

**AVALIAÇÃO DO SILENCIAMENTO DE *BRCA1* POR
MECANISMOS EPIGENÉTICOS E GENÉTICOS EM
CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO
METASTÁTICO E SUA ASSOCIAÇÃO COM
ANCESTRALIDADE E PROGNÓSTICO**

JULIA SALLES OLIVEIRA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção de Título de Mestre em
Ciências.**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Dirce Maria Carraro

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente

Oliveira, Julia Salles

Avaliação do silenciamento de *BRCA1* por mecanismos epigenéticos e genéticos em câncer de mama triplo-negativo metastático e sua associação com ancestralidade e prognóstico. / Julia Salles Oliveira - São Paulo, 2021. 106p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Dirce Maria Carraro

Descritores. 1. Neoplasia da mama. 2. Neoplasia da mama triplo-negativo. 3. Metástase. 4. Deficiência recombinação homóloga. 5. Genes *BRCA1* e *BRCA2*. 6. Gene *RAD51C*. 7. Ancestralidade genética.

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2779

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de auxílio à Pesquisa – bolsa de Mestrado de julho de 2019 à fevereiro de 2020. Também recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), através de auxílio à Pesquisa – bolsa de Mestrado (processo número 2019/22749-0) de março de 2020 à setembro de 2020.

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Cintia, e à minha avó, Lita.

A todas as mulheres que lutam diariamente contra essa doença.

A todos que lutam a favor da ciência brasileira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe, que sempre batalhou para dar uma vida digna para mim e minha irmã, e que nunca hesitou em me incentivar a estudar e correr atrás dos meus sonhos.

Agradeço à minha avó, que sempre cuidou de todas nós, e que me ensinou a ser teimosa – indiretamente – para que eu conseguisse o que eu quisesse. Afinal de contas, o “não” eu sempre tive.

Agradeço ao Prof. Dr. Wagner Ricardo Montor, por ter me apresentado o mundo da ciência e por ter me ensinado muito, como pessoa e como profissional. E, ainda, por ter sido, e ainda ser, minha maior inspiração profissional.

Agradeço a todos do grupo Laboratório de Genômica e Biologia Molecular por todo suporte e apoio. Em especial, à Dra. Giovana Tardin Torrezan, por ter me selecionado, em 2019, como aluna de iniciação científica, à Dra. Dirce Maria Carraro, que tornou tudo isso possível, e ao Dr. Rafael Canfield Brianese que me guiou nos momentos bons e ruins. Também agradeço às amigas que tive o imenso prazer de fazer durante essa jornada: Ana Carolina Araújo, Ana Carolina Kerekes, Débora Andrade, Nathália de Angelis e Sara Oliveira. Obrigada por tanto, meninas!

Agradeço à equipe do Biobanco e da Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center e a todos os profissionais do Centro Internacional de Ensino e Pesquisa (CIPE).

Agradeço ao meu namorado, Guilherme Ruiz, por todo amor e por se manter ao meu lado, me motivando a ser uma pessoa melhor, bem como a correr atrás dos meus sonhos.

Por fim, agradeço a CAPES e à FAPESP pelo fomento financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

RESUMO

Oliveira JS. **Avaliação do silenciamento de *BRCA1* por mecanismos epigenéticos e genéticos em câncer de mama triplo-negativo metastático e sua associação com ancestralidade e prognóstico.** [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2021.

Introdução e contexto: O câncer de mama do subtipo triplo-negativo (TN) representa cerca de 15% de todos os cânceres de mama e é negativo para expressão dos receptores de estrógeno e progesterona e superexpressão/amplificação de HER2. É mais prevalente em mulheres jovens e negras, apresenta maior risco de desenvolvimento de metástases e pior prognóstico. Parte significativa de tumores TN apresentam deficiência na via de reparo de recombinação homóloga (DRH), resultado de mecanismos genéticos, como variantes P/PP germinativas em *BRCA1/2*, sendo mutação em *BRCA1* a mais frequente, e/ou silenciamento epigenético de *BRCA1* e *RAD51C* no tumor. Não há dados sobre o status de mutação germinativa em *BRCA1/2* em relação ao padrão metastático dos TN e nem em relação a mecanismos envolvidos na DRH em mulheres brasileiras. **Objetivos:** Avaliar o status de mutação germinativa nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em mulheres com tumores TN e sua associação com padrão metastático, mecanismos de DRH e ancestralidade. **Metodologia:** Estudo retrospectivo unicêntrico. A avaliação de *BRCA1/2* foi realizada a partir do DNA de leucócito/tecido não tumoral, e quando não disponíveis, tecido tumoral fresco ou emblocado em parafina. O status de metilação de *BRCA1* e *RAD51C* foi determinado por sequenciamento de próxima geração (NGS) de amplicon usando DNA tumoral tratado com bissulfito de sódio; o critério de classificação foi $\geq 40\%$ hipermetilado; entre $\geq 20\%$ à $< 40\%$ intermediário. A análise de ancestralidade foi realizada por eletroforese capilar com análise de fragmentos ou por genotipagem usando o array PMDA, utilizando DNA de leucócito. Informações clínicas de toda a casuística foram obtidas dos prontuários eletrônicos disponíveis na Instituição. **Resultados:** Foram incluídos 400 casos de tumores TN, 132 com diagnóstico de metástase e 268 sem metástase. A caracterização genética de *BRCA1/2* foi obtida para 399 casos, sendo que 21,6% (86/399) apresentaram variantes patogênicas (P) ou provavelmente patogênicas (PP), onde 81,4% (70/86) das portadoras de variantes P/PP eram portadoras de variante P/PP em *BRCA1*, correspondendo a 17,5% dos casos avaliados (70/399), e 18,6% (16/86) portadoras de variante P/PP em *BRCA2*, correspondendo a 4,0% dos casos (16/399). A média de idade ao diagnóstico foi menor para portadoras de

variantes P/PP em *BRCA1* que apresentaram idade de 41,7 anos, sendo que a idade das portadoras de variantes P/PP em *BRCA2* e mulheres sem variantes P/PP ou VUS (do inglês, *variant of uncertain significance*) foi de 47,1 e 47,9 anos, respectivamente. Dos casos metastáticos, 131 tiveram *BRCA1/2* testados, sendo 12,2% (16/131) *BRCA1*-P/PP e 6,1% (8/131) *BRCA2*-P/PP. Em relação ao padrão metastático dos tumores TN, os sítios mais acometidos em *BRCA1*-P/PP e sem variantes P/PP foram pulmão (50% e 37%, respectivamente) e SNC (31% e 23%, respectivamente), enquanto que para *BRCA2*-P/PP, os sítios mais acometidos foram SNC (62%) e ossos (37%). Em análise com modelos de regressão logística multivariada, observou-se que o risco para desenvolver metástase no grupo *BRCA2*-P/PP foi significativamente maior, chegando a quase 4 vezes mais para desenvolver em SNC ($p=0,035$) quando comparado com o grupo sem variantes P/PP e perto da significância ($p=0,067$) para desenvolver em ossos. O grupo *BRCA1*-P/PP não apresentou risco aumentado quando comparado com o grupo sem variantes P/PP. A análise de metilação nos genes *BRCA1/RAD51C* foi realizada no tumor primário para 177 casos, apresentando hipermetilação de 55,4% em um dos dois genes, sendo 43,5% (77/177) hipermetilados em *BRCA1*; e para *RAD51C*, 11,9% (21/177) hipermetilados. Já a análise de metilação nos tumores metastáticos foi realizada para 25 casos, sendo 32% hipermetilados em um dos dois genes, sendo 20% (5/25) hipermetilados em *BRCA1* e 12% (3/25) em *RAD51C*. A análise de ancestralidade foi realizada para 216 casos, onde a maioria (68%) foi classificada como ancestralidade predominantemente europeia; foi investigada se havia associação entre as ancestralidades e o evento genético ou epigenético subjacente a DRH, porém não ficou evidente nenhuma associação. **Conclusões:** *BRCA1* confirmou ser o gene que mais frequentemente apresenta variantes P/PP em mulheres com CMTN, principalmente em mulheres diagnosticadas em idade jovem. A maioria dos casos cujo DNA tumoral apresentou hipermetilação em um dos dois genes investigados (*BRCA1* e *RAD51C*) foram em mulheres jovens, sendo o gene *BRCA1* mais frequentemente metilado. Observou-se que há um risco elevado de até 4 vezes para desenvolver metástase no SNC no grupo de mulheres com *BRCA2*-PP. Não foi possível estabelecer associação significativa entre os mecanismos genéticos e epigenéticos subjacentes a DRH com ancestralidades europeias ou africanas na população estudada.

