PARTICIPANTE:**

.....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE N°: ..... SEXO : M  
F  
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... N° .....  
APTO: .....  
BAIRRO: .....CIDADE:  
.....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)  
.....

**2.RESPONSÁVEL LEGAL:**

.....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):  
.....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE N°: ..... SEXO : M  
F  
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... N° .....  
APTO: .....  
BAIRRO: .....CIDADE:  
.....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)  
.....

## **DADOS SOBRE O ESTUDO**

O presente estudo, intitulado “Identificação de novos genes de susceptibilidade para câncer hereditário por sequenciamento de regiões exônicas”, um projeto de pesquisas do Centro Internacional de Pesquisas e do Núcleo de Oncogenética do AC Camargo Cancer Center, sob responsabilidade da Dra. Dirce Maria Carraro.

## **EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL**

Convidamos você a participar deste estudo porque você apresentou características clínicas e familiares de câncer hereditário, por isso temos o objetivo de identificar o provável gene predisponente para o câncer para isso você será submetido a um teste genômico, que vai identificar variações no seu DNA (material genético encontrado em quase todas as células do nosso corpo) que podem ou não influenciar o risco de desenvolver doenças. Assim, esse tipo de teste é uma tentativa, através do conhecimento da sequência de seu DNA, de identificar alterações no seu genoma, que por sua vez, podem estar associados com o tipo de câncer de caráter hereditário. Isso quer dizer que se você for portador de determinadas variações no seu genoma, há maior possibilidade de desenvolver determinados tipos de câncer hereditário, mas não quer dizer que você necessariamente vai desenvolver a doença.

O sequenciamento do genoma é um novo tipo de teste em que é possível avaliar a sequência do DNA de seu genoma, para buscar variações na sequência que podem alterar o funcionamento de alguma de suas células levando a um risco aumentado de desenvolver algumas doenças, neste caso, o câncer.

Existem dois tipos de testes de sequenciamento do genoma, o teste do genoma completo, e o teste do exoma, porém, no seu caso especificamente, será realizado apenas o teste do exoma.

### **Objetivos da pesquisa**

Este estudo visa avaliar um conjunto de alterações do DNA diferentes das que são frequentemente encontradas nos principais tipos de câncer hereditário. A longo prazo, isto pode ter um impacto positivo no diagnóstico e tratamento desses tipos de tumores, possibilitando um maior conhecimento sobre alterações que causam esses tipos de câncer.

### **Limitações do teste genômico e de seu resultado**

- a) Atualmente, mesmo com os recursos científicos e tecnológicos disponíveis, o teste genômico do exoma, não irá revelar 100% das regiões genômicas onde estão mapeados os seus genes. Isso quer dizer que pode haver variações em seus genes, que não serão detectadas ou reveladas neste teste.
- b) Para a grande maioria das variações identificadas em genes conhecidos e já associados ao aumento de risco em desenvolver um determinado tipo de câncer, não há evidências científicas suficientes que permitam a avaliação real do impacto da variação na função da proteína codificada e conseqüentemente para aumento de risco do seu desenvolvimento.

- c) Para a grande maioria de variações identificadas em genes já conhecidos, ainda não associados ao aumento de risco, e que levam a síntese de uma proteína com função diferente da original, não há evidências científicas, até o momento, para assegurar que aquela proteína alterada leva a um risco maior ou menor de desenvolver algum tipo de câncer.
- d) O relatório do teste será baseado no conhecimento científico e médico disponível naquele momento. Uma variação que não é conhecida como causadora de doença, no caso câncer, ou de risco aumentado para seu desenvolvimento no momento do resultado de seu teste, pode vir a ser classificada, alguns anos depois, como causadora do desenvolvimento de doença ou de risco em desenvolver determinada doença. Nós não geramos relatórios atualizados para os testes genômicos, a não ser que venha a ser solicitado pelo paciente.
- e) Esse tipo de teste não é validado para detectar grandes variações de conteúdo de seu DNA nas células avaliadas. Para esse propósito, há outras abordagens de alta sensibilidade que estão disponíveis, tais como CGH (do inglês Comparative Genomic Hybridization).
- f) Detecção de variações causadoras de câncer hereditário ou que aumentem o risco para o seu desenvolvimento não resultam, necessariamente, em um tratamento específico, cura ou conduta médica específica.
- g) Podem ocorrer hipóteses de repetição do exame por problemas relacionadas com as amostras, embora o laboratório de genômica esteja altamente empenhado minimizar drasticamente tais problemas. No entanto, mesmo que altamente improváveis, o laudo de seu exame pode sofrer atrasos ou mesmo você pode ser convocado para nova coleta de material.
- h) É altamente recomendável que seja discutido com o seu médico como o resultado do referido teste pode, de qualquer forma, interagir com outras questões, dentre elas, a psicológica. Somente assinie o presente termo se estiver seguro(a) dessas interações.

### **Procedimentos que serão utilizados e propósitos**

Após a assinatura deste consentimento (autorização para o teste), caso você aceite participar desta pesquisa, utilizaremos a amostra do seu DNA armazenado no nosso Biobanco. Atualmente o A C Camargo Cancer Center conta com sequenciadores que permitem que a sua amostra analisado de forma detalhada e segura, usando os protocolos padrões testados e validados nesta instituição.

Após a etapa de preparação de sua amostra, as sequências geradas do seu genoma serão comparadas com sequências disponíveis do genoma humano para identificação das variações. Algumas dessas variações, serão selecionadas e validadas.

Os resultados do seu sequenciamento estarão disponíveis e você receberá, se estiver de acordo, um laudo com as variações detectadas. No entanto, para a maior parte das alterações que serão identificadas não há interpretação clínica imediata, ou seja, o conhecimento gerado por estas metodologias são muito novos, e as comunidades médica e científica não são capazes de interpretar a influência do achado para o seu risco de câncer. Por isso, com o objetivo de selecionar as alterações com maior potencial de estarem associadas com os casos de câncer na sua família, você será orientado sobre a possibilidade de testarmos seus familiares, que serão designados por nós, com base nas suas informações familiares. Para

esta análise, nós disponibilizamos um frasco para coleta de saliva, com as instruções para a manipulação, e um termo de consentimento que deverá ser lido pelo participante (membro da família) e assinado, se o mesmo estiver de acordo. A partir deste material, extraímos o DNA e submetemos a um sequenciamento para a verificação das alterações de interesse. É importante ressaltar que somente poderemos avaliar esse DNA se o termo de consentimento estiver preenchido e assinado. A partir das análises destes resultados, vamos selecionar as variantes como: com alto potencial, com baixo ou sem nenhuma evidência de estar associada ao surgimento do câncer potencial. A médica, colaboradora deste estudo, junto com o resultado, fará o aconselhamento genético de acordo com os achados do seu genoma e da avaliação nos membros de sua família. É necessário deixar claro, que sendo um projeto científico de investigação, os dados não vão fornecer precisamente o nível de risco de desenvolvimento de câncer. No entanto, com estes dados publicados, juntamente com outras análises realizadas em outros centros e publicadas, poderão no futuro contribuir de forma significativa na identificação de novos genes, aconselhamento e acompanhamento dos pacientes. Sua contribuição é de grande valor.

Esclarecemos ainda que você tem toda a liberdade de participar ou não do estudo, e sua decisão, seja ela qual for, não afetará de nenhum modo o seu tratamento. Caso você concorde, esta será uma colaboração voluntária, não havendo nenhuma forma de remuneração por isto. Do mesmo modo, esta decisão não afeta de nenhum modo o que será cobrado de você ou de sua seguradora de saúde durante o tratamento. A qualquer momento, mesmo que você já tenha concordado em participar e fornecido a sua assinatura, você tem toda a liberdade de desistir e solicitar o descarte das amostras, sem que isso ocasione qualquer prejuízo a você ou ao seu tratamento.

### **Complicações e riscos esperados**

O resultado do teste genético pode causar angústias e ansiedade. Como são utilizadas amostras de DNA do Biobanco nenhum dano físico imediato ou tardio poderá ocorrer em decorrência deste estudo.

### **Benefícios que poderão ser obtidos**

Os participantes não se beneficiarão diretamente com a participação nesse estudo. Contudo, o estudo contribuirá para um melhor entendimento dos fatores que podem causar o aparecimento e a evolução do câncer hereditário, desta forma, pode ajudar no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e tratamento mais eficazes.

### **Caráter confidencial dos registros**

Seus registros médicos poderão ser consultados pela equipe de pesquisadores envolvidos neste estudo. Os dados obtidos pela análise do seu sangue são confidenciais, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante ainda que informações do registro médico sejam utilizadas para publicação. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter seu anonimato. Você terá acesso aos seus dados de exames, atendimentos médicos e administração de terapia, quando solicitados.

## **CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO**

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo, conforme definidos acima, consinto em participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Identificação de novos genes de susceptibilidade para câncer hereditário por sequenciamento de regiões exônicas”.

São Paulo, de \_\_\_\_\_ de 201\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Em caso de dúvida, por favor entre em contato com o Dra. Dirce Maria Carraro no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C. Camargo Cancer Center pelo telefone (11) 2198-5023.

Se a pesquisadora 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 – Hospital do Câncer – A.C. Camargo/SP pelo telefone (11) 2189-5000, ramais 2069 ou 5020. De segunda-feira à quinta-feira das 7 horas às 18 horas e sexta-feira das 7 horas às 16 horas.

## **DISPONIBILIDADE DA AMOSTRA RESTANTE**

Você tem a opção de disponibilizar o restante de seu material biológico, que seria desprezado, ao biobanco do A C Camargo Cancer Center para estudos futuros que podem levar a novos achados científicos para ajudar na luta contra o câncer. Marque a opção desejada.

1. ( ) Autorizo que o material biológico seja disponibilizado ao biobanco do AC Camargo Cancer Center e que seja guardado e usado pelos colaboradores do A C Camargo Câncer Center, para pesquisas sobre a prevenção, tratamento, diagnóstico ou cura do câncer e doenças relacionadas, bem como dados de idade, sexo, fatores epidemiológicos relacionados, outras informações do meu prontuário médico, diagnóstico, tratamento e história familiar.

2. ( ) Não autorizo que o material biológico seja disponibilizado ao biobanco do AC Camargo Cancer Center e que seja guardado e usado pelos colaboradores do A C Camargo Cancer Center, para pesquisas sobre a prevenção, tratamento, diagnóstico ou cura do câncer e doenças relacionadas, bem como dados de idade, sexo, fatores epidemiológicos relacionados, outras informações do meu prontuário médico, diagnóstico, tratamento e história familiar.

Se você escolheu a resposta 1, por favor escolha uma das opções a seguir:

3. ( ) Autorizo o uso do meu material biológico em pesquisas sobre o câncer e doenças relacionadas, sem a necessidade de ser contatado para fornecer novas autorizações.

4. ( ) Autorizo o uso do meu material biológico em pesquisas sobre o câncer e doenças relacionadas desde que eu seja contatado para saber sobre a pesquisa e fornecer ou não a autorização. Por fim, você será comunicado no caso de perda, destruição ou término de suas amostras biológicas ou ainda sobre a transferência desse material para outro local.



Se você escolheu a **resposta 4**, queira por gentileza colocar o seu contato e de uma pessoa de seu convívio e confiança, que possa exercer as atividades supra mencionadas:

Nome do doador do material biológico:

\_\_\_\_\_

Telefone:\_( )\_\_\_\_\_

Nome da pessoa de sua confiança:

\_\_\_\_\_

Telefone:\_( )\_\_\_\_\_

**NUNCA HESITE EM TIRAR TODAS AS SUAS DÚVIDAS ANTES DE ASSINAR O PRESENTE TERMO, OU MESMO APÓS ESSE ATO.**

**RUBRIQUE, POR FAVOR, TODAS AS PÁGINAS DESTE DOCUMENTO**

DESTA FORMA, ESTOU CIENTE E CONCORDO COM TODO O PRESENTE TERMO E, PORTANTO, CONSINTO DA REALIZAÇÃO DO TESTE E A DECISÃO ASSINALADA NO ITEM VI DO PRESENTE TERMO.

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

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do paciente ou responsável**

## **Anexo 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido destinado aos familiares participantes**

A.C.Camargo Cancer Center  
**Fundação Antônio Prudente**

Rua Professor Antônio Prudente, 211 - 01509-900 - São Paulo – SP. Fone: 2189-5172

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos- Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) No 466, de 12 de dezembro de 2012,e Res CNS 251/97 do Ministério da Saúde

#### **DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1.NOME DO PARTICIPANTE: .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO : M F  
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO: .....CIDADE: .....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL: .....  
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.): .....  
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO : M F  
DATA NASCIMENTO: ...../...../.....  
ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....  
BAIRRO: .....CIDADE: .....  
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

#### **DADOS SOBRE O ESTUDO**

O presente estudo, intitulado “Identificação de novos genes de susceptibilidade para câncer hereditário por sequenciamento de regiões exônicas”, um projeto de pesquisas do Centro Internacional de Pesquisas e do Núcleo de Oncogenética do AC Camargo Cancer Center, sob responsabilidade do Dra. Dirce Maria Carraro.

#### **EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PARTICIPANTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL**

Convidamos você a participar deste estudo porque você é parente de um paciente de nosso hospital que apresentou características clínicas e familiares de câncer hereditário. Seu parente já participou de um estudo que busca alterações genéticas, usando ferramentas moleculares para avaliar genes que podem estar envolvidos com o aumento de risco para o câncer. Neste momento temos alguns genes candidatos para serem investigados, por isso desenvolvemos este projeto. Utilizando os resultados já obtidos da análise do seu parente, poderemos pesquisar, no seu material genético (DNA), os genes que foram selecionados no

estudo do seu familiar. Assim, será possível comparar os resultados e, talvez, sugerir os genes predisponentes ao câncer hereditário.

### **Objetivos da pesquisa**

O objetivo deste estudo é avaliar na sua família se os indivíduos afetados pelo câncer herdaram a alteração genética que nós identificamos e se os indivíduos não afetados pelo câncer não herdaram a alteração genética. Esta etapa é extremamente importante para conseguirmos selecionar as variantes genéticas mais provavelmente associadas aos casos de câncer na sua família. Esses resultados ajudarão a caracterização do câncer hereditário. No entanto, é importante ter conhecimento que o resultado desta pesquisa não vai mudar o diagnóstico ou o tratamento de quem já teve câncer em sua família.

### **Procedimentos que serão utilizados e propósitos**

Quando você receber este formulário, iremos explicar a você e a seus familiares quais as razões da pesquisa, seus objetivos e que os dados obtidos serão usados exclusivamente em pesquisa científica.

Caso concorde em participar, por favor assine este Termo de Consentimento em 2 vias. Uma ficará em seu poder e a outra será arquivada pelo pesquisador.

Ao concordar em participar deste estudo, você deverá preencher e assinar esse documento e seguir as instruções para coletar sua saliva no frasco enviado no pacote. Caso não seja possível realizar a coleta da sua saliva, nos disponibilizamos a coletar uma amostra do seu sangue, procedimento que será realizado por um profissional especializado e poderá ser feito na sua própria residência, se caso assim preferir.