ABSTRACT

Oliveira JS. **Evaluation of *BRCA1* silencing by epigenetic and genetic mechanisms in metastatic triple-negative breast cancer and its association with ancestry and prognosis.**[Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2021.

Introduction: Triple-negative (TN) subtype breast cancer accounts for about 15% of all breast cancers and is negative for estrogen and progesterone receptor expression and HER2 overexpression/amplification. It is more prevalent in young, black women, has a higher risk of developing metastases and a worse prognosis. A significant part of TN tumors have a deficiency in the homologous recombination repair (HRD) pathway, resulting from genetic mechanisms, such as germline pathogenic mutations in *BRCA1/2*, with *BRCA1* being the most frequent mutation, and/or epigenetic silencing of *BRCA1* and *RAD51C* in the tumor. There are no data regarding *BRCA1/2* germline mutation status in relation to the metastatic pattern of TN tumors or about the mechanisms involved in HRD in Brazilian women. **Objectives:** To evaluate the germline mutation status in *BRCA1* and *BRCA2* genes in women with TNBC and its association with metastatic pattern, HRD mechanisms and ancestry. **Methodology:** Single-center retrospective study. *BRCA1/2* evaluation was performed from leukocyte/non-tumor tissue DNA, and when not available, fresh tumor tissue or embedded in paraffin. The methylation status of *BRCA1* and *RAD51C* was determined by next-generation amplicon sequencing (NGS) using tumor DNA treated with sodium bisulfite; the classification criteria was $\geq 40\%$ hypermethylated; between 20% to $\leq 39\%$ intermediate. Ancestry analysis was performed by capillary electrophoresis with fragment analysis using the PMDA array using leukocyte DNA. Clinical information from the entire sample was obtained from electronic medical records available at the institution. **Results:** 400 cases of TNBC were included, 132 diagnosed with metastasis and 268 without metastasis. The genetic characterization of *BRCA1/2* was obtained for 399 cases, and 21.6% (86/399) presented pathogenic (P) or probably pathogenic (PP) variants, where 81.4% (70/86) of the carriers of P/PP variants carried a pathogenic variant in *BRCA1*, corresponding to 17.5% of the evaluated cases (70/399), and 18.6% (16/86) carried P/PP variants in *BRCA2*, corresponding to 4, 0% of cases (16/399). The mean age at diagnosis was lower for carriers of P/PP variants in *BRCA1*, who were 41.7 years old, and the age of carriers of P/PP variants in *BRCA2* and women without P/PP or VUS (Variant of Uncertain Significance) was 47.1 and 47.9 years, respectively. In regarding to metastatic cases, 131 had

BRCA1/2 tested, with 12.2% (16/131) *BRCA1*-P/PP and 6.1% (8/131) *BRCA2*-P/PP. Regarding the metastatic pattern of TN tumors, the most affected sites in *BRCA1*-P/PP and without P/PP variants were lung (50% and 37%, respectively) and CNS (31% and 23%, respectively), while for *BRCA2*-P/PP, the most affected sites were the CNS (62%) and bones (37%). In analysis with multivariate logistic regression models, it was observed that the risk of developing metastasis in the *BRCA2*-P/PP group was significantly higher, reaching almost 4 times more to develop in the CNS ($p=0.035$) when compared to the group without P/PP variants and close to significance ($p=0.067$) to develop in bone. The *BRCA1*-P/PP group was not at increased risk when compared to the group without P/PP variants. The analysis of methylation in the *BRCA1/RAD51C* genes was performed in the primary tumor for 177 cases, showing 55.4% hypermethylation in one of the two genes, with 43.5% (77/177) being hypermethylated in *BRCA1*; and for *RAD51C*, 11.9% (21/177) hypermethylated. The analysis of methylation in metastatic tumors was performed for 25 cases, 32% of which were hypermethylated in one of the two genes, 20% (5/25) hypermethylated in *BRCA1* and 12% (3/25) in *RAD51C*. Ancestry analysis was performed for 216 cases, where the majority (68%) were classified as predominantly European ancestry; it was investigated whether there was an association between ancestry and the genetic or epigenetic event underlying the HRD, but no association was evident. **Conclusions:** *BRCA1* confirmed to be the gene that most frequently presents P/PP variants in women with TNBC, mainly in women diagnosed at a young age. Most cases whose tumor DNA showed hypermethylation in one of the two genes investigated (*BRCA1* and *RAD51C*) were in young women, with the *BRCA1* gene being more frequently methylated. It was observed that there is an up to 4-fold increased risk of developing CNS metastasis in the group of women with *BRCA2*-PP. It was not possible to establish a significant association between the genetic and epigenetic mechanisms underlying HRD with European or African ancestry in the population studied.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo de reparo de DNA por recombinação homóloga.	6
Figura 2	Metilação do DNA	7
Figura 3	O papel dos inibidores de PARP na letalidade sintética	8
Figura 4	Seleção da casuística.	14
Figura 5	Gel de agarose 2% da amplificação das regiões alvos dos genes <i>BRCA1</i> e <i>RAD51C</i> . (1) <i>Ladder</i> (Marcador de peso molecular); (2) Controle negativo; (3) Controle positivo (DNA metilado); (4-13) Amostras de DNA tumoral convertidas por bissulfito.	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência de <i>primers</i> utilizados na PCR para sequenciamento na plataforma Ion Proton, assim como suas <i>Tmelting</i> .	18
Tabela 2	Reação de PCR para análise de metilação dos genes <i>BRCA1</i> e <i>RAD51C</i> .	19
Tabela 3	Condições da PCR	19
Tabela 4	Variantes genéticas P/PP encontradas em <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> e suas classificações.	26
Tabela 5	Variantes de significado incerto (VUS) encontradas em <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> .	30
Tabela 6	Dados clínicos dos 399 casos caracterizados geneticamente para <i>BRCA1/2</i> .	31
Tabela 7	Sítios anatômicos acometidos por metástase considerando todos os eventos e o primeiro evento metastático (n=132).	32
Tabela 8	Sítios anatômicos acometidos por metástase entre os casos caracterizados geneticamente para <i>BRCA1/2</i> (n=131).	33
Tabela 9	Análise de regressão logística múltipla para avaliação de risco de desenvolvimento de metástase para osso e para o SNC entre os grupos CMTN.	34
Tabela 10	Análise de metilação pareada entre os casos com tumor primário e metastático.	36
Tabela 11	Análise de associação entre os 9 grupos de ancestralidade genética e o mecanismo genético que leva a DRH.	43
Tabela 12	Análise de associação entre os 8 grupos de ancestralidade genética e o mecanismo epigenético que leva a DRH	43

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** Número de variantes encontradas nos genes *BRCA1/2* nas 399 amostras caracterizadas. 25
- Gráfico 2** Ancestralidade genética categorizada segundo OAK et al, 2020(1) e Carrot-Zhang et al, 2020(2). Indivíduos que tinham a segunda ancestralidade com menos de 20% foram anotados com suas ancestralidades primárias. Indivíduos que tinham mais de 20% da ancestralidade secundária foram classificados como amostras mistas (“admixed”), e tanto as ancestralidades primárias quanto as secundárias foram anotadas. Indivíduos sem qualquer ancestralidade acima de 50% foram anotados como mistos. 42
- Gráfico 3** Análise de ancestralidade genética em comparação com a etnia auto-declarada (n=150). 44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CM	Câncer de mama
HBOC	<i>Hereditary Breast and Ovarian Cancer</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1, early onset</i>
BRCA2	<i>Breast cancer 2, early onset</i>
IHQ	Imunohistoquímica
TN	Triplo-negativo
HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
Ki-67	Antigen KI-67
PARP	<i>Poly (adenosine diphosphate -ribose) polymerase</i>
RH	Recombinação homóloga
DRH	Deficiência na via de recombinação homóloga
BL1	<i>Basal-like 1</i>
BL2	<i>Basal-like 2</i>
IM	Imunomodulatório
M	Mesenquimal
MSL	<i>Mesenchymal stem like</i>
LAR	<i>Luminal androgen receptor</i>
PALB2	<i>Partner and localizer of BRCA2</i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
CHEK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectesia Mutated serine/threonine kinase</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectesia and RAD3-Related</i>