Esclarecemos ainda que você tem toda a liberdade de participar ou não do estudo, e sua decisão, seja ela qual for, não afetará de nenhum modo o tratamento do seu familiar. Caso você concorde, esta será uma colaboração voluntária, não havendo nenhuma forma de remuneração por isto. A qualquer momento, mesmo que você já tenha concordado em participar e fornecido a sua assinatura, você tem toda a liberdade de desistir e solicitar o descarte das amostras, sem que isso ocasione qualquer prejuízo a você ou ao seu familiar.

### **Complicações e riscos esperados**

O resultado do teste genético pode causar angústias e ansiedade, porém nenhum dano físico imediato ou tardio, que comprometa a sua saúde, poderá ser decorrente deste estudo.

### **Benefícios que poderão ser obtidos**

Os participantes não se beneficiarão diretamente com a participação nesse estudo. Contudo, o estudo contribuirá para um melhor entendimento dos fatores que podem causar o aparecimento e a evolução do câncer hereditário, desta forma, pode ajudar no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e tratamento mais eficazes.

### **Salvaguarda de confidencialidade, sigilo e privacidade**

A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter seu anonimato. Os dados obtidos pela análise do seu material genético são

confidenciais, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante ainda que informações dos resultados obtidos sejam utilizadas para publicação.

### **CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO**

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo, conforme definidos acima, consinto em participar do Projeto de Pesquisa intitulado “Identificação de novos genes de susceptibilidade para câncer hereditário por sequenciamento de regiões exônicas”.

São Paulo, de \_\_\_\_\_ de 201\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador

Em caso de dúvida, por favor entre em contato com o Dra. Dirce Maria Carraro no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C. Camargo Cancer Center pelo telefone (11) 2198-5023.

Se a pesquisadora 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 – Hospital do Câncer – A.C. Camargo/SP pelo telefone (11) 2189-5000, ramais 2069 ou 5020. De segunda-feira à quinta-feira das 7 horas às 18 horas e sexta-feira das 7 horas às 16 horas.

### **DISPONIBILIDADE DA AMOSTRA RESTANTE**

Você tem a opção de disponibilizar o restante de seu material biológico, que seria desprezado, ao biobanco do A C Camargo Cancer Center para estudos futuros que podem levar a novos achados científicos para ajudar na luta contra o câncer. Marque a opção desejada.

1. ( ) Autorizo que o material biológico seja disponibilizado ao biobanco do AC Camargo Cancer Center e que seja guardado e usado pelos colaboradores do A C Camargo Câncer Center, para pesquisas sobre a prevenção, tratamento, diagnóstico ou cura do câncer e doenças relacionadas, bem como dados de idade, sexo, fatores epidemiológicos relacionados, outras informações do meu prontuário médico, diagnóstico, tratamento e história familiar.
2. ( ) Não autorizo que o material biológico seja disponibilizado ao biobanco do AC Camargo Cancer Center e que seja guardado e usado pelos colaboradores do A C Camargo Cancer Center, para pesquisas sobre a prevenção, tratamento, diagnóstico ou cura do câncer e doenças relacionadas, bem como dados de idade, sexo, fatores epidemiológicos relacionados, outras informações do meu prontuário médico, diagnóstico, tratamento e história familiar.

Se você escolheu a resposta 1, por favor escolha uma das opções a seguir:

3. ( ) Autorizo o uso do meu material biológico em pesquisas sobre o câncer e doenças relacionadas, sem a necessidade de ser contatado para fornecer novas autorizações.

4. ( ) Autorizo o uso do meu material biológico em pesquisas sobre o câncer e doenças relacionadas desde que eu seja contatado para saber sobre a pesquisa e fornecer ou não a autorização. Por fim, você será comunicado no caso de perda, destruição ou término de suas amostras biológicas ou ainda sobre a transferência desse material para outro local.

Se você escolheu a **resposta 4**, queira por gentileza colocar o seu contato e de uma pessoa de seu convívio e confiança, que possa exercer as atividades supra mencionadas:

Nome do doador do material biológico:

\_\_\_\_\_  
Telefone:\_( )\_\_\_\_\_

Nome da pessoa de sua confiança:

\_\_\_\_\_  
Telefone:\_( )\_\_\_\_\_

**NUNCA HESITE EM TIRAR TODAS AS SUAS DÚVIDAS ANTES DE ASSINAR O PRESENTE TERMO, OU MESMO APÓS ESSE ATO.**

**RUBRIQUE, POR FAVOR, TODAS AS PÁGINAS DESTE DOCUMENTO**

DESTA FORMA, ESTOU CIENTE E CONCORDO COM TODO O PRESENTE TERMO E, PORTANTO, CONSINTO DA REALIZAÇÃO DO TESTE E A DECISÃO ASSINALADA NO ITEM VI DO PRESENTE TERMO.

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

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do paciente ou responsável**

#### Anexo 4 - Lista de genes associados ao risco de câncer de mama

|               |                |                  |                  |               |                |                 |                 |                |
|---------------|----------------|------------------|------------------|---------------|----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| <i>ABL1</i>   | <i>CDH1</i>    | <i>EYA3</i>      | <i>HIST1H2BC</i> | <i>MAP3K1</i> | <i>PMS2</i>    | <i>RAD51AP1</i> | <i>RPA1</i>     | <i>TIPIN</i>   |
| <i>AKT1</i>   | <i>CDK2</i>    | <i>EYA4</i>      | <i>HIST1H2BD</i> | <i>MAPK8</i>  | <i>POLD1</i>   | <i>RAD51B</i>   | <i>RPA2</i>     | <i>TOP3A</i>   |
| <i>APBB1</i>  | <i>CDK4</i>    | <i>FAM175A</i>   | <i>HIST1H2BH</i> | <i>MDC1</i>   | <i>POLD2</i>   | <i>RAD51C</i>   | <i>RPA3</i>     | <i>TOPBP1</i>  |
| <i>APC</i>    | <i>CEP57</i>   | <i>FANCA</i>     | <i>HIST1H2BJ</i> | <i>MEN1</i>   | <i>POLD3</i>   | <i>RAD51D</i>   | <i>RPS27A</i>   | <i>TOX3</i>    |
| <i>AR</i>     | <i>CHEK1</i>   | <i>FANCB</i>     | <i>HIST1H2BK</i> | <i>MLH1</i>   | <i>POLD4</i>   | <i>RAD52</i>    | <i>RTEL1</i>    | <i>TP53</i>    |
| <i>ATM</i>    | <i>CHEK2</i>   | <i>FANCC</i>     | <i>HIST1H2BL</i> | <i>MLH3</i>   | <i>POLE</i>    | <i>RAD9A</i>    | <i>SDHB</i>     | <i>TP53BP1</i> |
| <i>ATR</i>    | <i>CLSPN</i>   | <i>FANCD2</i>    | <i>HIST1H2BM</i> | <i>MRE11A</i> | <i>POLE2</i>   | <i>RAD9B</i>    | <i>SDHC</i>     | <i>UBA52</i>   |
| <i>ATRIP</i>  | <i>CTLA4</i>   | <i>FANCE</i>     | <i>HIST1H2BN</i> | <i>MSH2</i>   | <i>POLH</i>    | <i>RB1</i>      | <i>SDHD</i>     | <i>UBB</i>     |
| <i>BABAM1</i> | <i>CYP19A1</i> | <i>FANCF</i>     | <i>HIST1H2BO</i> | <i>MSH3</i>   | <i>POLK</i>    | <i>RBBP8</i>    | <i>SIRT6</i>    | <i>UBC</i>     |
| <i>BAP1</i>   | <i>DCLRE1C</i> | <i>FANCG</i>     | <i>HIST1H4A</i>  | <i>MSH6</i>   | <i>POLL</i>    | <i>RECQL4</i>   | <i>SLX1A</i>    | <i>UBE2I</i>   |
| <i>BARD1</i>  | <i>DICER1</i>  | <i>FANCI</i>     | <i>HIST2H2BE</i> | <i>MUS81</i>  | <i>POLM</i>    | <i>RFC1</i>     | <i>SLX4</i>     | <i>UBE2N</i>   |
| <i>BAZ1B</i>  | <i>DIRAS3</i>  | <i>FANCL</i>     | <i>HIST3H2BB</i> | <i>MUTYH</i>  | <i>POLQ</i>    | <i>RFC2</i>     | <i>SMAD4</i>    | <i>UBE2V2</i>  |
| <i>BLM</i>    | <i>DNA2</i>    | <i>FANCM</i>     | <i>HIST3H3</i>   | <i>NBN</i>    | <i>PPP4C</i>   | <i>RFC3</i>     | <i>SMARCA4</i>  | <i>UIMC1</i>   |
| <i>BMPR1A</i> | <i>EME1</i>    | <i>FEN1</i>      | <i>HOXB13</i>    | <i>NF1</i>    | <i>PPP4R2</i>  | <i>RFC4</i>     | <i>SMARCA5</i>  | <i>WHSC1</i>   |
| <i>BRCA1</i>  | <i>EME2</i>    | <i>FGFR2</i>     | <i>HUS1</i>      | <i>NHEJ1</i>  | <i>PPP5C</i>   | <i>RFC5</i>     | <i>SPIDR</i>    | <i>WRN</i>     |
| <i>BRCA2</i>  | <i>EPCAM</i>   | <i>FH</i>        | <i>KAT5</i>      | <i>PALB2</i>  | <i>PRKAR1A</i> | <i>RHNO1</i>    | <i>STK11</i>    | <i>XPA</i>     |
| <i>BRCC3</i>  | <i>ERBB2</i>   | <i>GEN1</i>      | <i>KDM4A</i>     | <i>PARP1</i>  | <i>PRKDC</i>   | <i>RIF1</i>     | <i>SUMO1</i>    | <i>XPC</i>     |
| <i>BRE</i>    | <i>ERCC1</i>   | <i>H19</i>       | <i>KDM4B</i>     | <i>PARP2</i>  | <i>PTCH1</i>   | <i>RINT1</i>    | <i>SUMO2</i>    | <i>XRCC1</i>   |
| <i>BRIP1</i>  | <i>ERCC4</i>   | <i>H2AFX</i>     | <i>KPNA2</i>     | <i>PAXIP1</i> | <i>PTEN</i>    | <i>RMI1</i>     | <i>TDP1</i>     | <i>XRCC2</i>   |
| <i>BUB1B</i>  | <i>ERCC5</i>   | <i>H2BFS</i>     | <i>KRAS</i>      | <i>PCNA</i>   | <i>RAD1</i>    | <i>RMI2</i>     | <i>TDP2</i>     | <i>XRCC3</i>   |
| <i>CASP8</i>  | <i>EXO1</i>    | <i>HERC2</i>     | <i>LIG3</i>      | <i>PIAS4</i>  | <i>RAD17</i>   | <i>RNF168</i>   | <i>TERT</i>     | <i>XRCC4</i>   |
| <i>CCNA1</i>  | <i>EYA1</i>    | <i>HIST1H2BA</i> | <i>LIG4</i>      | <i>PIK3CA</i> | <i>RAD50</i>   | <i>RNF4</i>     | <i>TGFB1</i>    | <i>XRCC5</i>   |
| <i>CCNA2</i>  | <i>EYA2</i>    | <i>HIST1H2BB</i> | <i>LSP1</i>      | <i>PMS1</i>   | <i>RAD51</i>   | <i>RNF8</i>     | <i>TIMELESS</i> | <i>XRCC6</i>   |

## Anexo 5 - Lista de genes frequentemente mutados em tumores

|                 |                |                  |                |                |                 |
|-----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|-----------------|
| <i>ABL2</i>     | <i>CENPN</i>   | <i>FZR1</i>      | <i>MAGEA1</i>  | <i>PAX8</i>    | <i>SOX11</i>    |
| <i>ABRAXAS</i>  | <i>CEP350</i>  | <i>G6PD</i>      | <i>MAG1</i>    | <i>PBRM1</i>   | <i>SOX2</i>     |
| <i>ACVR2A</i>   | <i>CIC</i>     | <i>GADD45</i>    | <i>MALT1</i>   | <i>PBX1</i>    | <i>SRC</i>      |
| <i>ADAMTS20</i> | <i>Cip1</i>    | <i>GATA1</i>     | <i>MAML2</i>   | <i>PDE4DIP</i> | <i>SRCIN1</i>   |
| <i>AFF1</i>     | <i>CKS1B</i>   | <i>GATA2</i>     | <i>MAP2K1</i>  | <i>PDGFB</i>   | <i>SSX1</i>     |
| <i>AFF2</i>     | <i>CMPK1</i>   | <i>GATA3</i>     | <i>MAP2K2</i>  | <i>PDGFRA</i>  | <i>STAT1</i>    |
| <i>AFF3</i>     | <i>COL1A1</i>  | <i>GDNF</i>      | <i>MAP2K4</i>  | <i>PDGFRB</i>  | <i>STK36</i>    |
| <i>AKAP9</i>    | <i>CRBN</i>    | <i>GNA11</i>     | <i>MAP3K13</i> | <i>PER1</i>    | <i>SUFU</i>     |
| <i>AKT2</i>     | <i>CREB1</i>   | <i>GNAQ</i>      | <i>MAP3K7</i>  | <i>PGAP3</i>   | <i>SWI/SNF</i>  |
| <i>AKT3</i>     | <i>CREBBP</i>  | <i>GNAS</i>      | <i>MAPK1</i>   | <i>PHOX2B</i>  | <i>SYK</i>      |
| <i>ALK</i>      | <i>CRKL</i>    | <i>GPR124</i>    | <i>MARK1</i>   | <i>PIK3C2B</i> | <i>SYNE1</i>    |
| <i>ARID1A</i>   | <i>CRTC1</i>   | <i>GRM8</i>      | <i>MARK4</i>   | <i>PIK3CB</i>  | <i>TAF1</i>     |
| <i>ARID1B</i>   | <i>CSF1R</i>   | <i>GUCY1A2</i>   | <i>MBD1</i>    | <i>PIK3CD</i>  | <i>TAF1L</i>    |
| <i>ARID2</i>    | <i>CSMD3</i>   | <i>H2AX</i>      | <i>MCL1</i>    | <i>PIK3CG</i>  | <i>TAL1</i>     |
| <i>ARNT</i>     | <i>CtIP</i>    | <i>HCAR1</i>     | <i>MCM2</i>    | <i>PIK3R1</i>  | <i>TBX22</i>    |
| <i>ASPM</i>     | <i>CTNNA1</i>  | <i>HEATR7B2</i>  | <i>MCM8</i>    | <i>PIK3R2</i>  | <i>TBX3</i>     |
| <i>ASXL1</i>    | <i>CTNNB1</i>  | <i>HIF1A</i>     | <i>MDM2</i>    | <i>PIM1</i>    | <i>TC1</i>      |
| <i>ATF1</i>     | <i>CYLD</i>    | <i>HLF</i>       | <i>MDM4</i>    | <i>PKHD1</i>   | <i>TCAP</i>     |
| <i>ATRX</i>     | <i>CYP2C19</i> | <i>HMGB3P1</i>   | <i>MELK</i>    | <i>PLAG1</i>   | <i>TCF12</i>    |
| <i>AURKA</i>    | <i>CYP2D6</i>  | <i>HNF1A</i>     | <i>MERIT40</i> | <i>PLCG1</i>   | <i>TCF3</i>     |
| <i>AURKB</i>    | <i>DAXX</i>    | <i>HOOK3</i>     | <i>MET</i>     | <i>PLEKHG5</i> | <i>TCF7L1</i>   |
| <i>AURKC</i>    | <i>DCC</i>     | <i>HRAS</i>      | <i>MITF</i>    | <i>PLK1</i>    | <i>TCF7L2</i>   |
| <i>AXL</i>      | <i>DDB2</i>    | <i>HSP90AA1</i>  | <i>MLLT10</i>  | <i>PML</i>     | <i>TCL1A</i>    |
| <i>BACH1</i>    | <i>DDIT3</i>   | <i>HSP90AB1</i>  | <i>MMP2</i>    | <i>POLA1</i>   | <i>TET1</i>     |
| <i>BAI3</i>     | <i>DDR2</i>    | <i>HTR7</i>      | <i>MN1</i>     | <i>POT1</i>    | <i>TET2</i>     |
| <i>BCL10</i>    | <i>DEK</i>     | <i>ICK</i>       | <i>MPL</i>     | <i>POU5F1</i>  | <i>TFE3</i>     |
| <i>BCL11A</i>   | <i>DNMT3A</i>  | <i>IDH1</i>      | <i>MTOR</i>    | <i>PPARG</i>   | <i>TGFBR2</i>   |
| <i>BCL11B</i>   | <i>DPYD</i>    | <i>IDH2</i>      | <i>MTR</i>     | <i>PPP2R1A</i> | <i>TGM7</i>     |
| <i>BCL2</i>     | <i>DST</i>     | <i>IDI1</i>      | <i>MTRR</i>    | <i>PRDM1</i>   | <i>THBS1</i>    |
| <i>BCL2L1</i>   | <i>DX60</i>    | <i>IFN-Gamma</i> | <i>MUC1</i>    | <i>PSIP1</i>   | <i>TIMP3</i>    |
| <i>BCL2L2</i>   | <i>E2F7</i>    | <i>IFT140</i>    | <i>MUC13</i>   | <i>PTGS2</i>   | <i>TLR4</i>     |
| <i>BCL3</i>     | <i>ECAD</i>    | <i>IGF1R</i>     | <i>MYB</i>     | <i>PTPN11</i>  | <i>TLX1</i>     |
| <i>BCL6</i>     | <i>EGFR</i>    | <i>IGF2</i>      | <i>MYC</i>     | <i>PTPN22</i>  | <i>TMEM135</i>  |
| <i>BCL9</i>     | <i>EML4</i>    | <i>IGF2R</i>     | <i>MYCL1</i>   | <i>PTPRD</i>   | <i>TMPO</i>     |
| <i>BCR</i>      | <i>EP300</i>   | <i>IKBKB</i>     | <i>MYCN</i>    | <i>PTPRT</i>   | <i>TNFAIP3</i>  |
| <i>BIRC2</i>    | <i>EP400</i>   | <i>IKBKE</i>     | <i>MYD88</i>   | <i>RABEP1</i>  | <i>TNFRSF14</i> |
| <i>BIRC3</i>    | <i>EPHA3</i>   | <i>IKZF1</i>     | <i>MYH11</i>   | <i>RAD54B</i>  | <i>TNK2</i>     |
| <i>BIRC5</i>    | <i>EPHA7</i>   | <i>IL2</i>       | <i>MYH9</i>    | <i>RAF1</i>    | <i>TNRC19</i>   |
| <i>BLNK</i>     | <i>EPHB1</i>   | <i>IL21R</i>     | <i>NBA1</i>    | <i>RALGDS</i>  | <i>TOP1</i>     |
| <i>BRAF</i>     | <i>EPHB4</i>   | <i>IL6ST</i>     | <i>NBAL2</i>   | <i>RAP80</i>   | <i>TPR</i>      |
| <i>BRCC36</i>   | <i>EPHB6</i>   | <i>IL7R</i>      | <i>NBS1</i>    | <i>RARA</i>    | <i>TPTE2P</i>   |
| <i>BRCC45</i>   | <i>ERBB3</i>   | <i>ING4</i>      | <i>NCOA1</i>   | <i>REL</i>     | <i>TRAF3IP1</i> |
| <i>BRD3</i>     | <i>ERBB4</i>   | <i>IRF4</i>      | <i>NCOA2</i>   | <i>RET</i>     | <i>TRIM23</i>   |
| <i>BRF1</i>     | <i>ERCC2</i>   | <i>IRS2</i>      | <i>NCOA4</i>   | <i>RHOH</i>    | <i>TRIM24</i>   |
| <i>BRL1</i>     | <i>ERCC3</i>   | <i>ITGA10</i>    | <i>NCOR1</i>   | <i>RNASEL</i>  | <i>TRIM33</i>   |
| <i>BTK</i>      | <i>ERG</i>     | <i>ITGA9</i>     | <i>NF2</i>     | <i>RNF2</i>    | <i>TRIP11</i>   |
| <i>BUB1</i>     | <i>ESR1</i>    | <i>ITGB2</i>     | <i>NFE2L2</i>  | <i>RNF213</i>  | <i>TRRAP</i>    |
| <i>CARD11</i>   | <i>ETS1</i>    | <i>ITGB3</i>     | <i>NFKB1</i>   | <i>ROS1</i>    | <i>TSC1</i>     |
| <i>CASC5</i>    | <i>ETV1</i>    | <i>JAK1</i>      | <i>NFKB2</i>   | <i>RPS6KA2</i> | <i>TSC2</i>     |
| <i>CBFB</i>     | <i>ETV4</i>    | <i>JAK2</i>      | <i>NIN</i>     | <i>RRM1</i>    | <i>TSHR</i>     |
| <i>CBL</i>      | <i>EXT1</i>    | <i>JAK3</i>      | <i>NKX2-1</i>  | <i>RRM2</i>    | <i>UBE2E3</i>   |
| <i>CCDC98</i>   | <i>EXT2</i>    | <i>JUN</i>       | <i>NLRP1</i>   | <i>RUNX1</i>   | <i>UBE2J1</i>   |
| <i>CCND1</i>    | <i>EZH2</i>    | <i>KAT6A</i>     | <i>NOTCH1</i>  | <i>RUNX1T1</i> | <i>UBE2T</i>    |

|               |                |              |               |                 |               |
|---------------|----------------|--------------|---------------|-----------------|---------------|
| <i>CCND2</i>  | <i>FAM123B</i> | <i>KAT6B</i> | <i>NOTCH2</i> | <i>SAMD9</i>    | <i>UBR5</i>   |
| <i>CCNE1</i>  | <i>FANCD1</i>  | <i>KDM5C</i> | <i>NOTCH4</i> | <i>SBDS</i>     | <i>UGT1A1</i> |
| <i>CD4</i>    | <i>FANCI</i>   | <i>KDM6A</i> | <i>NPM1</i>   | <i>SDHA</i>     | <i>USP35</i>  |
| <i>CD79A</i>  | <i>FAS</i>     | <i>KDR</i>   | <i>NR3C1</i>  | <i>SEPT9</i>    | <i>USP9X</i>  |
| <i>CD79B</i>  | <i>FBXW7</i>   | <i>KEAP1</i> | <i>NRAS</i>   | <i>SETD2</i>    | <i>UTRN</i>   |
| <i>CDC45</i>  | <i>FGFR1</i>   | <i>KIF9</i>  | <i>NSD1</i>   | <i>SETMAR</i>   | <i>VHL</i>    |
| <i>CDC73</i>  | <i>FGFR3</i>   | <i>KIT</i>   | <i>NTRK1</i>  | <i>SF3B1</i>    | <i>Waf1</i>   |
| <i>CDCA3</i>  | <i>FGFR4</i>   | <i>KLF6</i>  | <i>NTRK3</i>  | <i>SGK1</i>     | <i>WAS</i>    |
| <i>CDCA8</i>  | <i>FLCN</i>    | <i>KMT2A</i> | <i>NUMA1</i>  | <i>SH2D1A</i>   | <i>WDR20</i>  |
| <i>CDH11</i>  | <i>FLI1</i>    | <i>KMT2C</i> | <i>NUP214</i> | <i>SIGLEC12</i> | <i>WDR31</i>  |
| <i>CDH2</i>   | <i>FLT1</i>    | <i>KMT2D</i> | <i>NUP98</i>  | <i>SIN3B</i>    | <i>WDR33</i>  |
| <i>CDH20</i>  | <i>FLT3</i>    | <i>LAMP1</i> | <i>OCT1</i>   | <i>SLC16A5</i>  | <i>WDR48</i>  |
| <i>CDH5</i>   | <i>FLT4</i>    | <i>LCK</i>   | <i>ODF1</i>   | <i>SLC22A16</i> | <i>WDR70</i>  |
| <i>CDK12</i>  | <i>FMR1</i>    | <i>LIFR</i>  | <i>OR5H6</i>  | <i>SLC5A4</i>   | <i>WT1</i>    |
| <i>CDK6</i>   | <i>FN1</i>     | <i>LPHN3</i> | <i>OVGP1</i>  | <i>SMAD2</i>    | <i>XPO1</i>   |
| <i>CDK8</i>   | <i>FOXL2</i>   | <i>LPP</i>   | <i>P21</i>    | <i>SMARCB1</i>  | <i>YPEL2</i>  |
| <i>CDKN1B</i> | <i>FOXO1</i>   | <i>LRP1B</i> | <i>PAK3</i>   | <i>SMARCD1</i>  | <i>ZNF217</i> |
| <i>CDKN2A</i> | <i>FOXO3</i>   | <i>LTF</i>   | <i>PARP9</i>  | <i>SMARCE1</i>  | <i>ZNF384</i> |
| <i>CDKN2B</i> | <i>FOXP1</i>   | <i>LTK</i>   | <i>PAX3</i>   | <i>SMO</i>      | <i>ZNF396</i> |
| <i>CDKN2C</i> | <i>FOXP4</i>   | <i>MAF</i>   | <i>PAX5</i>   | <i>SMUG1</i>    | <i>ZNF521</i> |
| <i>CEBPA</i>  | <i>FRY</i>     | <i>MAFB</i>  | <i>PAX7</i>   | <i>SOCS1</i>    | <i>ZNF574</i> |



**Anexo 6 - 338 variantes validadas totais, agrupadas por paciente**

| <b>SUBJ1007</b> |                  |               |                          |
|-----------------|------------------|---------------|--------------------------|
| <b>Gene</b>     | <b>Alteração</b> |               | <b>Tipo de alteração</b> |
| <i>BARD1</i>    | c.2215dupT       | Tyr739Leufs*2 | <i>Frameshift</i>        |

| <b>SUBJ1011</b> |                  |                    |                          |
|-----------------|------------------|--------------------|--------------------------|
| <b>Gene</b>     | <b>Alteração</b> |                    | <b>Tipo de alteração</b> |
| <i>ADAMTS20</i> | c.4090T>A        | p.Tyr1364Asn       | <i>Missense</i>          |
| <i>APC</i>      | c.1604C>T        | p.Ser535Phe        | <i>Missense</i>          |
| <i>ASXL1</i>    | c.3498C>G        | p.Ser1166Arg       | <i>Missense</i>          |
| <i>ATRX</i>     | c.1606A>G        | p.Met536Val        | <i>Missense</i>          |
| <i>CCR5</i>     | c.550_582del     | p.Tyr184_Gln194del | <i>Frameshift</i>        |
| <i>CSMD3</i>    | c.3644A>C        | p.Glu1215Ala       | <i>Missense</i>          |
| <i>LPP</i>      | c.926G>A         | p.Gly309Asp        | <i>Missense</i>          |
| <i>MAML2</i>    | c.851C>T         | p.Thr284Ile        | <i>Missense</i>          |
| <i>NCOA2</i>    | c.1882G>A        | p.Gly628Arg        | <i>Missense</i>          |
| <i>OR52K2</i>   | c.798dupA        | p.Ala267Serfs*37   | <i>Frameshift</i>        |
| <i>PKD2L1</i>   | c.413T>G         | p.Leu138*          | <i>Nonsense</i>          |
| <i>PTGS2</i>    | c.1532T>C        | p.Val511Ala        | <i>Missense</i>          |
| <i>PTPRT</i>    | c.1613A>T        | p.Gln538Leu        | <i>Missense</i>          |
| <i>SYNE1</i>    | c.7156A>G        | p.Ile2386Val       | <i>Missense</i>          |
| <i>SYNE1</i>    | c.9764C>T        | p.Ser3255Leu       | <i>Missense</i>          |
| <i>TAS1R1</i>   | c.2070delG       | p.Gln690Hisfs*6    | <i>Frameshift</i>        |
| <i>UTRN</i>     | c.4247A>G        | p.Gln1416Arg       | <i>Missense</i>          |
| <i>WWTR1</i>    | c.1199_1200ins   | p.Leu400*          | <i>Frameshift</i>        |
| <i>ZNF117</i>   | c.435dupC        | Phe146Leufs*2      | <i>Frameshift</i>        |

| <b>MJ2001</b>    |                  |                 |                          |
|------------------|------------------|-----------------|--------------------------|
| <b>Gene</b>      | <b>Alteração</b> |                 | <b>Tipo de alteração</b> |
| <i>ATRX</i>      | c.2595C>G        | p.His865Gln     | <i>Missense</i>          |
| <i>C9orf3</i>    | c.813delT        | Val272Trpfs*5   | <i>Frameshift</i>        |
| <i>DNAH1</i>     | c.2241C>A        | p.Tyr747*       | <i>Nonsense</i>          |
| <i>FAM20A</i>    | c.1012G>A        | p.Gly338Ser     | <i>Missense</i>          |
| <i>FANCC</i>     | c.416G>A         | p.Gly139Glu     | <i>Missense</i>          |
| <i>HIF1A</i>     | c.1957A>G        | p.Ser653Gly     | <i>Missense</i>          |
| <i>KRTAP29-1</i> | c.518_531del     | p.Pro173Argfs*2 | <i>Frameshift</i>        |
| <i>LPAR6</i>     | c.921G>T         | p.Trp307Cys     | <i>Missense</i>          |
| <i>PDGFRB</i>    | c.3287C>T        | p.Ala1096Val    | <i>Missense</i>          |
| <i>PTPN22</i>    | c.1859G>A        | p.Trp620*       | <i>Nonsense</i>          |
| <i>RP1L1</i>     | c.6118G>T        | p.Glu2040*      | <i>Nonsense</i>          |

|               |           |             |                 |
|---------------|-----------|-------------|-----------------|
| <i>STK36</i>  | c.1429C>T | p.Arg477Trp | <i>Missense</i> |
| <i>TET2</i>   | c.2429A>G | p.Gln810Arg | <i>Missense</i> |
| <i>USP35</i>  | c.2063C>T | p.Thr688Met | <i>Missense</i> |
| <i>UTRN</i>   | c.143G>A  | p.Ser48Asn  | <i>Missense</i> |
| <i>ZNF574</i> | c.1831G>A | p.Glu611Lys | <i>Missense</i> |