RAD51C	<i>RAD51 homolog C</i>
RAD51D	<i>RAD51 homolog D</i>
BARD1	<i>BRCA1 associated RING domain 1</i>
BRIP1	<i>BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
MRN	Complexo Mre11-RAD51-Nbs1
VEGF	Fator de crescimento de endotélio vascular
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
HIF-1	Fator induzido por hipóxia 1
MMPs	Metaloproteinases
SNC	Sistema nervosa central
ER	Estrógeno
PR	Progesterona
IBGE	Instituto brasileiro de Geografia e Estatística
CDI	Carcinoma ductal invasivo
HRD	<i>Homologous Recombination Deficiency</i>
TNBC	<i>Triple negative breast cancer</i>
CNS	<i>Central nervous system</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
LDG	Laboratório de Diagnóstico Genômico do A.C. Camargo Cancer Center
LGBM	Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C. Camargo Cancer Center

Sumário

DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE GRÁFICOS	
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos genéticos e moleculares	2
1.2 Deficiência da via de recombinação homóloga (DRH) e genes associados	5
1.3 Aspectos metastáticos	9
1.4 Ancestralidade genética	10
2 OBJETIVO	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 METODOLOGIA	13
3.1 Casuística	13
3.2 Extração de DNA	15
3.3 Sequenciamento de <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	16
3.4 Sequenciamento de DNA tratado por bissulfito de sódio	17
3.5 Avaliação da ancestralidade	21
3.6 Estatística	23
4 RESULTADOS	24
4.1 Seleção dos casos	24
4.2 Caracterização genética de <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	24
4.3 Grupos CMTN e os sítios metastáticos	32
4.4 Análise de metilação dos genes <i>BRCA1</i> e <i>RAD51C</i>	34
4.5 Análise de ancestralidade	41
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO	48
7 REFERÊNCIAS	49
8. ANEXOS	54
Anexo 1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	54
Anexo 2. Lista de genes contemplados pelos painéis de sequenciamento de nova geração utilizados neste estudo.	55
Anexo 3. Tabela geral de dados clínicos e anatomopatológicos	56
Anexo 4. Análise de metilação das regiões promotoras dos genes <i>BRCA1</i> e <i>RAD51C</i> em tecido tumoral primário de CMTN e metastático	70
Anexo 5. Análise de ancestralidade genética	79

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é a neoplasia maligna que mais acomete as mulheres em todo o mundo. Para o triênio 2020-2022 são esperados 66.280 novos casos para cada ano no Brasil⁽³⁾. Sendo este, o tipo de câncer de maior mortalidade na população feminina, registrou-se em 2018, 17.572 mortes por câncer de mama⁽³⁾. Os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama estão relacionados com fatores reprodutivos e hormonais, mas há também outros fatores relacionados, como o estilo de vida e fatores ambientais. Os dois fatores de risco de maior importância são a idade e a história familiar, quanto maior a idade, maior o risco de desenvolver a doença; e devido as síndromes hereditárias relacionadas com variantes genéticas de risco nas linhagens germinativas que podem ser transmitidas na família⁽⁴⁾. A Síndrome de Câncer de Mama e Ovário (HBOC, do inglês, *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*) é a síndrome hereditária mais importante relacionada com o câncer de mama, sendo os genes *BRCA1* e *BRCA2*, os genes mais frequentemente associados com o risco de câncer de mama. Cerca de 5 a 10% dos tumores de mama podem ser de origem hereditária, e mulheres portadoras de variantes patogênicas (P) ou provavelmente patogênicas (PP), que normalmente carregam a perda de função desses genes, apresentam um risco maior de desenvolver tais tumores, se comparado com a população geral⁽⁵⁾.

O CM é classificado em quatro diferentes imunofenótipos através da técnica de imunohistoquímica (IHQ): 1) subtipo TN, que não apresenta expressão de receptores para estrogênio e progesterona, e não apresentam superexpressão de HER-2; 2) subtipo HER-2: não há expressão dos receptores de estrogênio e progesterona e há amplificação genica ou superexpressão da proteína HER-2; 3) subtipo luminal A, com expressão dos receptores de estrogênio, não apresentam superexpressão/amplificação de HER-2 e 4) subtipo luminal B, com expressão de receptores de estrogênio; acrescida também da expressão do marcador nuclear de proliferação celular Ki-67 ou superexpressão de HER2^(6,7). Dentre esses, o luminal A é o de melhor prognóstico e o TN de pior prognóstico. Embora existam outras classificações para os

tumores de mama, essa classificação é a mais usual e clinicamente utilizada para determinar o prognóstico e o tratamento do câncer de mama.

O câncer de mama do subtipo triplo-negativo (CMTN) corresponde a cerca de 15% dos cânceres de mama⁽⁶⁻⁹⁾, acomete mais mulheres jovens (≤ 40 anos) e de ascendência africana nos Estados Unidos⁽¹⁰⁻¹²⁾. Além de ser um grupo bastante heterogêneo em nível molecular, histológico e clínico, não possui alvos específicos para tratamento do tumor primário, logo, o tratamento convencional é feito com quimioterapia sistêmica, e o prognóstico tende a ser inferior aos outros tumores de mama, pois está associado com altas taxas de recidiva e de sobrevida ruim, especialmente nos três primeiros anos após tratamento, além do ter um padrão metastático com preferência por órgãos sólidos^(9,12). Paradoxalmente, existe uma parcela de tumores que são consideravelmente sensíveis a quimioterapia neoadjuvante, e para os casos em que se observa resposta patológica completa o prognóstico é bom^(9,13). Para tumores TN metastáticos, refratários ao tratamento quimioterápico e associados a variantes de perda de função em *BRCA1* e *BRCA2*, tanto de origem germinativa ou somática, há opção de se utilizar inibidores de PARP⁽¹⁴⁾.

1.1 Aspectos genéticos e moleculares

Estudos têm mostrado que os tumores de mama do subtipo TN estão associados com maior frequência aos tumores hereditários quando comparado com os outros subtipos, ou seja, estão associados a mutações P/PP germinativas em genes relacionados a síndromes hereditárias, principalmente com o gene *BRCA1*, associado a *HBOC*⁽¹⁵⁻¹⁷⁾.

Os genes *BRCA1* (*Breast cancer 1, earlyonset*) e *BRCA2* (*Breast cancer 2, earlyonset*) são genes supressores tumorais e, mulheres portadoras de variantes germinativas P/PP nesses genes têm risco elevado de desenvolver câncer de mama hereditário⁽¹⁸⁾.

Dentre as mulheres que possuem mutação germinativa em *BRCA1* e que desenvolvem câncer de mama, de 70 a 90% desenvolvem, especificamente, o câncer de mama TN. Por outro lado, 8-30% das pacientes diagnosticadas com tumor TN apresentam mutação germinativa em

BRCA1^(19–22). Além disso, a hipermetilação do promotor de *BRCA1*, relacionada ao silenciamento transcricional do gene, representa um percentual significativo nesses tumores, levando a deficiência de RH (DRH) nesses tumores⁽¹⁵⁾. Evidências mostram que em tumores TN a DRH parece ocorrer principalmente por dois mecanismos de silenciamento de genes envolvidos com reparo de quebras de fita dupla via recombinação homóloga: através de mutação P germinativa de perda de função, principalmente nos genes *BRCA1/2*, mas também outros genes da via como *PALB2*; ou por um mecanismo epigenético no tecido tumoral, como hipermetilação da região promotora dos genes de *BRCA1* e *RAD51C*^(23–27).

Embora os tumores TN possam ser agrupados enquanto imunofenótipo, eles são bastante heterogêneos em aspectos moleculares, histológicos e clínicos. Grande parte dos tumores TN são carcinomas ductais invasivos, mas uma parcela significativa desses tumores apresentam tipos histológicos menos comuns, como o medular, metaplásico e o adenoide cístico, que estão associados com prognósticos distintos. Tendo em vista essa variedade, um estudo baseado em padrão de expressão gênica classificou os tumores TN em seis subtipos, com possíveis implicações no tratamento quimioterápico: BL1 e BL2 (do inglês, basal-like 1 e 2), imunomodulatório (IM), mesenquimal (M), MSL (do inglês, *mesenchymalstem like*), e LAR (do inglês, *luminal androgen receptor*)⁽²⁸⁾.

A respeito das variantes germinativas P/PP associadas ao desenvolvimento dos tumores de mama TN, estudos têm mostrado que apesar do gene *BRCA1* ser o mais frequentemente afetado nesse subtipo, existem outros genes afetados em mulheres diagnosticadas com esse subtipo de tumor, como *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*, *PTEN*, *CHECK2*, *ATM*, *RAD51C*, *RAD51D*, *BARD1* entre outros^(16,19,29).