| <b>MJ2003</b>   |                  |              |                          |
|-----------------|------------------|--------------|--------------------------|
| <b>Gene</b>     | <b>Alteração</b> |              | <b>Tipo de alteração</b> |
| <i>ATM</i>      | c.5558A>T        | p.Asp1853Val | <i>Missense</i>          |
| <i>ATR</i>      | c.2290A>G        | p.Lys764Glu  | <i>Missense</i>          |
| <i>EP300</i>    | c.6488C>T        | p.Pro2163Leu | <i>Missense</i>          |
| <i>FANCD2</i>   | c.3416T>C        | p.Met1139Thr | <i>Missense</i>          |
| <i>IL7R</i>     | c.376A>C         | p.Ile126Leu  | <i>Missense</i>          |
| <i>ITGA10</i>   | c.3481A>G        | p.Arg1161Gly | <i>Missense</i>          |
| <i>KAT6A</i>    | c.5926A>G        | p.Met1976Val | <i>Missense</i>          |
| <i>KIAA1919</i> | c.545T>A         | p.Leu182*    | <i>Nonsense</i>          |
| <i>MAML2</i>    | c.1440C>G        | p.Ile480Met  | <i>Missense</i>          |
| <i>MARK1</i>    | c.1643G>A        | p.Arg548Gln  | <i>Missense</i>          |
| <i>MTR</i>      | c.1982T>C        | p.Ile661Thr  | <i>Missense</i>          |
| <i>OAS3</i>     | c.2530C>T        | p.Arg844*    | <i>Nonsense</i>          |
| <i>PLEKHG5</i>  | c.325C>T         | p.Arg109Cys  | <i>Missense</i>          |
| <i>SAMD9</i>    | c.257C>T         | p.Ser86Phe   | <i>Missense</i>          |
| <i>SUFU</i>     | c.1325A>G        | p.Lys442Arg  | <i>Missense</i>          |
| <i>SYNE1</i>    | c.12061T>C       | p.Cys4021Arg | <i>Missense</i>          |
| <i>TGM7</i>     | c.307G>C         | p.Val103Leu  | <i>Missense</i>          |
| <i>TGM7</i>     | c.1391G>A        | p.Arg464Gln  | <i>Missense</i>          |
| <i>ZNF217</i>   | c.2742G>T        | p.Glu914Asp  | <i>Missense</i>          |
| <i>ZNF217</i>   | c.2743C>T        | p.Pro915Ser  | <i>Missense</i>          |

| <b>MJ2004</b>   |                  |                  |                          |
|-----------------|------------------|------------------|--------------------------|
| <b>Gene</b>     | <b>Alteração</b> |                  | <b>Tipo de alteração</b> |
| <i>AKAP9</i>    | c.10249C>T       | p.Arg3417Cys     | <i>Missense</i>          |
| <i>APC</i>      | c.3949G>C        | p.Glu1317Gln     | <i>Missense</i>          |
| <i>ARHGAP8</i>  | c.244delC        | p.Arg82Glyfs*55  | <i>Frameshift</i>        |
| <i>ARID1B</i>   | c.2419C>T        | p.Pro807Ser      | <i>Missense</i>          |
| <i>AXL</i>      | c.2414A>C        | p.Asn805Thr      | <i>Missense</i>          |
| <i>BCL9</i>     | c.3633G>A        | p.Met1211Ile     | <i>Missense</i>          |
| <i>C11orf40</i> | c.344_345del     | p.Ser115Tyrfs*20 | <i>Frameshift</i>        |
| <i>CD33</i>     | c.466_469del     | p.Gly156Thrfs*5  | <i>Frameshift</i>        |
| <i>CSMD3</i>    | c.9623A>T        | p.Asn3208Ile     | <i>Missense</i>          |
| <i>DMKN</i>     | c.528C>A         | p.Tyr176*        | <i>Nonsense</i>          |
| <i>EP400</i>    | c.5324G>T        | p.Ser1775Ile     | <i>Missense</i>          |
| <i>ERCC4</i>    | c.1031A>T        | p.Tyr344Phe      | <i>Missense</i>          |

|                 |                    |              |                   |
|-----------------|--------------------|--------------|-------------------|
| <i>FOLR3</i>    | c.595C>T           | p.Gln199*    | <i>Nonsense</i>   |
| <i>LPP</i>      | c.869C>G           | p.Ala290Gly  | <i>Missense</i>   |
| <i>MALT1</i>    | c.824A>G           | p.Tyr275Cys  | <i>Missense</i>   |
| <i>MCM9</i>     | c.3241C>T          | p.Arg1081*   | <i>Nonsense</i>   |
| <i>MMP8</i>     | c.925C>T           | p.Gln309*    | <i>Nonsense</i>   |
| <i>NRG3</i>     | c.1612C>T          | p.Arg538*    | <i>Nonsense</i>   |
| <i>NUMA1</i>    | c.2170A>G          | p.Arg724Gly  | <i>Missense</i>   |
| <i>OVGP1</i>    | c.1808C>T          | p.Thr603Ile  | <i>Missense</i>   |
| <i>PKHD1</i>    | c.9577G>A          | p.Val3193Ile | <i>Missense</i>   |
| <i>POT1</i>     | c.1211G>T          | p.Gly404Val  | <i>Missense</i>   |
| <i>SLC22A16</i> | c.1664T>C          | p.Leu555Pro  | <i>Missense</i>   |
| <i>TAS2R8</i>   | c.46G>T            | p.Glu16*     | <i>Nonsense</i>   |
| <i>TET2</i>     | c.3251A>C          | p.Gln1084Pro | <i>Missense</i>   |
| <i>TOPBP1</i>   | c.847A>G           | p.Lys283Glu  | <i>Missense</i>   |
| <i>WWTR1</i>    | c.1199_1200insAATT | p.Leu400*    | <i>Frameshift</i> |

| <b>MJ2007/2012</b> |                  |                  |                          |
|--------------------|------------------|------------------|--------------------------|
| <b>Gene</b>        | <b>Alteração</b> |                  | <b>Tipo de alteração</b> |
| <i>BRCA1</i>       | c.4963T>C        | p.Ser1655Pro     | <i>Missense</i>          |
| <i>CASC5</i>       | c.43A>G          | p.Ile15Val       | <i>Missense</i>          |
| <i>ERBB2</i>       | c.563G>A         | p.Arg188His      | <i>Missense</i>          |
| <i>MAB21L3</i>     | c.739G>T         | p.Glu247*        | <i>Nonsense</i>          |
| <i>MET</i>         | c.1451A>G        | p.His484Arg      | <i>Missense</i>          |
| <i>PDGFRB</i>      | c.581T>C         | p.Ile194Thr      | <i>Missense</i>          |
| <i>POLA1</i>       | c.3908T>C        | p.Met1303Thr     | <i>Missense</i>          |
| <i>PTPRD</i>       | c.1856C>T        | p.Thr619Ile      | <i>Missense</i>          |
| <i>ROS1</i>        | c.1108T>C        | p.Ser370Pro      | <i>Missense</i>          |
| <i>ROS1</i>        | c.6733G>A        | p.Gly2245Ser     | <i>Missense</i>          |
| <i>SLC22A16</i>    | c.226delG        | p.Ala76Profs*66  | <i>Frameshift</i>        |
| <i>SLC5A4</i>      | c.427delG        | p.Val143Serfs*15 | <i>Frameshift</i>        |
| <i>SLC5A4</i>      | c.415G>T         | p.Glu139*        | <i>Nonsense</i>          |
| <i>SLC5A4</i>      | c.1007G>A        | p.Arg336His      | <i>Missense</i>          |
| <i>UBE2J1</i>      | c.577G>C         | p.Gly193Arg      | <i>Missense</i>          |
| <i>UHRF1</i>       | c.2066C>A        | p.Ser689*        | <i>Nonsense</i>          |

| <b>MJ2013</b> |                  |              |                          |
|---------------|------------------|--------------|--------------------------|
| <b>Gene</b>   | <b>Alteração</b> |              | <b>Tipo de alteração</b> |
| <i>AKAP9</i>  | c.10840A>G       | p.Met3614Val | <i>Missense</i>          |
| <i>CD79B</i>  | c.566C>T         | p.Ala189Val  | <i>Missense</i>          |
| <i>DNAH5</i>  | c.5131C>T        | p.Arg1711*   | <i>Nonsense</i>          |
| <i>KMT2C</i>  | c.9245C>T        | p.Pro3082Leu | <i>Missense</i>          |
| <i>MAATS1</i> | c.925G>T         | p.Glu309*    | <i>Nonsense</i>          |
| <i>NBN</i>    | c.643C>T         | p.Arg215Trp  | <i>Missense</i>          |
| <i>OCEL1</i>  | c.748C>T         | p.Gln250*    | <i>Nonsense</i>          |

|          |           |                 |          |
|----------|-----------|-----------------|----------|
| PARVG    | c.952C>T  | p.Gln318*       | Nonsense |
| PTPMT1   | c.605G>C  | p.*202Serext*38 | Missense |
| PUS7L    | c.922C>T  | p.Arg308*       | Nonsense |
| RNF213   | c.6289G>A | p.Val2097Ile    | Missense |
| SLC22A16 | c.599C>T  | p.Ala200Val     | Missense |
| SLC5A4   | c.1250C>T | p.Ala417Val     | Missense |
| SLX4     | c.4766G>A | p.Arg1589His    | Missense |
| SYNE1    | c.5227G>C | p.Asp1743His    | Missense |
| TPR      | c.5119A>G | p.Thr1707Ala    | Missense |
| TSGA10   | c.2047C>T | p.Arg683*       | Nonsense |
| ZNF217   | c.756C>G  | p.Asp252Glu     | Missense |
| ZNF521   | c.2579C>T | p.Thr860Ile     | Missense |

| MJ2014  |                  |                  |                   |
|---------|------------------|------------------|-------------------|
| Gene    | Variante         | Proteína         | Tipo de alteração |
| BCO2    | c.211C>T         | p.Arg71*         | Nonsense          |
| CHIT1   | c.1048A>T        | p.Lys350*        | Nonsense          |
| DNAH7   | c.10359T>G       | p.Tyr3453*       | Nonsense          |
| EFCAB5  | c.1832_1833delAG | p.Glu611Valfs*66 | Frameshift        |
| FLT1    | c.3602C>T        | p.Pro1201Leu     | Missense          |
| GALNT3  | c.484C>T         | p.Arg162*        | Nonsense          |
| GCKR    | c.1618C>T        | p.Arg540*        | Nonsense          |
| GRM8    | c.593C>G         | p.Pro198Arg      | Missense          |
| HRNR    | c.2299C>T        | p.Arg767*        | Nonsense          |
| KDR     | c.1116G>C        | p.Glu372Asp      | Missense          |
| KMT2D   | c.14957G>A       | p.Arg4986His     | Missense          |
| MRE11A  | c.529G>A         | p.Ala177Thr      | Missense          |
| NLRP1   | c.2815G>A        | p.Val939Met      | Missense          |
| NOSTRIN | c.394C>T         | p.Gln132*        | Nonsense          |
| OR5H6   | c.931A>G         | p.Lys311Glu      | Missense          |
| PDGFRA  | c.499G>A         | p.Val167Met      | Missense          |
| PLEKHH1 | c.4042C>T        | p.Arg1348*       | Nonsense          |
| SLC2A8  | c.802C>T         | p.Gln268*        | Nonsense          |
| SLX4    | c.3383A>C        | p.Gln1128Pro     | Missense          |
| TSC2    | c.3584C>T        | p.Ala1195Val     | Missense          |
| UTRN    | c.6679A>G        | p.Ile2227Val     | Missense          |
| WDR31   | c.283G>A         | p.Val95Met       | Missense          |

| MJ2015 |           |              |                   |
|--------|-----------|--------------|-------------------|
| Gene   | Alteração |              | Tipo de alteração |
| A4GNT  | c.796C>T  | p.Arg266*    | Nonsense          |
| ASPM   | c.4213C>T | p.Arg1405Cys | Missense          |
| ATRX   | c.2484G>C | p.Met828Ile  | Missense          |
| BRCA2  | c.865A>C  | p.Asn289His  | Missense          |

|                 |           |              |                 |
|-----------------|-----------|--------------|-----------------|
| <i>BRIP1</i>    | c.577G>A  | p.Val193Ile  | <i>Missense</i> |
| <i>CDK12</i>    | c.3824C>T | p.Pro1275Leu | <i>Missense</i> |
| <i>CFHR2</i>    | c.760C>T  | p.Arg254*    | <i>Nonsense</i> |
| <i>CSF1R</i>    | c.1237G>A | p.Gly413Ser  | <i>Missense</i> |
| <i>GJB4</i>     | c.384G>A  | p.Trp128*    | <i>Nonsense</i> |
| <i>HSP90AB1</i> | c.784G>A  | p.Gly262Ser  | <i>Missense</i> |
| <i>KRT76</i>    | c.826G>T  | p.Glu276*    | <i>Nonsense</i> |
| <i>LPHN3</i>    | c.1394G>A | p.Arg465Gln  | <i>Missense</i> |
| <i>MTNR1A</i>   | c.541C>T  | p.Gln181*    | <i>Nonsense</i> |
| <i>PKD1L2</i>   | c.4201C>T | p.Arg1401*   | <i>Nonsense</i> |
| <i>PRKAR1A</i>  | c.1373A>G | p.Lys458Arg  | <i>Missense</i> |
| <i>RB1</i>      | c.921G>T  | p.Trp307Cys  | <i>Missense</i> |
| <i>RPE</i>      | c.237G>A  | p.Trp79*     | <i>Nonsense</i> |
| <i>STK36</i>    | c.365T>C  | p.Leu122Pro  | <i>Missense</i> |
| <i>XPC</i>      | c.872C>G  | p.Ser291Cys  | <i>Missense</i> |

**MJ2016**

| <b>Gene</b>     | <b>Alteração</b> |                  | <b>Tipo de alteração</b> |
|-----------------|------------------|------------------|--------------------------|
| <i>ATM</i>      | c.2442C>A        | p.Asp814Glu      | <i>Missense</i>          |
| <i>ATRX</i>     | c.2680A>C        | p.Thr894Pro      | <i>Missense</i>          |
| <i>BRIP1</i>    | c.577G>A         | p.Val193Ile      | <i>Missense</i>          |
| <i>CCDC27</i>   | c.454G>T         | p.Glu152*        | <i>Nonsense</i>          |
| <i>CEACAM20</i> | c.1536C>A        | p.Cys512*        | <i>Nonsense</i>          |
| <i>DNAH7</i>    | c.10359T>G       | p.Tyr3453*       | <i>Nonsense</i>          |
| <i>ITGA9</i>    | c.2845C>G        | p.Leu949Val      | <i>Missense</i>          |
| <i>KDELC2</i>   | c.930_931delAG   | p.Arg310Serfs*6  | <i>Frameshift</i>        |
| <i>LRRC39</i>   | c.148_154del     | p.Thr50X         | <i>Frameshift</i>        |
| <i>MAML2</i>    | c.521G>A         | p.Gly174Asp      | <i>Missense</i>          |
| <i>MTOR</i>     | c.985G>A         | p.Ala329Thr      | <i>Missense</i>          |
| <i>MYO1A</i>    | c.277C>T         | p.Arg93*         | <i>Nonsense</i>          |
| <i>NF1</i>      | c.1283T>C        | p.Ile428Thr      | <i>Missense</i>          |
| <i>PON3</i>     | c.94C>T          | p.Arg32*         | <i>Nonsense</i>          |
| <i>PTPRD</i>    | c.2164G>T        | p.Ala722Ser      | <i>Missense</i>          |
| <i>PZP</i>      | c.2038C>T        | p.Arg680*        | <i>Nonsense</i>          |
| <i>RAF1</i>     | c.1241dupA       | p.Asp415Glyfs*33 | <i>Frameshift</i>        |
| <i>SLX4</i>     | c.3662C>T        | p.Ala1221Val     | <i>Missense</i>          |
| <i>ZNF217</i>   | c.2742G>T        | p.Glu914Asp      | <i>Missense</i>          |
| <i>ZNF217</i>   | c.2743C>T        | p.Pro915Ser      | <i>Missense</i>          |

**MJ2037**

| <b>Gene</b>    | <b>Alteração</b> |             | <b>Tipo de alteração</b> |
|----------------|------------------|-------------|--------------------------|
| <i>AFF1</i>    | c.2651C>T        | p.Pro884Leu | <i>Missense</i>          |
| <i>ANKRD2</i>  | c.349G>T         | p.Glu117*   | <i>Nonsense</i>          |
| <i>ANKRD35</i> | c.1510C>T        | p.Arg504*   | <i>Nonsense</i>          |
| <i>BAALC</i>   | c.409C>T         | p.Arg137*   | <i>Nonsense</i>          |

|                 |              |                    |                   |
|-----------------|--------------|--------------------|-------------------|
| <i>BDH1</i>     | c.528delG    | p.Lys177Asnfs*39   | <i>Frameshift</i> |
| <i>BMPR1A</i>   | c.1327C>T    | p.Arg443Cys        | <i>Missense</i>   |
| <i>BRCA1</i>    | c.5069C>T    | p.Ala1690Val       | <i>Missense</i>   |
| <i>C20orf96</i> | c.786delT    | p.Gln263Argfs*8    | <i>Frameshift</i> |
| <i>CCR5</i>     | c.550_582del | p.Tyr184_Gln194del | <i>Frameshift</i> |
| <i>CD4</i>      | c.571A>G     | p.Lys191Glu        | <i>Missense</i>   |
| <i>CSMD3</i>    | c.3059G>A    | p.Arg1020His       | <i>Missense</i>   |
| <i>E2F7</i>     | c.2572G>C    | p.Val858Leu        | <i>Missense</i>   |
| <i>EFCAB13</i>  | c.706C>T     | p.Arg236*          | <i>Nonsense</i>   |
| <i>ERCC1</i>    | c.875G>A     | p.Trp292*          | <i>Nonsense</i>   |
| <i>FAM217A</i>  | c.1525T>C    | p.*509Glnext*?     | <i>Missense</i>   |
| <i>FN1</i>      | c.1070G>A    | p.Gly357Glu        | <i>Missense</i>   |
| <i>HSP90AA1</i> | c.37C>T      | p.Pro13Ser         | <i>Missense</i>   |
| <i>IKBKE</i>    | c.755G>A     | p.Arg252Gln        | <i>Missense</i>   |
| <i>IL4</i>      | c.313C>T     | p.Arg105*          | <i>Nonsense</i>   |
| <i>ITGA10</i>   | c.668G>A     | p.Arg223Gln        | <i>Missense</i>   |
| <i>ITIH3</i>    | c.925A>T     | p.Arg309*          | <i>Nonsense</i>   |
| <i>KAT6B</i>    | c.581C>T     | p.Ser194Leu        | <i>Missense</i>   |
| <i>KDR</i>      | c.2312C>T    | p.Thr771Met        | <i>Missense</i>   |
| <i>KDR</i>      | c.2525G>A    | p.Arg842His        | <i>Missense</i>   |
| <i>KMT2C</i>    | c.4802A>G    | p.Asn1601Ser       | <i>Missense</i>   |
| <i>LCN10</i>    | c.456C>G     | p.Tyr152*          | <i>Nonsense</i>   |
| <i>LIFR</i>     | c.1937C>A    | p.Thr646Asn        | <i>Missense</i>   |
| <i>LPHN3</i>    | c.2782C>G    | p.Leu928Val        | <i>Missense</i>   |
| <i>LRRC39</i>   | c.149_155del | p.Thr50Lysfs*14    | <i>Frameshift</i> |
| <i>MMP21</i>    | c.1203G>A    | p.Trp401*          | <i>Nonsense</i>   |
| <i>MYH11</i>    | c.4261G>A    | p.Ala1421Thr       | <i>Missense</i>   |
| <i>NLRP1</i>    | c.3691G>A    | p.Val1231Ile       | <i>Missense</i>   |
| <i>NTRK1</i>    | c.1331G>A    | p.Arg444Gln        | <i>Missense</i>   |
| <i>NUP214</i>   | c.4840A>G    | p.Thr1614Ala       | <i>Missense</i>   |
| <i>NUP214</i>   | c.2667A>C    | p.Lys889Asn        | <i>Missense</i>   |
| <i>PDE4DIP</i>  | c.953T>C     | p.Leu318Pro        | <i>Missense</i>   |
| <i>PKD1L2</i>   | c.3551G>A    | p.Trp1184*         | <i>Nonsense</i>   |
| <i>PKHD1</i>    | c.9577G>A    | p.Val3193Ile       | <i>Missense</i>   |
| <i>RB1</i>      | c.2091C>G    | p.Asp697Glu        | <i>Missense</i>   |
| <i>SIGLEC12</i> | c.1522A>C    | p.Lys508Gln        | <i>Missense</i>   |
| <i>SPNS3</i>    | c.319C>T     | p.Arg107*          | <i>Nonsense</i>   |
| <i>UCMA</i>     | c.93delC     | p.Met32Cysfs*176   | <i>Frameshift</i> |
| <i>USP35</i>    | c.1655C>A    | p.Pro552His        | <i>Missense</i>   |
| <i>ZNF25</i>    | c.13C>T      | p.Gln5*            | <i>Nonsense</i>   |
| <i>ZNF491</i>   | c.451C>T     | p.Arg151*          | <i>Nonsense</i>   |

| <b>SM001.021</b> |                  |                  |                          |
|------------------|------------------|------------------|--------------------------|
| <b>Gene</b>      | <b>Alteração</b> |                  | <b>Tipo de alteração</b> |
| ASPM             | c.676C>T         | p.Pro226Ser      | Missense                 |
| ASPM             | c.6965A>C        | p.Tyr2322Ser     | Missense                 |
| C19orf55         | c.261G>A         | p.Trp87*         | Nonsense                 |
| C7orf31          | c.1375_1379del   | p.Asp459Leufs*5  | Frameshift               |
| CASC5            | c.4457T>C        | p.Ile1486Thr     | Missense                 |
| DST              | c.4898A>T        | p.Lys1633Ile     | Missense                 |
| KL               | c.3033C>A        | p.Tyr1011*       | Nonsense                 |
| LIPM             | c.711delG        | p.Gly238Aspfs*26 | Frameshift               |
| MAS1L            | c.568delT        | p.Ser190Leufs*17 | Frameshift               |
| MTRR             | c.820C>T         | p.Pro274Ser      | Missense                 |
| MUC1             | c.76C>G          | p.Pro26Ala       | Missense                 |
| MUC1             | c.613G>A         | p.Gly205Ser      | Missense                 |
| MYH11            | c.3375G>C        | p.Glu1132Asp     | Missense                 |
| PDGFRB           | c.590G>A         | p.Arg197Lys      | Missense                 |
| POT1             | c.1211G>T        | p.Gly404Val      | Missense                 |
| PRIM2            | c.910G>T         | p.Gly304*        | Nonsense                 |
| RNF213           | c.2224C>G        | p.Gln742Glu      | Missense                 |
| SLX4             | c.3662C>T        | p.Ala1221Val     | Missense                 |
| TLR4             | c.842G>A         | p.Cys281Tyr      | Missense                 |
| TMPRSS11E        | c.666_669del     | p.Ile222Metfs*6  | Frameshift               |
| TTC33            | c.677C>G         | p.Ser226*        | Nonsense                 |
| WDR20            | c.1423G>T        | p.Gly475Cys      | Missense                 |
| ZNF844           | c.1044_1048del   | p.Tyr348*        | Frameshift               |

| <b>SM001.040</b> |                  |                   |                          |
|------------------|------------------|-------------------|--------------------------|
| <b>Gene</b>      | <b>Alteração</b> |                   | <b>Tipo de alteração</b> |
| ABCA4            | c.3285C>A        | p.Tyr1095*        | Nonsense                 |
| ANGPTL3          | c.575delA        | p.Gln192Argfs*5   | Frameshift               |
| APOA5            | c.990_993del     | p.Asp332Valfs*5   | Frameshift               |
| BRCA2            | c.9292T>C        | p.Tyr3098His      | Missense                 |
| CARD11           | c.1742C>T        | p.Ala581Val       | Missense                 |
| CIB3             | c.556C>T         | p.Arg186*         | Nonsense                 |
| CRYGA            | c.295C>T         | p.Arg99*          | Nonsense                 |
| CSF1R            | c.1237G>A        | p.Gly413Ser       | Missense                 |
| DST              | c.3458G>A        | p.Ser1153Asn      | Missense                 |
| ERBB2            | c.170A>G         | p.Gln57Arg        | Missense                 |
| ETS1             | c.860G>A         | p.Arg287His       | Missense                 |
| EXT2             | c.1072C>T        | p.Arg358Trp       | Missense                 |
| GPR179           | c.6847_6848delCT | p.Leu2283Glyfs*36 | Frameshift               |
| IKBKB            | c.2028G>A        | p.Met676Ile       | Missense                 |
| ITGA9            | c.2362G>A        | p.Val788Met       | Missense                 |
| KIAA1430         | c.1217delG       | p.Gly406Glufs*38  | Frameshift               |
| LRRC2            | c.1114T>G        | p.*372Glyext*25   | Missense                 |

|           |            |                   |            |
|-----------|------------|-------------------|------------|
| LTK       | c.2437G>T  | p.Glu813*         | Nonsense   |
| MAMDC4    | c.3286delC | p.Arg1096Alafs*54 | Frameshift |
| MARK1     | c.230C>G   | p.Ala77Gly        | Missense   |
| MDC1      | c.2526A>T  | p.Arg842Ser       | Missense   |
| MDC1      | c.998C>T   | p.Ala333Val       | Missense   |
| MET       | c.1444G>A  | p.Asp482Asn       | Missense   |
| MFSD6L    | c.1264del  | p.Ala422X         | Frameshift |
| MICAL2    | c.414delT  | p.Gly139Alafs*33  | Frameshift |
| MUC13     | c.197C>T   | p.Thr66Ile        | Missense   |
| NTRK1     | c.2272G>A  | p.Ala758Thr       | Missense   |
| NTRK1     | c.2339G>A  | p.Arg780Gln       | Missense   |
| NUP98     | c.5135G>A  | p.Arg1712Gln      | Missense   |
| ODF1      | c.463G>A   | p.Glu155Lys       | Missense   |
| PIK3R2    | c.1643C>T  | p.Ala548Val       | Missense   |
| PKHD1     | c.5125C>T  | p.Leu1709Phe      | Missense   |
| PRIM2     | c.910G>T   | p.Gly304*         | Nonsense   |
| RGS11     | c.970G>T   | p.Glu324*         | Nonsense   |
| SAMD9     | c.257C>T   | p.Ser86Phe        | Missense   |
| SEPT9     | c.829G>A   | p.Gly277Ser       | Missense   |
| SETMAR    | c.80A>C    | p.Gln27Pro        | Missense   |
| SLC5A4    | c.1769A>G  | p.Asp590Gly       | Missense   |
| TET2      | c.5152G>T  | p.Val1718Leu      | Missense   |
| TICAM2    | c.694C>T   | p.Gln232*         | Nonsense   |
| TMEM159   | c.166dupC  | p.Leu56Profs*90   | Frameshift |
| TNFRSF10C | c.271delT  | p.Cys91Valfs*13   | Frameshift |
| WRN       | c.970A>G   | p.Thr324Ala       | Missense   |
| WRN       | c.436A>G   | p.Lys146Glu       | Missense   |
| ZNF543    | c.203G>A   | p.Trp68*          | Nonsense   |

| SM001.049 |                    |                  |                   |
|-----------|--------------------|------------------|-------------------|
| Gene      | Alteração          |                  | Tipo de alteração |
| ATM       | c.7000_7003delTACA | p.Tyr2334Glnfs*4 | Frameshift        |

| SM001.068 |             |                  |                   |
|-----------|-------------|------------------|-------------------|
| Gene      | Alteração   |                  | Tipo de alteração |
| CCL26     | c.132G>A    | p.Trp44*         | Nonsense          |
| CFAP74    | c.2214delC  | p.Gly739Valfs*33 | Frameshift        |
| CFHR5     | c.993C>A    | p.Cys331*        | Nonsense          |
| FRY       | c.5137A>G   | p.Thr1713Ala     | Missense          |
| HERC1     | c.6693C>G   | p.Tyr2231*       | Nonsense          |
| IGF2R     | c.1987G>T   | p.Val663Leu      | Missense          |
| IGF2R     | c.6575A>C   | p.Asn2192Thr     | Missense          |
| KIF24     | c.3478delTG | p.Thr1159X       | Frameshift        |
| LIFR      | c.1937C>A   | p.Thr646Asn      | Missense          |
| MLH1      | c.1852A>G   | p.Lys618Glu      | Missense          |



|          |                |                  |            |
|----------|----------------|------------------|------------|
| MLH1     | c.1853A>C      | p.Lys618Thr      | Missense   |
| NLRP1    | c.3518A>G      | p.Gln1173Arg     | Missense   |
| NR3C1    | c.1088A>G      | p.Asn363Ser      | Missense   |
| NUP214   | c.5017G>C      | p.Val1673Leu     | Missense   |
| PAX7     | c.644G>A       | p.Arg215His      | Missense   |
| PKHD1    | c.9577G>A      | p.Val3193Ile     | Missense   |
| PLEKHH1  | c.4042C>T      | p.Arg1348*       | Nonsense   |
| PTPRD    | c.2164G>T      | p.Ala722Ser      | Missense   |
| RSC1A1   | c.1601_1604del | p.Asp534Glyfs*36 | Frameshift |
| SPANXN4  | c.87_89del     | p.Lys29del       | Frameshift |
| SPTBN5   | c.3643C>T      | p.Arg1215*       | Nonsense   |
| TAS2R10  | c.912delAC     | p.Leu304X        | Frameshift |
| TRAF3IP1 | c.713A>G       | p.Glu238Gly      | Missense   |
| WDR31    | c.282T>G       | p.Asn94Lys       | Missense   |
| ZNF124   | c.633C>A       | p.Tyr211*        | Nonsense   |

| <b>SM001.088</b> |                  |                |                          |
|------------------|------------------|----------------|--------------------------|
| <b>Gene</b>      | <b>Alteração</b> |                | <b>Tipo de alteração</b> |
| <i>BCL11B</i>    | c.553T>A         | p.Cys185Ser    | Missense                 |
| <i>DPP7</i>      | c.673C>T         | p.Arg225*      | Nonsense                 |
| <i>DST</i>       | c.13760T>G       | p.Ile4587Ser   | Missense                 |
| <i>EP300</i>     | c.1540A>G        | p.Met514Val    | Missense                 |
| <i>ERBB2</i>     | c.1157C>A        | p.Ala386Asp    | Missense                 |
| <i>EXO1</i>      | c.1378G>C        | p.Val460Leu    | Missense                 |
| <i>FAM154A</i>   | c.1189C>T        | p.Arg397*      | Nonsense                 |
| <i>IRF4</i>      | c.541T>C         | p.Tyr181His    | Missense                 |
| <i>KRTAP24-1</i> | c.96delT         | p.Thr33Leufs*7 | Frameshift               |
| <i>LPHN3</i>     | c.3936C>G        | p.His1312Gln   | Missense                 |
| <i>MAP3K19</i>   | c.1069C>T        | p.Arg357*      | Nonsense                 |
| <i>NCOA1</i>     | c.1716A>T        | p.Arg572Ser    | Missense                 |
| <i>NOTCH2</i>    | c.4922A>C        | p.Lys1641Thr   | Missense                 |
| <i>NTRK1</i>     | c.14T>A          | p.Leu5Gln      | Missense                 |
| <i>SDHD</i>      | c.34G>A          | p.Gly12Ser     | Missense                 |
| <i>SYNE1</i>     | c.22516A>G       | p.Ser7506Gly   | Missense                 |
| <i>TBRG4</i>     | c.33delC         | p.Met12Trpfs*6 | Frameshift               |
| <i>VIT</i>       | c.702C>G         | p.Tyr234*      | Nonsense                 |
| <i>ZG16B</i>     | c.22G>T          | p.Glu8*        | Nonsense                 |
| <i>ZNF544</i>    | c.1843C>T        | p.Arg615*      | Nonsense                 |