Nosso grupo tem trabalhado para um melhor entendimento da predisposição genética aos tumores da mama. Em um dos estudos, os genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* foram investigados em pacientes jovens diagnosticadas com câncer de mama, identificando uma taxa de variantes

germinativas P/PP de 50% no gene *BRCA1* em pacientes com tumor TN em idade jovem (≤ 35 anos) independente do histórico familiar⁽¹⁷⁾. A fim de refinar esse dado, um outro estudo do grupo, com uma casuística maior, investigou o status do gene *BRCA1* e *BRCA2* em 131 amostras tumorais TN considerando variantes P/PP e hipermetilação do promotor do gene⁽¹⁵⁾. Esse estudo identificou uma taxa de 12% de mutação em *BRCA1*, sendo que quase sua totalidade foi de variantes germinativas com um aumento para 26% nas mulheres diagnosticadas em idade jovem (< 40 anos). Considerando variante P/PP ou hipermetilação do promotor de *BRCA1*, verificou-se que aproximadamente 32% dos tumores apresentavam DRH pela inativação do gene *BRCA1* por mecanismos genéticos e epigenéticos, sendo que, no grupo de mulheres abaixo de 40 anos, esse resultado foi acentuado para cerca de 55%. Os dois mecanismos de inativação do gene *BRCA1* se mostraram potencialmente excludentes nesse subtipo de câncer de mama⁽¹⁵⁾.

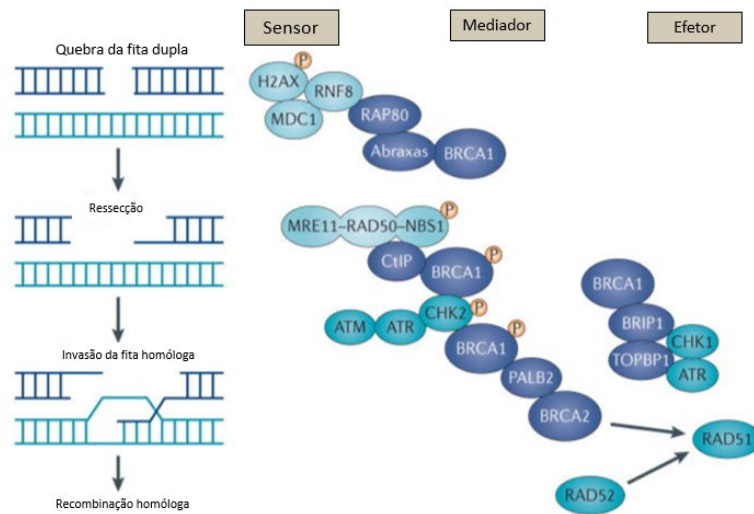
Um outro trabalho recente do grupo investigou o processo de acúmulo de mutação somática nos dois tipos de tumores TN, aqueles deficientes e aqueles proficientes em RH dada pela avaliação do status de *BRCA1*. Para isso o grupo analisou o exoma de tumores hereditários TN com silenciamento de *BRCA1*, e tumores esporádicos TN selvagens para *BRCA1/2*, onde observou-se que o grupo de tumores esporádicos TN apresentavam mais variantes “*drivers*” (aquelas que apresentavam as maiores frequências alélicas e que portanto surgiram no início do processo tumorigênico), sugerindo que esses tumores precisam de um acúmulo maior no número de mutações somáticas “*drivers*” para desencadear a tumorigênese, quando comparado com os tumores TN hereditários associados a variantes de perda de função em *BRCA1*⁽³⁰⁾. Esse resultado corrobora com a hipótese de que nos tumores TN hereditários, a deficiência de *BRCA1* deve desempenhar um papel desencadeador crucial para disparar o processo de formação do tumor, uma vez que menos eventos “*drivers*” são observados quando comparados aos tumores esporádicos.

1.2 Deficiência da via de recombinação homóloga (DRH) e genes associados

A recombinação homóloga é o mecanismo de reparo da quebra de fita dupla de DNA mais confiável, por utilizar a fita intacta como molde e apresentar, portanto, um menor risco de erros, e acontece da seguinte maneira: o segmento homólogo do DNA da cromátide-irmã serve como molde para o reparo da quebra da fita dupla; primeiro acontece o reconhecimento da lesão, que é mediado pelo complexo MRN (Mre11-RAD51-Nbs1), que se liga nas extremidades das fitas quebradas e recruta ATM e ATR, que por sua vez recrutam as proteínas *downstream* da via, como BRCA1, CHECK2, TP53 entre outras. Uma vez essa via ativada, a proteína BRCA1 vai até o local de quebra com auxílio de BARD1 e BRIP1 formando uma plataforma de ancoramento que recruta outras proteínas envolvidas no reparo. Em seguida, o complexo MRN resseca as extremidades da quebra da dupla fita e a proteína RPA se liga às extremidades 3' da fita simples, depois BRCA2 e PALB2 recrutam RAD51 para a extremidade revestida, com a participação de RAD51B, RAD51C e RAD51D. Por fim, ocorre a invasão da fita homóloga de DNA mediada por RAD51, com o pareamento da região danificada, onde acontece a síntese e reparo do DNA⁽³¹⁾. (Figura 1)⁽³²⁾

Fonte: Adaptado de Roy R et al, 2011

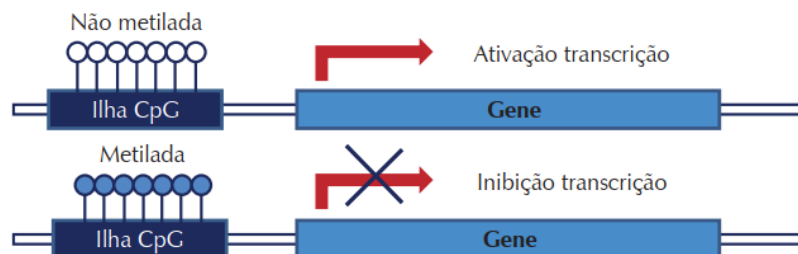
Figura 1 - Mecanismo de reparo de DNA por recombinação homóloga.



Evidências recentes têm mostrado que diversos mecanismos levam a perda da recombinação homóloga, sendo essa perda bastante frequente em tumores TN, tanto por eventos germinativos ou somáticos⁽²⁷⁾, como comentado anteriormente, hipermetilação de promotor leva a silenciamento transcricional. A metilação é uma modificação covalente do DNA, onde um grupamento metil (CH_3) é adicionado no carbono 5 de uma citosina adjacente à uma guanina (CpG). Níveis elevados de metilação (hipermetilação), quando em regiões promotoras, ricas em CpGs, as denominadas ilhas CpGs, podem limitar o acesso de fatores de transcrição, levando ao silenciamento do gene. (Figura 2)⁽³²⁾

Fonte: Saito RF et al, 2016.(32)

Figura 2 -Metilação do DNA.



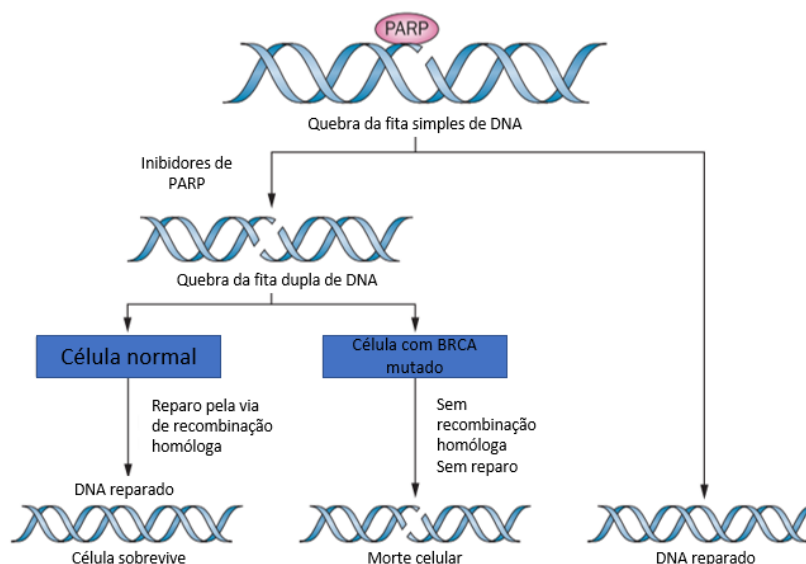
O nosso grupo tem investigado tumores TN e demonstrado que aproximadamente 30% desses tumores apresentam deficiência na via de recombinação homóloga, seja por variante germinativa P/PP ou por hipermetilação do promotor do gene *BRCA1*, e esse percentual cresce em mulheres jovens⁽¹⁵⁾. Dado que tumores deficientes na via de recombinação homóloga são mais sensíveis a drogas que causam danos ao DNA⁽³³⁾, o interesse em expandir a caracterização dos mecanismos que levam a DRH tem aumentado, visto que mais tumores poderiam ser sensíveis a tratamentos com sais de platina e inibidores de PARP.