**Anexo 7 - Quadro de variantes selecionadas após análise dos controles normais e verificação nos programas de predição de patogenicidade**

| Gene            | Alteração      |                  | Tipo de alteração | Paciente  | Lista de genes associados com risco de câncer de mama | Lista de genes frequentemente mutados em tumores |
|-----------------|----------------|------------------|-------------------|-----------|---|--|
| <i>A4GNT</i>    | c.796C>T       | p.Arg266*        | SNV               | MJ2015    |   |  |
| <i>ABCA4</i>    | c.3285C>A      | p.Tyr1095*       | SNV               | SM001.040 |   |  |
| <i>ADAMTS20</i> | c.4090T>A      | p.Tyr1364Asn     | SNV               | SUBJ1011  |   | X  |
| <i>AFF1</i>     | c.2651C>T      | p.Pro884Leu      | SNV               | MJ2037    |   | X  |
| <i>AKAP9</i>    | c.10249C>T     | p.Arg3417Cys     | SNV               | MJ2004    |   | X  |
| <i>ANGPTL3</i>  | c.575delA      | p.Gln192Argfs*5  | INDEL             | SM001.040 |   |  |
| <i>ANKRD2</i>   | c.349G>T       | p.Glu117*        | SNV               | MJ2037    |   |  |
| <i>ANKRD35</i>  | c.1510C>T      | p.Arg504*        | SNV               | MJ2037    |   |  |
| <i>APC</i>      | c.1604C>T      | p.Ser535Phe      | SNV               | SUBJ1011  | X   |  |
|                 | c.3949G>C      | p.Glu1317Gln     | SNV               | MJ2004    |   |  |
| <i>APOA5</i>    | c.990_993del   | p.Asp332Valfs*5  | INDEL             | SM001.040 |   |  |
| <i>ARHGAP8</i>  | c.244delC      | p.Arg82Glyfs*55  | INDEL             | MJ2004    |   |  |
| <i>ARID1B</i>   | c.2419C>T      | p.Pro807Ser      | SNV               | MJ2004    |   | X  |
| <i>ASPM</i>     | c.4213C>T      | p.Arg1405Cys     | SNV               | MJ2015    |   | X  |
|                 | c.676C>T       | p.Pro226Ser      | SNV               | SM001.021 |   |  |
|                 | c.6965A>C      | p.Tyr2322Ser     | SNV               | SM001.021 |   |  |
| <i>ATM</i>      | c.5558A>T      | p.Asp1853Val     | SNV               | MJ2003    | X   |  |
|                 | c.7000_7003del | p.Leu2332X       | INDEL             | SM001.049 |   |  |
| <i>ATRX</i>     | c.2595C>G      | p.His865Gln      | SNV               | MJ2001    |   | X  |
|                 | c.2484G>C      | p.Met828Ile      | SNV               | MJ2015    |   |  |
| <i>AXL</i>      | c.2414A>C      | p.Asn805Thr      | SNV               | MJ2004    |   | X  |
| <i>BAALC</i>    | c.409C>T       | p.Arg137*        | SNV               | MJ2037    |   |  |
| <i>BAR1</i>     | c.2215dupT     | Tyr739Leufs*2    | INDEL             | SUBJ1007  | X   |  |
| <i>BCL11B</i>   | c.553T>A       | p.Cys185Ser      | SNV               | SM001.088 |   |  |
| <i>BCL9</i>     | c.3633G>A      | p.Met1211Ile     | SNV               | MJ2004    |   | X  |
| <i>BCO2</i>     | c.211C>T       | p.Arg71*         | SNV               | MJ2014    |   |  |
| <i>BDH1</i>     | c.528delG      | p.Lys177Asnfs*39 | INDEL             | MJ2037    |   |  |

|                 |                  |                    |       |             |   |   |
|-----------------|------------------|--------------------|-------|-------------|---|---|
| <i>BMPR1A</i>   | c.1327C>T        | p.Arg443Cys        | SNV   | MJ2037      | X |   |
| <i>BRCA1</i>    | c.4963T>C        | p.Ser1655Pro       | SNV   | MJ2007/2012 | X |   |
|                 | c.5006C>T        | p.Ala1669Val       | SNV   | MJ2037      |   |   |
| <i>C19orf55</i> | c.261G>A         | p.Trp87*           | SNV   | SM001.021   |   |   |
| <i>C20orf96</i> | c.786delT        | p.Gln263Argfs*8    | INDEL | MJ2037      |   |   |
| <i>C7orf31</i>  | c.1375_1379del   | p.Asp459Leufs*5    | INDEL | SM001.021   |   |   |
| <i>C9orf3</i>   | c.813delT        | Val272Trpfs*5      | INDEL | MJ2001      |   |   |
| <i>CASC5</i>    | c.43A>G          | p.Ile15Val         | SNV   | MJ2007/2012 |   | X |
| <i>CASC5</i>    | c.4457T>C        | p.Ile1486Thr       | SNV   | SM001.021   |   | X |
| <i>CCDC27</i>   | c.454G>T         | p.Glu152*          | SNV   | MJ2016      |   |   |
| <i>CCL26</i>    | c.132G>A         | p.Trp44*           | SNV   | SM001.068   |   |   |
| <i>CCR5</i>     | c.550_582del     | p.Tyr184_Gln194del | INDEL | SUBJ1011    |   |   |
| <i>CCR5</i>     | c.550_582del     | p.Tyr184_Gln194del | INDEL | MJ2037      |   |   |
| <i>CD33</i>     | c.466_469del     | p.Gly156Thrfs*5    | INDEL | MJ2004      |   |   |
| <i>CD4</i>      | c.571A>G         | p.Lys191Glu        | SNV   | MJ2037      |   |   |
| <i>CEACAM20</i> | c.1536C>A        | p.Cys512*          | SNV   | MJ2016      |   |   |
| <i>CFAP74</i>   | c.2214delC       | p.Gly739Valfs*33   | INDEL | SM001.068   |   |   |
| <i>CFHR2</i>    | c.760C>T         | p.Arg254*          | SNV   | MJ2015      |   |   |
| <i>CFHR5</i>    | c.993C>A         | p.Cys331*          | SNV   | SM001.068   |   |   |
| <i>CHIT1</i>    | c.1048A>T        | p.Lys350*          | SNV   | MJ2014      |   |   |
| <i>CIB3</i>     | c.556C>T         | p.Arg186*          | SNV   | SM001.040   |   |   |
| <i>CRYGA</i>    | c.295C>T         | p.Arg99*           | SNV   | SM001.040   |   |   |
| <i>CSMD3</i>    | c.3644A>C        | p.Glu1215Ala       | SNV   | SUBJ1011    |   | X |
|                 | c.9623A>T        | p.Asn3208Ile       | SNV   | MJ2004      |   |   |
|                 | c.3059G>A        | p.Arg1020His       | SNV   | MJ2037      |   |   |
| <i>DMKN</i>     | c.528C>A         | p.Tyr176*          | SNV   | MJ2004      |   |   |
| <i>DNAH1</i>    | c.2241C>A        | p.Tyr747*          | SNV   | MJ2001      |   |   |
| <i>DNAH7</i>    | c.10359T>G       | p.Tyr3453*         | SNV   | MJ2014      |   |   |
| <i>DNAH7</i>    | c.10359T>G       | p.Tyr3453*         | SNV   | MJ2016      |   |   |
| <i>DPP7</i>     | c.673C>T         | p.Arg225*          | SNV   | SM001.088   |   |   |
| <i>DST</i>      | c.3458G>A        | p.Ser1153Asn       | SNV   | SM001.040   |   | X |
|                 | c.13760T>G       | p.Ile4587Ser       | SNV   | SM001.088   |   |   |
| <i>E2F7</i>     | c.2572G>C        | p.Val858Leu        | SNV   | MJ2037      |   | X |
| <i>EFCAB13</i>  | c.706C>T         | p.Arg236*          | SNV   | MJ2037      |   |   |
| <i>EFCAB5</i>   | c.1832_1833delAG | p.Glu611Valfs*66   | INDEL | MJ2014      |   |   |

|         |                  |                   |       |             |   |   |
|---------|------------------|-------------------|-------|-------------|---|---|
| EP300   | c.6488C>T        | p.Pro2163Leu      | SNV   | MJ2003      |   | X |
|         | c.1540A>G        | p.Met514Val       | SNV   | SM001.088   |   |   |
| ERBB2   | c.563G>A         | p.Arg188His       | SNV   | MJ2007/2012 | X |   |
|         | c.170A>G         | p.Gln57Arg        | SNV   | SM001.040   |   |   |
| ERCC1   | c.875G>A         | p.Trp292*         | SNV   | MJ2037      |   |   |
| ERCC4   | c.1031A>T        | p.Tyr344Phe       | SNV   | MJ2004      | X |   |
| ETS1    | c.860G>A         | p.Arg287His       | SNV   | SM001.040   |   | X |
| EVI2B   | c.1283T>C        | p.Ile428Thr       | SNV   | MJ2016      | X |   |
| EXT2    | c.1072C>T        | p.Arg358Trp       | SNV   | SM001.040   |   | X |
| FAM20A  | c.1373A>G        | p.Lys458Arg       | SNV   | MJ2015      | X |   |
| FAM217A | c.1525T>C        | p.*509Glnext*31   | SNV   | MJ2037      |   |   |
| FANCC   | c.416G>A         | p.Gly139Glu       | SNV   | MJ2001      | X |   |
| FLT1    | c.3602C>T        | p.Pro1201Leu      | SNV   | MJ2014      |   | X |
| FN1     | c.1070G>A        | p.Gly357Glu       | SNV   | MJ2037      |   | X |
| FRY     | c.5137A>G        | p.Thr1713Ala      | SNV   | SM001.068   |   | X |
| GALNT3  | c.484C>T         | p.Arg162*         | SNV   | MJ2014      |   |   |
| GCKR    | c.1618C>T        | p.Arg540*         | SNV   | MJ2014      |   |   |
| GJB4    | c.384G>A         | p.Trp128*         | SNV   | MJ2015      |   |   |
| GPR179  | c.6847_6848delCT | p.Leu2283Glyfs*36 | INDEL | SM001.040   |   |   |
| GRM8    | c.593C>G         | p.Pro198Arg       | SNV   | MJ2014      |   | X |
| HERC1   | c.6693C>G        | p.Tyr2231*        | SNV   | SM001.068   |   |   |
| HIF1A   | c.1957A>G        | p.Lys653Glu       | SNV   | MJ2001      |   | X |
| IGF2R   | c.1987G>T        | p.Val663Leu       | SNV   | SM001.068   |   | X |
|         | c.6575A>C        | p.Asn2192Thr      | SNV   | SM001.068   |   |   |
| IKBKB   | c.2028G>A        | p.Met676Ile       | SNV   | SM001.040   |   | X |
| IL4     | c.313C>T         | p.Arg105*         | SNV   | MJ2037      |   |   |
| IL7R    | c.376A>C         | p.Ile126Leu       | SNV   | MJ2003      |   | X |
| ITGA10  | c.3481A>G        | p.Arg1161Gly      | SNV   | MJ2003      |   | X |
|         | c.668G>A         | p.Arg223Gln       | SNV   | MJ2037      |   |   |
| ITGA9   | c.2845C>G        | p.Leu949Val       | SNV   | MJ2016      |   | X |
|         | c.2362G>A        | p.Val788Met       | SNV   | SM001.040   |   |   |
| KAT6A   | c.5926A>G        | p.Met1976Val      | SNV   | MJ2003      |   | X |
| KAT6B   | c.581C>T         | p.Ser194Leu       | SNV   | MJ2037      |   | X |
| KDELC2  | c.930_931delGA   | p.Arg310Serfs*6   | INDEL | MJ2016      |   |   |
| KDR     | c.2312C>T        | p.Thr771Met       | SNV   | MJ2037      |   | X |

|                  |                  |                   |       |             |   |   |
|------------------|------------------|-------------------|-------|-------------|---|---|
|                  | c.2525G>A        | p.Arg842His       | SNV   | MJ2037      |   |   |
| <i>KIAA1430</i>  | c.1217delG       | p.Gly406Glufs*38  | INDEL | SM001.040   |   |   |
| <i>KIF24</i>     | c.3478_3479delGT | p.Val1160Thrfs*9  | INDEL | SM001.068   |   |   |
| <i>KL</i>        | c.3033C>A        | p.Tyr1011*        | SNV   | SM001.021   |   |   |
| <i>KMT2C</i>     | c.9245C>T        | p.Pro3082Leu      | SNV   | MJ2013      |   | X |
|                  | c.4802A>G        | p.Asn1601Ser      | SNV   | MJ2037      |   |   |
| <i>KMT2D</i>     | c.14957G>A       | p.Arg4986His      | SNV   | MJ2014      |   | X |
| <i>KRT76</i>     | c.826G>T         | p.Glu276*         | SNV   | MJ2015      |   |   |
| <i>KRTAP24-1</i> | c.96delT         | p.Thr33Leufs*7    | INDEL | SM001.088   |   |   |
| <i>KRTAP29-1</i> | c.518_531del     | p.Pro173Argfs*2   | INDEL | MJ2001      |   |   |
| <i>LCN10</i>     | c.456C>G         | p.Tyr152*         | SNV   | MJ2037      |   |   |
| <i>LIFR</i>      | c.1937C>A        | p.Thr646Asn       | SNV   | MJ2037      |   | X |
|                  |                  |                   |       | SM001.068   |   |   |
| <i>LIPM</i>      | c.711delG        | p.Gly238Aspfs*26  | INDEL | SM001.021   |   |   |
| <i>LPAR6</i>     | c.921G>T         | p.Trp307Cys       | SNV   | MJ2001      | X |   |
|                  |                  |                   |       | MJ2015      |   |   |
| <i>LPHN3</i>     | c.1394G>A        | p.Arg465Gln       | SNV   | MJ2015      |   | X |
|                  | c.3936C>G        | p.His1312Gln      | SNV   | SM001.088   |   |   |
| <i>LPP</i>       | c.926G>A         | p.Gly309Asp       | SNV   | SUBJ1011    |   | X |
| <i>LRRC2</i>     | c.1114T>G        | p.*372Glyext*25   | SNV   | SM001.040   |   |   |
| <i>LRRC39</i>    | c.149_156del     | p.Thr50Lysfs*40   | INDEL | MJ2016      |   |   |
|                  |                  |                   |       | MJ2037      |   |   |
| <i>MAATS1</i>    | c.925G>T         | p.Glu309*         | SNV   | MJ2013      |   |   |
| <i>MAB21L3</i>   | c.739G>T         | p.Glu247*         | SNV   | MJ2007/2012 |   |   |
| <i>MALT1</i>     | c.824A>G         | p.Tyr275Cys       | SNV   | MJ2004      |   | X |
| <i>MAMDC4</i>    | c.3286delC       | p.Arg1096Alafs*54 | INDEL | SM001.040   |   |   |
| <i>MAML2</i>     | c.851C>T         | p.Thr284Ile       | SNV   | SUBJ1011    |   | X |
|                  | c.521G>A         | p.Gly174Asp       | SNV   | MJ2016      |   |   |
| <i>MARK1</i>     | c.1643G>A        | p.Arg548Gln       | SNV   | MJ2003      |   | X |
|                  | c.230C>G         | p.Ala77Gly        | SNV   | SM001.040   |   |   |
| <i>MAS1L</i>     | c.568delT        | p.Ser190Leufs*17  | INDEL | SM001.021   |   |   |
| <i>MCM9</i>      | c.3241C>T        | p.Arg1081*        | SNV   | MJ2004      |   |   |
| <i>MET</i>       | c.1451A>G        | p.His484Arg       | SNV   | MJ2007/2012 |   | X |
|                  | c.1444G>A        | p.Asp482Asn       | SNV   | SM001.040   |   |   |
| <i>MFSD6L</i>    | c.1267_1274del   | p.Thr423*         | INDEL | SM001.040   |   |   |

|                |           |                  |       |             |   |   |
|----------------|-----------|------------------|-------|-------------|---|---|
| <i>MICAL2</i>  | c.414delT | p.Gly139Alafs*33 | INDEL | SM001.040   |   |   |
| <i>MLH1</i>    | c.1852A>G | p.Lys618Glu      | SNV   | SM001.068   | X |   |
|                | c.1853A>C | p.Lys618Thr      | SNV   | SM001.068   |   |   |
| <i>MMP21</i>   | c.1203G>A | p.Trp401*        | SNV   | MJ2037      |   |   |
| <i>MMP8</i>    | c.925C>T  | p.Gln309*        | SNV   | MJ2004      |   |   |
| <i>MRE11A</i>  | c.529G>A  | p.Ala177Thr      | SNV   | MJ2014      | X |   |
| <i>MTNR1A</i>  | c.541C>T  | p.Gln181*        | SNV   | MJ2015      |   |   |
| <i>MTOR</i>    | c.985G>A  | p.Ala329Thr      | SNV   | MJ2016      |   | X |
| <i>MTRR</i>    | c.820C>T  | p.Pro274Ser      | SNV   | SM001.021   |   | X |
| <i>MUC1</i>    | c.76C>G   | p.Pro26Ala       | SNV   | SM001.021   |   | X |
| <i>MUC13</i>   | c.197C>T  | p.Thr66Ile       | SNV   | SM001.040   |   | X |
| <i>MYH11</i>   | c.3396G>C | p.Glu1132Asp     | SNV   | SM001.021   |   | X |
| <i>MYO1A</i>   | c.277C>T  | p.Arg93*         | SNV   | MJ2016      |   |   |
| <i>NCOA2</i>   | c.1882G>A | p.Gly628Arg      | SNV   | SUBJ1011    |   | X |
| <i>NLRP1</i>   | c.2815G>A | p.Val939Met      | SNV   | MJ2014      |   | X |
| <i>NOSTRIN</i> | c.394C>T  | p.Gln132*        | SNV   | MJ2014      |   |   |
| <i>NOTCH2</i>  | c.4922A>C | p.Lys1641Thr     | SNV   | SM001.088   |   | X |
| <i>NRG3</i>    | c.1612C>T | p.Arg538*        | SNV   | MJ2004      |   |   |
| <i>NTRK1</i>   | c.2272G>A | p.Ala758Thr      | SNV   | SM001.040   |   | X |
| <i>NUMA1</i>   | c.2170A>G | p.Arg724Gly      | SNV   | MJ2004      |   | X |
| <i>NUP98</i>   | c.5135G>A | p.Arg1712Gln     | SNV   | SM001.040   |   | X |
| <i>OAS3</i>    | c.2530C>T | p.Arg844*        | SNV   | MJ2003      |   |   |
| <i>OCEL1</i>   | c.748C>T  | p.Gln250*        | SNV   | MJ2013      |   |   |
| <i>ODF1</i>    | c.463G>A  | p.Glu155Lys      | SNV   | SM001.040   |   | X |
| <i>OR52K2</i>  | c.798dupA | Ala267Serfs*37   | INDEL | SUBJ1011    |   |   |
| <i>OR5H6</i>   | c.931A>G  | p.Lys311Glu      | SNV   | MJ2014      |   | X |
| <i>PARVG</i>   | c.952C>T  | p.Gln318*        | SNV   | MJ2013      |   |   |
| <i>PAX7</i>    | c.644G>A  | p.Arg215His      | SNV   | SM001.068   |   | X |
| <i>PDE4DIP</i> | c.953T>C  | p.Leu318Pro      | SNV   | MJ2037      |   | X |
| <i>PDGFRB</i>  | c.3287C>T | p.Ala1096Val     | SNV   | MJ2001      | X |   |
|                | c.581T>C  | p.Ile194Thr      | SNV   | MJ2007/2012 |   |   |
| <i>PKD1L2</i>  | c.4201C>T | p.Arg1401*       | SNV   | MJ2015      |   |   |
| <i>PKD2L1</i>  | c.413T>G  | p.Leu138*        | SNV   | SUBJ1011    |   |   |
| <i>PKHD1</i>   | c.5125C>T | p.Leu1709Phe     | SNV   | SM001.040   |   |   |
| <i>PLEKHG5</i> | c.325C>T  | p.Arg109Cys      | SNV   | MJ2003      |   |   |

|          |                |                  |       |             |   |   |
|----------|----------------|------------------|-------|-------------|---|---|
| PLEKHH1  | c.4042C>T      | p.Arg1348*       | SNV   | MJ2014      |   |   |
|          |                |                  |       | SM001.068   |   |   |
| POLA1    | c.3908T>C      | p.Met1303Thr     | SNV   | MJ2007/2012 |   | X |
| PON3     | c.94C>T        | p.Arg32*         | SNV   | MJ2016      |   |   |
| PTPMT1   | c.605G>C       | p.*202Serext*38  | SNV   | MJ2013      |   |   |
| PTPN22   | c.1859G>A      | p.Trp620*        | SNV   | MJ2001      |   |   |
|          | c.1856C>T      | p.Thr619Ile      | SNV   | MJ2007/2012 |   |   |
| PTPRD    | c.2164G>T      | p.Ala722Ser      | SNV   | MJ2016      |   | X |
|          |                |                  |       | SM001.068   |   |   |
| PTPRT    | c.1613A>T      | p.Gln538Leu      | SNV   | SUBJ1011    |   | X |
| PUS7L    | c.922C>T       | p.Arg308*        | SNV   | MJ2013      |   |   |
| PZP      | c.2038C>T      | p.Arg680*        | SNV   | MJ2016      |   |   |
| RAF1     | c.1241dupA     | p.Asp415Glyfs*33 | INDEL | MJ2016      |   |   |
| RB1      | c.2091C>G      | p.Asp697Glu      | SNV   | MJ2037      | X |   |
| RGS11    | c.970G>T       | p.Glu324*        | SNV   | SM001.040   |   |   |
| ROS1     | c.1108T>C      | p.Ser370Pro      | SNV   | MJ2007/2012 |   | X |
|          | c.6733G>A      | p.Gly2245Ser     | SNV   |             |   |   |
| RP1L1    | c.6118G>T      | p.Glu2040*       | SNV   | MJ2001      |   |   |
| RPE      | c.237G>A       | p.Trp79*         | SNV   | MJ2015      |   |   |
| RSC1A1   | c.1601_1604del | p.Asp534Glyfs*36 | INDEL | SM001.068   |   |   |
| SDHD     | c.34G>A        | p.Gly12Ser       | SNV   | SM001.088   | X |   |
| SEPT9    | c.829G>A       | p.Gly277Ser      | SNV   | SM001.040   | X |   |
| SH2D2A   | c.14T>A        | p.Leu5Gln        | SNV   | SM001.088   |   | X |
| SIGLEC12 | c.1522A>C      | p.Lys508Gln      | SNV   | MJ2037      | X |   |
| SLC22A16 | c.226delG      | p.Ala76Profs*66  | INDEL | MJ2007/2012 |   | X |
|          | c.599C>T       | p.Ala200Val      | SNV   | MJ2013      |   |   |
| SLC2A8   | c.802C>T       | p.Gln268*        | SNV   | MJ2014      |   |   |
| SLC5A4   | c.427delG      | p.Val143Serfs*15 | INDEL | MJ2007/2012 |   | X |
|          | c.1250C>T      | p.Ala417Val      | SNV   | MJ2013      |   |   |
| SLX4     | c.4766G>A      | p.Arg1589His     | SNV   | MJ2013      | X |   |
|          | c.3383A>C      | p.Gln1128Pro     | SNV   | MJ2014      |   |   |
| SPANXN4  | c.87_89del     | p.Lys29del       | INDEL | SM001.068   |   |   |
| SPNS3    | c.319C>T       | p.Arg107*        | SNV   | MJ2037      |   |   |
| SPTBN5   | c.3643C>T      | p.Arg1215*       | SNV   | SM001.068   |   |   |
| SUFU     | c.1325A>G      | p.Lys442Arg      | SNV   | MJ2003      |   | X |

|           |                |                  |       |             |   |
|-----------|----------------|------------------|-------|-------------|---|
| SYNE1     | c.7156A>G      | p.Ile2386Val     | SNV   | SUBJ1011    | X |
|           | c.9764C>T      | p.Ser3255Leu     | SNV   |             |   |
|           | c.12061T>C     | p.Cys4021Arg     | SNV   | MJ2003      |   |
|           | c.5227G>C      | p.Asp1743His     | SNV   | MJ2013      |   |
| TAS1R1    | c.2070delG     | Gln690Hisfs*6    | INDEL | SUBJ1011    |   |
| TAS2R10   | c.912_913delCA | p.Arg305Serfs*   | INDEL | SM001.068   |   |
| TAS2R8    | c.46G>T        | p.Glu16*         | SNV   | MJ2004      |   |
| TBRG4     | c.33delC       | p.Met12Trpfs*6   | INDEL | SM001.088   |   |
| TET2      | c.2429A>G      | p.Gln810Arg      | SNV   | MJ2001      | X |
|           | c.3251A>C      | p.Gln1084Pro     | SNV   | MJ2004      |   |
| TICAM2    | c.694C>T       | p.Gln232*        | SNV   | SM001.040   |   |
| TMEM159   | c.166dupC      | p.Leu56Profs*90  | INDEL | SM001.040   |   |
| TMPRSS11E | c.666_669del   | p.Ile222Metfs*6  | INDEL | SM001.021   |   |
| TNFRSF10C | c.271delT      | p.Cys91Valfs*13  | INDEL | SM001.040   |   |
| TOPBP1    | c.847A>G       | p.Lys283Glu      | SNV   | MJ2004      | X |
| TPR       | c.5119A>G      | p.Thr1707Ala     | SNV   | MJ2013      | X |
| TRAF3IP1  | c.713A>G       | p.Glu238Gly      | SNV   | SM001.068   | X |
| TSC2      | c.3584C>T      | p.Ala1195Val     | SNV   | MJ2014      | X |
| TSGA10    | c.2047C>T      | p.Arg683*        | SNV   | MJ2013      |   |
| TTC33     | c.677C>G       | p.Ser226*        | SNV   | SM001.021   |   |
| UBE2J1    | c.577G>C       | p.Gly193Arg      | SNV   | MJ2007/2012 | X |
| UCMA      | c.93delC       | p.Met32Cysfs*176 | INDEL | MJ2037      |   |
| UTRN      | c.4247A>G      | p.Gln1416Arg     | SNV   | SUBJ1011    | X |
| VIT       | c.702C>G       | p.Tyr234*        | SNV   | SM001.088   |   |
| WDR20     | c.1423G>T      | p.Gly475Cys      | SNV   | SM001.021   | X |
| WRN       | c.436A>G       | p.Lys146Glu      | SNV   | SM001.040   | X |
| XPC       | c.872C>G       | p.Ser291Cys      | SNV   | MJ2015      | X |
| ZG16B     | c.22G>T        | p.Glu8*          | SNV   | SM001.088   |   |
| ZNF117    | c.435dupC      | Phe146Leufs*2    | INDEL | SUBJ1011    |   |
| ZNF124    | c.633C>A       | p.Tyr211*        | SNV   | SM001.068   |   |
| ZNF25     | c.13C>T        | p.Gln5*          | SNV   | MJ2037      |   |
| ZNF491    | c.451C>T       | p.Arg151*        | SNV   | MJ2037      |   |
| ZNF521    | c.2579C>T      | p.Thr860Ile      | SNV   | MJ2013      | X |
| ZNF574    | c.1831G>A      | p.Glu611Lys      | SNV   | MJ2001      | X |
| ZNF844    | c.1044_1048del | p.Tyr348*        | INDEL | SM001.021   |   |