Os inibidores de PARP (poli ADP-ribose polimerase, uma proteína envolvida no reparo de lesões de fita simples do DNA), estão relacionados ao conceito de letalidade sintética, ou seja, pacientes diagnosticadas com tumor TN e com variantes patogênicas germinativas em *BRCA1/2* que forem tratadas com um agente inibidor de PARP, levaria ao bloqueio da atividade de PARP durante a quimioterapia, e, conseqüentemente, induziria um acúmulo de lesões de fita simples que se tornariam quebras de fita dupla, que não seriam reparadas nas células com deficiência na via RH (*BRCA1/2* mutadas), o que levaria à morte celular. (Figura 3) Assim, o tratamento com inibidor de PARP em conjunto com um agente de dano ao DNA, traz benefícios clínicos significativos no tratamento do tumor de mama TN, dependendo do status da mutação de *BRCA1* das pacientes⁽³⁴⁻³⁶⁾. Inibidor de PARP está aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*)

e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) desde 2018 como segunda linha para pacientes com tumores TN metastáticos e refratários a tratamento com platina⁽³⁷⁾.

Fonte: Adaptado de Sonnenblick A et al, 2015⁽³⁸⁾

Figura 3 - O papel dos inibidores de PARP na letalidade sintética.



Recentemente, foi mostrado que uma parcela de tumores sem evidência de mecanismos genéticos da deficiência nessa via de reparo, ou seja, variantes P/PP em genes envolvidos em reparo de DNA via RH, também podem apresentar resposta à platina e inibidores de PARP^(39,40). Tutt et al. mostrou em um estudo de fase II que mulheres com câncer de mama em estágio avançado e metastático se beneficiaram do uso do Olaparibe como monoterapia, evidenciando o potencial terapêutico de inibidores de PARP em tumores associados com a perda de função de genes da via de reparo de recombinação homóloga, como *BRCA1/2* em câncer de mama⁽³⁴⁾. Um outro estudo de fase II, mostrou que a maioria dos cânceres de mama TN possuem deficiência na via de RH, seja por mutações germinativas ou somáticas nos genes *BRCA1/2*, ou por hipermetilação do promotor dos genes *BRCA1* e *RAD51C*, que são identificadas através de assinaturas mutacionais, e que podem servir no futuro para definir os tumores com DRH que seriam sensíveis aos inibidores de PARP⁽⁴¹⁾.

1.3 Aspectos metastáticos

A metástase é um processo que ocorre em várias etapas. Inicialmente, o tumor primário estimula os processos de neoangiogênese e linfangiogênese, responsáveis pela nutrição do microambiente tumoral, uma vez que as células tumorais crescem, e precisam de suplementação sanguínea para se manterem naquele ambiente, que acaba sofrendo hipóxia devido ao crescimento tumoral. Esses processos acabam ocasionando, também, a infiltração de células tumorais no sistema circulatório - processo chamado de intravasamento. Consequentemente, as células tumorais do sítio primário conseguem migrar para um local distante, após adquirirem as habilidades de sobreviverem na circulação sanguínea e escaparem do reconhecimento e destruição do sistema imunológico. Por fim, essas células tumorais, passam por um processo chamado extravasamento, quando migram do sistema circulatório para o sítio secundário e começam a tumorigênese nesse novo local^(32,42,43).

O subtipo TN é conhecido por ser agressivo principalmente pela sua grande relação com o desenvolvimento de metástases, que são encontradas em sua maioria no sistema nervoso central (SNC) e pulmões, e também em ossos e fígado, e tendem a ter um pior prognóstico relacionado com uma menor sobrevida, maior mortalidade e taxa de recidiva^(12,46,47). Estudos mostram que o desenvolvimento de metástase para o SNC e o consequente pior prognóstico é mais prevalente entre os tumores do subtipo TN⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾.

Além disso, um estudo recente realizado com todos os subtipos de câncer de mama mostrou que mulheres portadoras de variantes patogênicas em *BRCA1* frequentemente experimentaram metástases no pulmão e linfonodos distantes, enquanto as portadoras de *BRCA2* experimentaram metástases ósseas com maior frequência. No mesmo estudo foi observado também que, embora metástase no SNC tenha ocorrido com frequência em portadores de mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, apenas a mutação *BRCA2* foi significativamente associada à metástase no SNC quando a análise multivariada foi controlada para subtipo de tumor⁽⁴⁷⁾. Outro

estudo que avaliou aberrações genômicas mostrou que metástases de câncer de mama para o SNC possuem níveis aumentados para deficiência de recombinação homóloga em relação aos seus tumores primários, sugerindo que esses tumores metastáticos podem vir a ser mais sensíveis aos inibidores de PARP⁽⁵¹⁾.

1.4 Ancestralidade genética

Estudos mostram que mulheres americanas com ascendência africana são mais propensas a serem diagnosticadas com câncer de mama do subtipo TN e em idade mais jovem, além de apresentarem tumores clinicamente mais agressivos e com alta taxa de mortalidade, quando comparadas com mulheres americanas da mesma idade de ascendência europeia ou asiática^(52,53).

Polak e colaboradores⁽²⁷⁾ mostraram em um trabalho a partir de sequenciamento de exoma completo (WES) em tumores TN, que a presença da assinatura mutacional 3 estava associada a DRH, uma assinatura mutacional previamente descrita em amostras com inativação bialélica de genes de reparo de fita dupla como *BRCA1/2* ⁽²⁷⁾. Os autores observaram ainda que os mecanismos subjacentes da DRH estavam associados a diferentes ancestralidades, sendo variantes P/PP de perda de função nos genes *BRCA1/2* mais associadas a tumores de mulheres brancas; e eventos epigenéticos de DRH, como hipermetilação da região promotora de *BRCA1* e *RAD51C* mais associados com tumores de mulheres negras, sugerindo que o mecanismo básico da deficiência de recombinação homóloga em tumores TN difere entre brancos e negros⁽²⁷⁾. No Brasil, um estudo mostrou que o percentual de tumores TN difere entre as diferentes regiões, sendo que as regiões Sul e Sudeste, no qual a ascendência europeia é mais frequente entre as mulheres, a frequência de tumores de mama do subtipo TN é de 14,6 e 14%, respectivamente. Enquanto na região Nordeste, que é uma região com grande influência Africana, apresentou uma frequência de tumores TN de 17,4%, e nas regiões Norte e Centro Oeste, de 20,3% e 17,4%, respectivamente ⁽⁵⁴⁾. Contudo, ainda é incerto se os diferentes mecanismos envolvidos com DRH em tumores TN diferem em uma população miscegenada como a brasileira.

Assim, de forma resumida, o câncer de mama TN é um tumor com alto percentual de câncer hereditário associado principalmente a mutações de perda de função no gene *BRCA1* levando a DRH. A DRH nos tumores TN também ocorre pelo silenciamento transcricional, principalmente do gene *BRCA1*, ocasionado por hipermetilação do promotor no DNA tumoral. Além disso, dados recentes mostraram que o mecanismo que leva a DRH em tumores TN, quer seja genético ou epigenético, parece ser influenciado pela ancestralidade.

Grande parte dos achados atuais são oriundos de população menos miscigenadas e não podem ser simplesmente transferidos para população brasileiras, reconhecidamente tri-híbrida, isso é, constituída principalmente das ancestralidades europeia, africana e ameríndia. Dessa forma, nesse estudo pretendemos contribuir com dados de pacientes brasileiras, , na caracterização do status de *BRCA1* e *BRCA2* dos tumores TN nos cenários dos tumores primários e metastáticos e no contexto de ancestralidade das pacientes.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar dois mecanismos que levam à deficiência de recombinação homóloga em câncer de mama triplo negativo e avaliar sua associação com padrão de metástase e ancestralidade das pacientes.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar os genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes com tumores de mama TN primário e metastático por sequenciamento de nova geração.
- 2) Avaliar o padrão de metilação da região promotora de *BRCA1* e de *RAD51C* através do sequenciamento de amostras de DNA do tumor de mama TN primário e metastático.
- 3) Avaliar a ancestralidade genética das pacientes usando um painel de variantes genéticas através de análise de fragmentos por eletroforese capilar ou microarranjo de DNA.
- 4) Avaliar as associações de mecanismos genéticos (variantes P/PP em *BRCA1* e *BRCA2*) e epigenéticos (hipermetilação do promotor dos genes *BRCA1* e *RAD51c*) associados com deficiência de recombinação homóloga com padrão de metástase e ancestralidade.

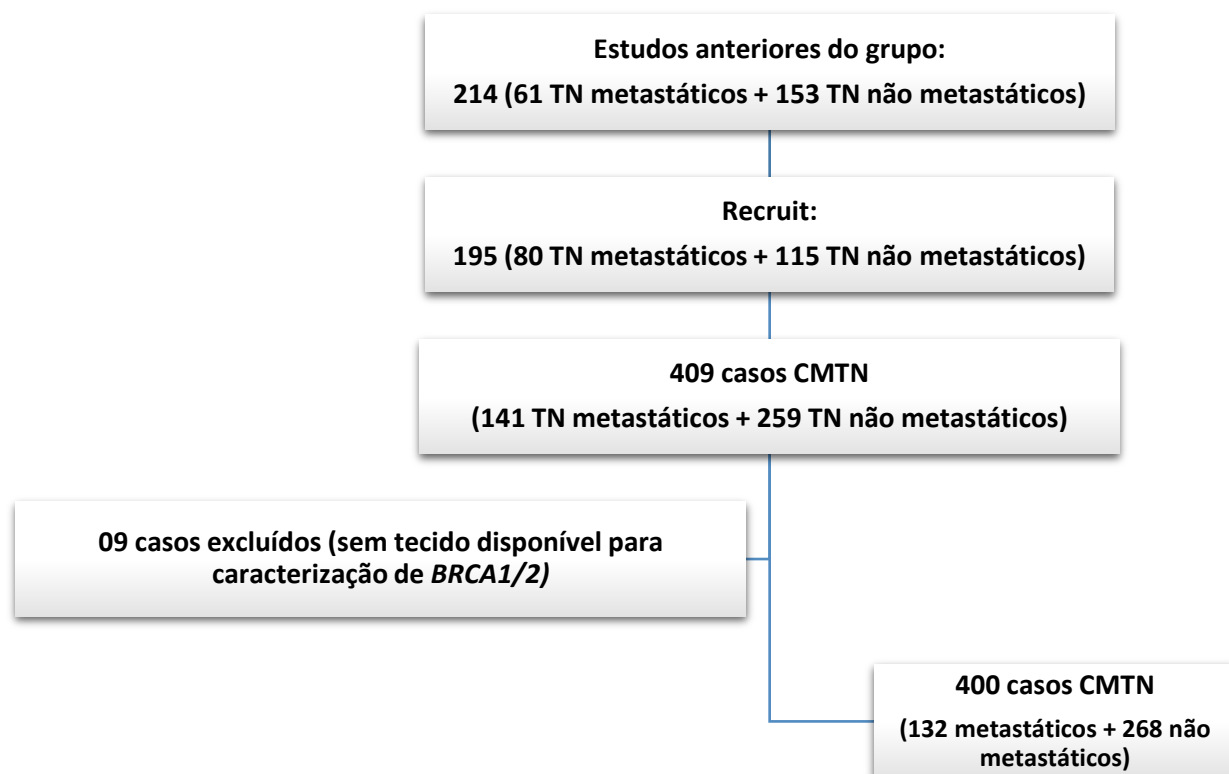
3 METODOLOGIA

3.1 Casuística

A busca dos casos foi realizada retrospectivamente através das ferramentas *Recruit*, H2TC e Tasy, que são ferramentas eletrônicas de busca e visualização de prontuários eletrônicos do A. C. Camargo Cancer Center (ACCCC). O *Recruit* possibilita buscarmos casos de acordo com diferentes filtros, que foram: câncer de mama, triplo-negativo, metástase, HER2 negativo, ER negativo e PR negativo. Os prontuários eletrônicos das pacientes foram acessados através do H2TC e Tasy.

Os critérios de inclusão foram casos com diagnóstico de câncer de mama do subtipo triplo negativo em pacientes do sexo feminino com e sem o evento de metástase a distância. Pacientes apenas com desenvolvimento de metástase em linfonodos da axila, tumor em mama contralateral, pele loco regional e parede muscular do tórax não foram consideradas no grupo de pacientes que desenvolveram metástase a distância.

Inicialmente, foram selecionados 214 casos de câncer de mama TN de projetos anteriores do grupo, sendo confirmado através da ferramenta H2TC que, dentre eles, 61 tinham desenvolvido metástase a distância. Em seguida, foi realizada uma busca de novos casos TN com a ferramenta eletrônica *Recruit*, com posterior confirmação de prontuários no H2TC. Primeiro foram utilizadas as seguintes palavras-chave no *Recruit*: “triplo-negativo”, “câncer de mama”, “HER2 negativo”, “ER negativo” e “PR negativo”, cujo resultado foi de 195 casos e, quando adicionamos o filtro “metástase” na busca, esse número caiu para 80 casos novos. Totalizando 268 casos TN sem metástase mais 141 casos TN com metástase a distância, sendo que, destes 409 casos, 9 casos TN com metástase foram excluídos da casuística por não possuírem leucócito do paciente ou tecido tumoral disponível para avaliação do status de *BRCA1/2*. (Figura 4)

Figura 4 - Seleção da casuística.

Foram coletados os seguintes dados clínicos de cada paciente: data do diagnóstico inicial, estadiamento inicial, idade ao diagnóstico (data da primeira biópsia com resultado do TN), cor/raça autodeclarada conforme a classificação utilizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)⁽⁵⁵⁾ (preta, parda, branca, indígena ou amarela), caracterização genética em *BRCA1* e *BRCA2*, características do tumor (histologia e grau do tumor), modalidades terapêuticas utilizadas, data do diagnóstico da primeira metástase, sítios anatômicos acometidos por metástase, data do óbito ou última consulta de acompanhamento na Instituição. O estadiamento inicial foi obtido através do Formulário de Registro do Hospital do Câncer ou do formulário de atendimento utilizado pelos oncologistas da instituição, ambos disponíveis na ferramenta H2TC. A cor/raça autodeclarada foi coletada, quando disponível, no formulário de atendimento utilizado pelos oncologistas da instituição via H2TC ou na seção de dados gerais do paciente na ferramenta Tasy, que também possibilita a visualização do prontuário eletrônico das pacientes. Os casos de recorrência foram considerados quando diagnosticados através de exames de imagem ou

alterações fisiológicas que levaram ao diagnóstico de metástase pelo médico oncologista responsável pela paciente. Consideramos sítios de metástases distantes, exceto axila, mama contralateral, pele loco regional e parede muscular do tórax, de acordo com Song et al⁽⁴⁷⁾. As metástases em SNC foram consideradas quando envolviam a massa encefálica, carcinomatose meníngea e/ou crânio.

Esse projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa do ACCCC e aprovado sob o parecer substanciado nº 3.501.142 (anexo 1), e está vinculado ao projeto temático FAPESP , processo nº2013/23277-8, também aprovado, sob o processo nº2019/22749-0.

3.2 Extração de DNA

O DNA de amostras de leucócito ou saliva foi extraído conforme os protocolos padronizados do Banco de Macromoléculas do ACCCC (kit QIASymphony DNA Midi). As amostras de tecido congelado fresco ou de bloco de parafina também foram extraídas pelo Banco de Macromoléculas do ACCCC, seguindo o protocolo automatizado QIASymphony® DSP DNA kit para amostras de tecido congelado fresco, e o protocolo QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit para amostras de bloco de parafina. Todas as amostras foram verificadas quanto a pureza pelo método espectrofotométrico NanoDrop (ThermoFisher) e quantificadas usando o método fluorimétrico *Qubit dsDNA High Sensitivity* (ThermoFisher).

3.3 Sequenciamento de *BRCA1* e *BRCA2*

Algumas amostras foram caracterizadas para presença de variantes nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em um estudo prévio do grupo⁽¹⁵⁾, em projetos de pesquisa do grupo ainda não publicados e a partir dos resultados de testes genéticos realizados no Laboratório de Diagnóstico Genômico da Instituição .

Para os testes genéticos que foram realizados exclusivamente para este trabalho, o DNA de leucócito foi priorizado, quando não estava disponível, o DNA de tumor fresco foi utilizado e, por último, utilizou-se o DNA de tumor emblocado em parafina quando os outros tecidos não estavam disponíveis.