**Anexo 8 - Referências utilizadas para cada gene cuja variante foi validada nos respectivos pacientes**

| Gene     | NM Referência  | Paciente                         | Gene   | NM Referência  | Paciente                  |
|----------|----------------|----------------------------------|--------|----------------|---------------------------|
| A4GNT    | NM_016161.2    | MJ2015                           | MARK1  | NM_001286124.1 | MJ2003, SM001.040         |
| ABCA4    | NM_000350.2    | SM001.040                        | MAS1L  | NM_052967.1.3  | SM001.021                 |
| ADAMTS20 | NM_025003.3    | SUBJ1011                         | MCM9   | NM_017696.2    | MJ2004                    |
| AFF1     | NM_001166693.1 | MJ2037                           | MDC1   | NM_014641.2.2  | SM001.040                 |
| AKAP9    | NM_005751.4    | MJ2004, MJ2013                   | MET    | NM_001127500.1 | MJ2007/MJ2012, SM0001.040 |
| ANGPTL3  | NM_014495.3    | SM001.040                        | MFSD6L | NM_152599.3    | SM001.040                 |
| ANKRD2   | NM_020349.2    | MJ2037                           | MICAL2 | NM_014632.3    | SM001.040                 |
| ANKRD35  | NM_144698.4    | MJ2037                           | MLH1   | NM_000249.3    | SM001.068                 |
| APC      | NM_001127510.2 | SUBJ1011, MJ2004                 | MMP21  | NM_147191.1    | MJ2037                    |
| APOA5    | NM_001166598.1 | SM001.040                        | MMP8   | NM_002424.2    | MJ2004                    |
| ARHGAP8  | NM_001017526.1 | MJ2004                           | MRE11A | NM_005591.3    | MJ2014                    |
| ARID1B   | NM_020732.3    | MJ2004                           | MTNR1A | NM_005958.3    | MJ2015                    |
| ASPM     | NM_018136.4    | MJ2015, SM001.021                | MTOR   | NM_004958.3    | MJ2016                    |
| ASXL1    | NM_015338.5    | SUBJ1011                         | MTR    | NM_000254.2    | MJ2003                    |
| ATM      | NM_000051.3    | MJ2003, MJ2016, SM001.049        | MTRR   | NM_024010.2    | SM001.021                 |
| ATR      | NM_001184.3    | MJ2003                           | MUC1   | NM_001204286.1 | SM001.021                 |
| ATRX     | NM_000489.4    | SUBJ1011, MJ2001, MJ2015, MJ2016 | MUC13  | NM_033049.3    | SM001.040                 |
| AXL      | NM_021913.4    | MJ2004                           | MYH11  | NM_001040114.1 | MJ2037, SM001.021         |
| BAALC    | NM_024812.2    | MJ2037                           | MYO1A  | NM_001256041.1 | MJ2016                    |
| BARD1    | NM_000465.3    | SUBJ1007                         | NBN    | NM_002485.4    | MJ2013                    |
| BCL11B   | NM_138576.3    | SM001.088                        | NCOA1  | NM_003743.4    | SM001.088                 |
| BCL9     | NM_004326.3    | MJ2004                           | NCOA2  | NM_006540.2    | SUBJ1011                  |
| BCO2     | NM_031938.5    | MJ2014                           | NLRP1  | NM_033004.3    | MJ2014, MJ2037, SM001.068 |

|          |                |                          |         |                |                                      |
|----------|----------------|--------------------------|---------|----------------|--------------------------------------|
| BDH1     | NM_203314.2    | MJ2037                   | NOSTRIN | NM_001171631.1 | MJ2014                               |
| BMPR1A   | NM_004329.2    | MJ2037                   | NOTCH2  | NM_024408.3    | SM001.088                            |
| BRCA1    | NM_007294.3    | MJ2007/MJ2012, MJ2037    | NR3C1   | NM_001024094.1 | SM001.068                            |
| BRCA2    | NM_000059.3    | MJ2015, SM001.040        | NRG3    | NM_001010848.3 | MJ2004                               |
| BRIP1    | NM_032043.2    | MJ2015, MJ2016           | NTRK1   | NM_002529.3    | MJ2037, SM001.040                    |
| C11orf40 | NM_144663.1    | MJ2004                   | NUMA1   | NM_006185.3    | MJ2004                               |
| C19orf55 | NM_001039887.2 | SM001.021                | NUP214  | NM_005085.3    | MJ2037, SM001.068                    |
| C20orf96 | NM_153269.2    | MJ2037                   | NUP98   | NM_016320.4    | SM001.040                            |
| C7orf31  | NM_138811.3    | SM001.021                | OAS3    | NM_006187.2    | MJ2003                               |
| C9orf3   | NM_001193329.1 | MJ2001                   | OCEL1   | NM_024578.1    | MJ2013                               |
| CARD11   | NM_032415.5    | SM001.040                | ODF1    | NM_024410.3    | SM001.040                            |
| CASC5    | NM_170589.4    | MJ2007/MJ2012, SM001.021 | OR52K2  | NM_001005172.2 | SUBJ1011                             |
| CCDC27   | NM_152492.2    | MJ2016                   | OR5H6   | NM_001005479.1 | MJ2014                               |
| CCL26    | NM_006072.4    | SM001.068                | OVGP1   | NM_002557.3    | MJ2004                               |
| CCR5     | NM_000579.3    | SUBJ1011, MJ2037         | PARVG   | NM_022141.6    | MJ2013                               |
| CD33     | NM_001772.3    | MJ2004                   | PAX7    | NM_002584.2    | SM001.068                            |
| CD4      | NM_000616.4    | MJ2037                   | PDE4DIP | NM_001198834.3 | MJ2037                               |
| CD79B    | NM_001039933.1 | MJ2013                   | PDGFRA  | NM_006206.4    | MJ2014                               |
| CDK12    | NM_016507.2    | MJ2015                   | PDGFRB  | NM_002609.3    | MJ2001, MJ2007/MJ2012, SM001.021     |
| CEACAM20 | NM_001102597.1 | MJ2016                   | PIK3R2  | NM_005027.3    | SM001.040                            |
| CFHR2    | NM_005666.2    | MJ2015                   | PKD1L2  | NM_052892.3    | MJ2015, MJ2037, SM001.088            |
| CFHR5    | NM_030787.3    | SM001.068                | PKD2L1  | NM_016112.2    | SUBJ1011                             |
| CHIT1    | NM_003465.2    | MJ2014                   | PKHD1   | NM_138694.3    | MJ2004, MJ2037, SM001.040, SM001.068 |
| CIB3     | NM_054113.2    | SM001.040                | PLEKHG5 | NM_001265592.1 | MJ2003                               |
| CRYGA    | NM_014617.3    | SM001.040                | PLEKHH1 | NM_020715.2    | MJ2014, SM001.068                    |
| CSF1R    | NM_005211.3    | MJ2015, SM001.040        | POLA1   | NM_016937.3    | MJ2007/2012                          |
| CSMD3    | NM_198123.1    | SUBJ1011, MJ2004, MJ2037 | PON3    | NM_000940.2    | MJ2016                               |

|         |                |                                     |          |                |                                  |
|---------|----------------|-------------------------------------|----------|----------------|----------------------------------|
| DMKN    | NM_033317.4    | MJ2004                              | POT1     | NM_015450.2    | MJ2004, SM001.021                |
| DNAH1   | NM_015512.4    | MJ2001                              | PRIM2    | NM_000947.3    | SM001.021, SM001.040             |
| DNAH5   | NM_001369.2    | MJ2013                              | PRKAR1A  | NM_017565.3    | MJ2001, MJ2015                   |
| DNAH7   | NM_018897.2    | MJ2014, MJ2016                      | PRKDC    | NM_006904.6    | MJ2014                           |
| DPP7    | NM_013379.2    | SM001.088                           | PTGS2    | NM_000963.2    | SUBJ1011                         |
| DST     | NM_001144769.2 | SM001.021, SM001.040                | PTPMT1   | NM_175732.2    | MJ2013                           |
| E2F7    | NM_203394.2    | MJ2037                              | PTPN22   | NM_015967.5    | MJ2001                           |
| EFCAB13 | NM_152347.4    | MJ2037                              | PTPRD    | NM_002839.3    | MJ2007/MJ2012, MJ2016, SM001.068 |
| EFCAB5  | NM_198529.3    | MJ2014                              | PTPRT    | NM_133170.3    | SUBJ1011                         |
| EP300   | NM_001429.3    | MJ2003, SM00.088                    | PUS7L    | NM_031292.4    | MJ2013                           |
| EP400   | NM_015409.4    | MJ2004                              | PZP      | NM_002864.2    | MJ2016                           |
| ERBB2   | NM_004448.2    | MJ2007/MJ2012, SM001.040, SM001.088 | RAF1     | NM_002880.3    | MJ2016                           |
| ERCC1   | NM_202001.2    | MJ2037                              | RB1      | NM_000321.2    | MJ2037                           |
| ERCC4   | NM_005236.2    | MJ2004                              | RGS11    | NM_183337.2    | SM001.040                        |
| ETS1    | NM_001143820.1 | SM001.040                           | RNF213   | NM_001256071.1 | MJ2013, SM001.021                |
| EVI2B   | NM_006495.3    | MJ2016                              | ROS1     | NM_002944.2    | MJ2007/2012                      |
| EXO1    | NM_006027.4    | SM001.088                           | RP1L1    | NM_178857.5    | MJ2001                           |
| EXT2    | NM_000401.3    | SM001.040                           | RPE      | NM_199229.2    | MJ2015                           |
| FAM154A | NM_153707.2    | SM001.088                           | RSC1A1   | NM_006511.1    | SM001.068                        |
| FAM217A | NM_173563.2    | MJ2037                              | SAMD9    | NM_001193307.1 | MJ2003, SM001.040                |
| FANCC   | NM_000136.2    | MJ2001                              | SDHD     | NM_003002.3    | SM001.088                        |
| FANCD2  | NM_033084.3    | MJ2003                              | SEPT9    | NM_001113491.1 | SM001.040                        |
| FLT1    | NM_002019.4    | MJ2014                              | SETMAR   | NM_006515.3    | SM001.040                        |
| FN1     | NM_212482.1    | MJ2037                              | SH2D2A   | NM_001161441.1 | SM001.088                        |
| FOLR3   | NM_000804.2    | MJ2004                              | SIGLEC12 | NM_053003.3    | MJ2037                           |
| FRY     | NM_023037.2    | SM001.068                           | SLC22A16 | NM_033125.3    | MJ2004, MJ2007/MJ2012, MJ2013    |
| GALNT3  | NM_004482.3    | MJ2014                              | SLC2A8   | NM_014580.4    | MJ2014                           |

|          |                |                   |           |                |                                     |
|----------|----------------|-------------------|-----------|----------------|-------------------------------------|
| GCKR     | NM_001486.3    | MJ2014            | SLC5A4    | NM_014227.2    | MJ2007/MJ2012, MJ2013, SM001.040    |
| GJB4     | NM_153212.2    | MJ2015            | SLX4      | NM_032444.2    | MJ2013 MJ2014, MJ2016, SM001.021    |
| GPR179   | NM_001004334.2 | SM001.040         | SPANXN4   | NM_001009613.2 | SM001.068                           |
| GRM8     | NM_000845.2    | MJ2014            | SPNS3     | NM_182538.4    | MJ2037                              |
| HERC1    | NM_003922.3    | SM001.068         | SPTBN5    | NM_016642.3    | SM001.068                           |
| HIF1A    | NM_001243084.1 | MJ2001            | STK36     | NM_015690.4    | MJ2001, MJ2015                      |
| HRNR     | NM_001009931.2 | MJ2014            | SUFU      | NM_016169.3    | MJ2003                              |
| HSP90AA1 | NM_001017963.2 | MJ2037            | SYNE1     | NM_182961.3    | SUBJ1011, MJ2003, MJ2013, SM001.088 |
| HSP90AB1 | NM_001271969.1 | MJ2015            | TAS1R1    | NM_138697.3    | SUBJ1011                            |
| IGF2R    | NM_000876.2    | SM001.068         | TAS2R10   | NM_023921.1    | SM001.068                           |
| IKBKB    | NM_001556.2    | SM001.040         | TAS2R8    | NM_023918.1    | MJ2004                              |
| IKBKE    | NM_014002.3    | MJ2037            | TBRG4     | NM_001261834.1 | SM001.088                           |
| IL4      | NM_000589.3    | MJ2037            | TET2      | NM_001127208.2 | MJ2001, MJ2004, SM001.040           |
| IL7R     | NM_002185.3    | MJ2003            | TGM7      | NM_052955.2    | MJ2003                              |
| IRF4     | NM_002460.3    | SM001.088         | TICAM2    | NM_021649.6    | SM001.040                           |
| ITGA10   | NM_003637.3    | MJ2003, MJ2037    | TLR4      | NM_138554.4    | SM001.021                           |
| ITGA9    | NM_002207.2    | MJ2016, SM001.040 | TMEM159   | NM_020422.4    | SM001.040                           |
| ITIH3    | NM_002217.3    | MJ2037            | TMPRSS11E | NM_014058.3    | SM001.021                           |
| KAT6A    | NM_001099413.1 | MJ2003            | TNFRSF10C | NM_003841.3    | SM001.040                           |
| KAT6B    | NM_012330.3    | MJ2037            | TOPBP1    | NM_007027.3    | MJ2004                              |
| KDEL2    | NM_153705.4    | MJ2016            | TPR       | NM_003292.2    | MJ2013                              |
| KDR      | NM_002253.2    | MJ2014, MJ2037    | TRAF3IP1  | NM_015650.3    | SM001.068                           |
| KIAA1430 | NM_020827.1    | SM001.040         | TSC2      | NM_000548.3    | MJ2014                              |
| KIAA1751 | NM_001080484.1 | SM001.068         | TSGA10    | NM_025244.2    | MJ2013                              |
| KIAA1919 | NM_153369.2    | MJ2003            | TTC33     | NM_012382.2    | SM001.021                           |
| KIF24    | NM_194313.2    | SM001.068         | UBE2J1    | NM_016021.2    | MJ2007/2012                         |
| KL       | NM_004795.3    | SM001.021         | UCMA      | NM_145314.1    | MJ2037                              |

|           |                |                           |        |                |                          |
|-----------|----------------|---------------------------|--------|----------------|--------------------------|
| KMT2C     | NM_170606.2    | MJ2013, MJ2037            | UHRF1  | NM_013282.3    | MJ2007/2012              |
| KMT2D     | NM_003482.3    | MJ2014                    | USP35  | NM_020798.2    | MJ2001, MJ2037           |
| KRT76     | NM_015848.4    | MJ2015                    | UTRN   | NM_007124.2    | SUBJ1011, MJ2001, MJ2014 |
| KRTAP24-1 | NM_001085455.1 | SM001.088                 | VIT    | NM_053276.3    | SM001.088                |
| KRTAP29-1 | NM_001257309.1 | MJ2001                    | WDR20  | NM_001242417.1 | SM001.021                |
| LCN10     | NM_001001712.2 | MJ2037                    | WDR31  | NM_001012361.2 | MJ2014, SM001.068        |
| LIFR      | NM_001127671.1 | MJ2037, SM001.068         | WRN    | NM_000553.4    | SM001.040                |
| LIPM      | NM_001128215.1 | SM001.021                 | WWTR1  | NM_001168278.1 | SUBJ1011, MJ2004         |
| LPAR6     | NM_001162497.1 | MJ2001, MJ2015            | XPC    | NM_004628.4    | MJ2015                   |
| LPHN3     | NM_015236.4    | MJ2015, MJ2037, SM001.088 | ZG16B  | NM_145252.2    | SM001.088                |
| LPP       | NM_005578.3    | SUBJ1011, MJ2004          | ZNF117 | NM_015852.3    | SUBJ1011                 |
| LRRC2     | NM_024512.4    | SM001.040                 | ZNF124 | NM_003431.2    | SM001.068                |
| LRRC39    | NM_001256385.1 | MJ2016, MJ2037            | ZNF217 | NM_006526.2    | MJ2003, MJ2013, MJ2016   |
| LTK       | NM_002344.5    | SM001.040                 | ZNF25  | NM_145011.2    | MJ2037                   |
| MAATS1    | NM_033364.3    | MJ2013                    | ZNF491 | NM_152356.3    | MJ2037                   |
| MAB21L3   | NM_152367.2    | MJ2007/2012               | ZNF521 | NM_015461.2    | MJ2013                   |
| MALT1     | NM_006785.3    | MJ2004                    | ZNF543 | NM_213598.3    | SM001.040                |
| MAMDC4    | NM_206920.2    | SM001.040                 | ZNF544 | NM_014480.2    | SM001.088                |
| MAML2     | NM_032427.2    | SUBJ1011, MJ2003, MJ2016  | ZNF574 | NM_022752.5    | MJ2001                   |
| MAP3K19   | NM_025052.4    | SM001.088                 | ZNF844 | NM_001136501.1 | SM001.021                |