Para amostras oriundas de DNA de leucócito ou tumor fresco utilizou-se aproximadamente 200ng do material para o painel *Hereditary Cancer Solution* (*Sophia Genetics* 26 genes)(Anexo 2), que foram sequenciadas na plataforma MiniSeq (Illumina) utilizando o kit Mid Output MiniSeq, que é capaz de gerar até 16 milhões de leituras de aproximadamente 150bp em um total de 2,4GB, ou plataforma NextSeq utilizando o kit Mid Output NextSeq, capaz de gerar até 260 milhões de leituras de aproximadamente 150bp em um total de 40GB. Posteriormente, foi realizada uma comparação entre a sequência obtida da amostra do paciente e a sequência genômica referência conforme estabelecido pelo *Locus Reference Genomic* (www.lrg-sequence.org) para os genes *BRCA1* (LRG_292/ NM_007294.3) e *BRCA2* (LRG_293/ NM_000059.3). As variantes foram reanotadas e analisadas através do software *Varseq* (v2.1.1/ *GoldenHelix* de acordo com os filtros: cobertura $\geq 50x$, frequência da variante $\geq 20\%$, SNVs e indels presentes em região codificante ou próximas ao sítio de splicing (-20 e +20).

Para amostras de DNA de tumor emblocado em parafina, utilizou-se aproximadamente 20ng de massa para o preparo do painel Oncomine™ BRCA Expanded (Oncomine Tumor Specific Assay, Thermo Fischer) (anexo 2), sendo que este DNA foi previamente tratado com UDG (do inglês, uracil-DNA glycosylase enzyme, de acordo com o fabricante: adição 1uL de

UDG, incubação a 37°C por 15min e inativação a 85°C por 5min), com o intuito de remover as bases deaminadas pelo processo de fixação em parafina dos tecidos, que poderiam gerar artefatos e interferir na qualidade do sequenciamento.

Posteriormente, as amostras foram sequenciadas na plataforma Ion GeneStudio S5. Os arquivos BAM gerados nos sequenciamentos (Torrent Suite 5.12.3) foram exportados para o Ion Reporter 5.16.0.2, um software que inclui algoritmos para a chamada de variantes a partir da tecnologia Ion Torrent, e processados de acordo com o *workflow Oncomine BRCA Expanded – 540 – w4.2 – DNA Single sample*.

O critério de classificação das variantes encontradas foi baseado nas recomendações do Colégio Americano de Genética e Genômica Médica (ACMG, do inglês *American College of Medical Genetics*)⁽⁵⁶⁾, e foram classificadas com auxílio dos bancos de dados públicos Clinvar e LOVD^(57,58).

3.4 Sequenciamento de DNA tratado por bissulfito de sódio

A avaliação do status de metilação da região promotora de *BRCA1* e *RAD51C* foi realizada por sequenciamento de nova geração após a conversão do DNA tumoral tratado com bissulfito de sódio com o kit *EZ DNA Methylation-Gold* (ZymoResearch) conforme a recomendação do fabricante.. Em seguida, o DNA convertido e amplificado é analisado por sequenciamento, que neste estudo foram as plataformas *Ion Proton* e *Ion GeneStudio S5* (ThermoScientific), e a proporção das bases C/T é determinada, refletindo o nível de metilação na amostra. A investigação dos níveis de metilação foi realizada considerando estudos previos^(1, 2) e limitou-se às regiões promotoras dos genes *BRCA1* e *RAD51C*.

A região analisada de *BRCA1* (chr17:41277324-41277487) compreende as posições -219 a -55 em relação ao início da sequência codificante (ATG) do gene, abrangendo 164pb e contém 11 dinucleotídeos CpGs. Os iniciadores utilizados para amplificar esta região de interesse foram adaptados de Esteller et al⁽²³⁾ e de um estudo prévio do grupo⁽¹⁵⁾ e estão esquematizados na Tabela

1. A região analisada de *RAD51C* (chr17:56769859-56770002) compreende as posições +146 a +2 em relação ao início da sequência codificante (ATG) do gene, uma região que cobre 144bp e contém 15 dinucleotídeos CpG. Os iniciadores utilizados para amplificar esta região de interesse foram desenhados considerando a sequência convertida (Tabela 1).

Tabela 1 - Sequência de iniciadores utilizados na PCR para sequenciamento na plataforma Ion Proton, assim como suas *Tmelting*. Coordenadas para *BRCA1* hg19 chr17:41277324-41277487 (-219 a -55 da região codificante); *RAD51C* hg19 chr17:56769589-56770002 (+146 a +02 da região codificante)

Iniciador	Sequência convertida	Bases	<i>Tmelting</i>
<i>BRCA1 forward</i>	5' GTATTTTGAGAGGTTGTTGTTGTTTAG 3'	24	58°
<i>BRCA1 reverse</i>	5' CAAAAACCCAATTATCTAAAAAACCC 3'	26	58°
<i>RAD51C forward</i>	5' AAGATTGCGTAAAGTTGTAAGG 3'	22	51°
<i>RAD51C reverse</i>	5' CAAACTCACCTACTAACCC 3'	19	51°

Para a reação de conversão por bissulfito de sódio, utilizou-se aproximadamente 50ng a 100ng do DNA tumoral FFPE e 10ng a 30ng do DNA tumoral fresco, com o kit EZ Methylation Gold (Zymo Research), conforme as recomendações do fabricante. Essa técnica converte citosinas não-metiladas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas após o tratamento com bissulfito. Após a conversão, o DNA é amplificado através de PCR, onde as citosinas não-metiladas e convertidas em uracila serão substituídas por timina, enquanto as citosinas metiladas (não convertidas em uracila) permanecem inalteradas. A reação de PCR para gerar *amplicons* da região de interesse foi realizada com o kit QIAGEN Multiplex PCR Plus, nas condições ilustradas nas Tabelas 2 e 3. Também foram utilizadas amostras comerciais de DNA humano convertido metilado e não-metilado e não convertido metilado como controle de metilação e de conversão (EpiTect PCR Control DNA Set – Qiagen).

Tabela 2 - Reação de PCR para análise de metilação dos genes *BRCA1* e *RAD51C*.

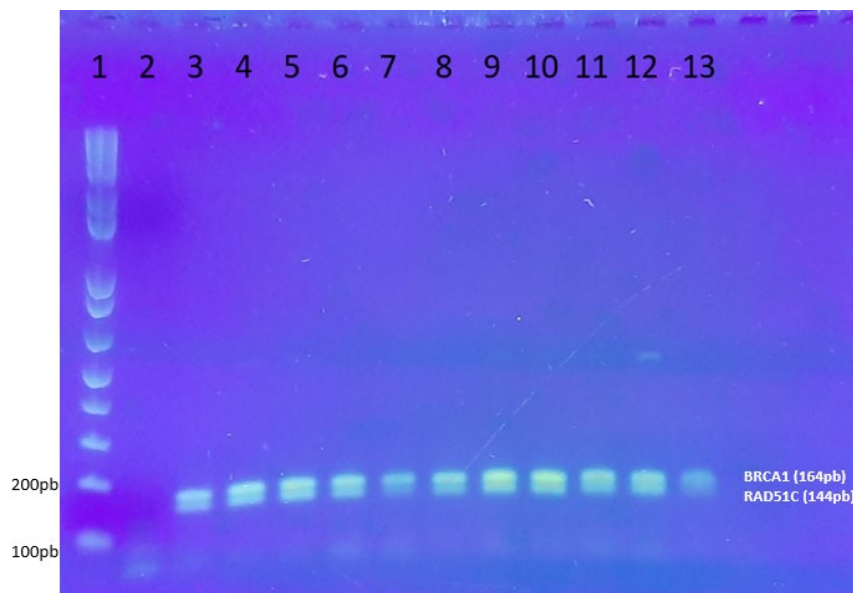
Protocolo QIAGEN Multiplex PCR Plus	Volume
<i>2x Multiplex PCR Master Mix</i>	12,5 µl
<i>Coral LoadDye 10x</i>	2 µl
<i>RNase-freewater</i>	3 µl
<i>Primer mix, 0,2uM de cada primer (BRCA1-forward e reverse, RAD51C-forward e reverse)</i>	2,5 µl
DNA convertido	5 µl
Volume final	25 µl

Tabela 3 - Condições da reação de PCR.

Temperatura	Tempo	Ciclos
95°	5 min	1
95°	30 seg	40
60°	90 seg	40
72°	30 seg	40
68°	10 min	1

Em seguida, utilizou-se 5 µl dos produtos de PCR em gel de agarose 2%, para confirmar a amplificação dos alvos (*BRCA1* – 164pb e *RAD51c* 144pb) (Figura 5).

Figura 5 - Gel de agarose 2% da amplificação das regiões alvos dos genes *BRCA1* e *RAD51C*. (1) *Ladder* 100pb (Marcador de peso molecular); (2) Controle negativo; (3) Controle positivo (DNA metilado); (4-13) Amostras de DNA tumoral convertidas por bissulfito



Após a confirmação do fragmento amplificado, o volume restante da reação de PCR (20 µl) foi utilizado para a construção de biblioteca de *amplicon* com o kit *Ion Plus Fragment Library* (*Thermo Fisher*). Assim, foi utilizado o método NGS-*amplicon* bissulfito na plataforma Ion Proton/ Ion GeneStudio S5 com os reagentes Ion PI™Hi-Q™Sequencing 200 Kit com o Ion PI™ Chip Kit v3/ Ion 540-OT2 e Ion 540™ chip.

É importante comentar que, antes de utilizarmos a tecnologia Ion Torrent (ThermoFisher) para sequenciamento de *amplicon* de DNA tratado com bissulfito, a aluna realizou uma avaliação durante a sua Iniciação Científica onde comparou-se os resultados de metilação em 38 amostras de câncer de mama TN gerados pela plataforma 454-GS Junior (Roche) ⁽¹⁵⁾ que pelo fato de ter sido descontinuada teve que ser substituída pela tecnologia Ion Torrent. Das 38 amostras analisadas 35 amostras mostraram resultados concordantes (92,1%) entre as duas plataformas com uma correlação de 83%.

Após o sequenciamento, os arquivos gerados foram importados para o *software* CLC Genomics Workbench, e alinhados à sequência referência (virtualmente convertida), tendo como

critério que pelo menos 50% da sequência gerada deveria alinhar à referência com ao menos 80% de similaridade. Foi feita uma contagem das bases C/T nas posições alvo e com isso, os níveis de metilação dos dinucleotídeos CpGs, presentes na região de interesse, foram determinados. Consideramos como controles de conversão por bissulfito 7 citosinas (4 para *BRCA1*; 3 para *RAD51C*), que estavam fora do contexto CpG (não alvo de metilação) e distribuídas aleatoriamente nas sequências interrogadas. Considerou-se uma taxa de conversão $\geq 98\%$ das citosinas controles para um resultado confiável. Em relação a classificação do nível de metilação das amostras dado pelo nível de metilação de citosinas em dinucleotídeos CpG (11 para *BRCA1* e 15 para *RAD51C*), considerou-se hipermetilado $\geq 40\%$, 20% à $< 40\%$ = intermediários e $\leq 19,99\%$ não metilados.

3.5 Avaliação da ancestralidade

Parte da avaliação de ancestralidade foi realizada em colaboração com a pesquisadora Andrea Kely Campos Ribeiro dos Santos da Universidade Federal do Pará (UFPA). A genotipagem foi realizada através do painel de 61-AIMs (*Ancestry Informative Markers*) por PCR Multiplex (duas corridas), seguida por eletroforese capilar com análise de fragmentos, conforme descrito por Santos et al⁽⁵⁹⁾ e Ramos et al⁽⁶⁰⁾.

Para a eletroforese capilar e análise de fragmentos, foi utilizado o protocolo da empresa Life Technologies. A separação dos fragmentos de DNA foi realizada usando o ABI PRISM 3130 GeneticAnalyzer e o software GeneMapper ID v3.2 (Life Technologies) para a leitura de pico. Como o modelo assume que cada indivíduo herda uma mistura de marcadores ancestrais de determinadas populações, os resultados foram plotados contra as três populações parentais que constituem a população brasileira para executar a estratificação ancestral (europeia, ameríndia e africana).

Em outra parte da avaliação foi utilizada a plataforma “Axiom Precision Medicine Diversity Research Array Plus (PMDA)”. Essa abordagem, baseada em microarranjo de DNA

para genotipagem, permite a avaliação de mais de 850.000 variantes relacionadas à susceptibilidade a doenças complexas (câncer, Alzheimer, doenças neurológicas, cardiomiopatias, entre outras), farmacogenômica, ancestralidade, tipagem sanguínea e estilo de vida. Amostras de DNA de leucócitos/saliva (500-750ng) foram liofilizadas e enviadas para o *Microarray Research Services Laboratory* da ThermoFisher nos EUA, onde os experimentos foram realizados, e os dados brutos disponibilizados via nuvem.

Em seguida, foi utilizado o *software* Axiom Analysis Suite 5.1.1 para identificar os SNPs do *array* relacionados a ancestralidade. Depois, o *software* Admixture foi utilizado para uma análise de ancestralidade global, para conseguirmos classificar as amostras em “European”, “african”, “native american” e “asian”, com isso cada amostra teve uma porcentagem para cada uma dessas classes. A avaliação da ancestralidade usando essa abordagem foi realizada em parceria com o pesquisador Marcos Leite Santoro da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

Dado isso, classificou-se as amostras de acordo com os critérios apresentados por OAK et al, 2020⁽¹⁾ e Carrot-Zhang et al, 2020⁽²⁾: Indivíduos que tinham a segunda ancestralidade com menos de 20% foram anotados com suas ancestralidades primárias (por exemplo, um indivíduo com ancestralidade europeia 78%, 15% africano e 7% nativo americano foi anotado como EUR). Indivíduos que tinham mais de 20% da ancestralidade secundária foram classificados como amostras mistas (“*admixed*”), e tanto as ancestralidades primárias quanto as secundárias mais relevantes foram anotadas (por exemplo, um indivíduo com 65% de ancestralidade europeia e 35% de ancestralidade africana foi anotado como EUR_admixAFR). Indivíduos sem qualquer ancestralidade acima de 50% foram anotados como mistos. Para os resultados discordantes de ancestralidade quanto usadas as duas abordagens diferentes, foi considerado o resultado do PMDA array.

3.6 Estatística

Para os testes de associações entre variáveis categóricas foi utilizado o teste exato de Fisher ou qui-quadrado. Para a análise de risco foi utilizado o método de regressão logística multivariada. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Seleção dos casos

A casuística deste estudo foi de 400 casos de pacientes do sexo feminino com diagnóstico de câncer de mama triplo-negativo, que desenvolveram, ou não, metástase a distância, em qualquer sítio anatômico (exceto mama contralateral, linfonodos regionais e musculatura da parede torácica), e que foram tratadas no AC Camargo Cancer Center entre janeiro de 2001 e fevereiro de 2020. Dessas 132 desenvolveram metástase e 268 não desenvolveram.

4.2. Caracterização genética de *BRCA1* e *BRCA2*

Um total de 399 dos 400 (99.8%) casos foram avaliados para *BRCA1/2*. Desses 51,4% (205/399) dos casos já possuíam o resultado do teste genético de estudos anteriores do grupo, 37,3% (149/399) dos casos possuíam o resultado do teste genético disponíveis no banco de dados do Laboratório de Diagnóstico Genômico da Instituição, e 11,3% (45/399) restantes foram avaliados para esse estudo.

Para os 45 casos que foram exclusivamente testados para este trabalho, em 17 deles a avaliação foi feita em DNA constitutivo (leucócito) e em 28 a análise foi feita em DNA do tecido tumoral dada a indisponibilidade do DNA constitutivo. Dado que variantes somáticas em *BRCA1* e *BRCA2* são extremamente raras em câncer de mama TN^(15, 30), neste estudo, as variantes P/PP detectadas nos tecidos tumorais e cuja origem não pode ser avaliada devido a falta de DNA representativo de células constitutivas (6 casos – 97 (VAF = 71%), 107 (VAF = 19,5%), 114 (VAF = 8%), 117 (VAF = 83,7%), 118 (VAF = 3,8%) e 119 (VAF = 47,4%)) foram consideradas supostamente germinativas quando a VAF da variante era próxima de 50% (entre 45 a 55%) (tabela 4).

Identificou-se variantes P ou PP nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em 21,5% (86/399) dos casos, onde 81,4% (70/86) eram *BRCA1-P/PP* e 18,6% (16/86) *BRCA2-P/PP*. A taxa de variantes

P e PP em *BRCA1*, considerando toda a casuística, foi de 17,5% (70/399) e, quando consideramos as mulheres diagnosticadas com até 40 anos, esse valor elevou-se para 25,4% (36/142).

Além das variantes P e PP encontradas nesses genes, que estão apresentadas na tabela 4, também foram encontradas 10 variantes de significado incerto (*VUS*, do inglês *variant of uncertain significance*), cinco (1,3% - 5/399) em *BRCA2* e, cinco (1,3% - 5/399) *VUS* em *BRCA1* (tabela 5). Finalmente 75,9% (303/399) dos casos não apresentaram variantes P, PP e *VUS* em ambos os genes e foram denominadas casos selvagens para *BRCA1/2* (*BRCA1/2*-WT) (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Número de variantes encontradas nos genes *BRCA1/2* nas 399 amostras caracterizadas.

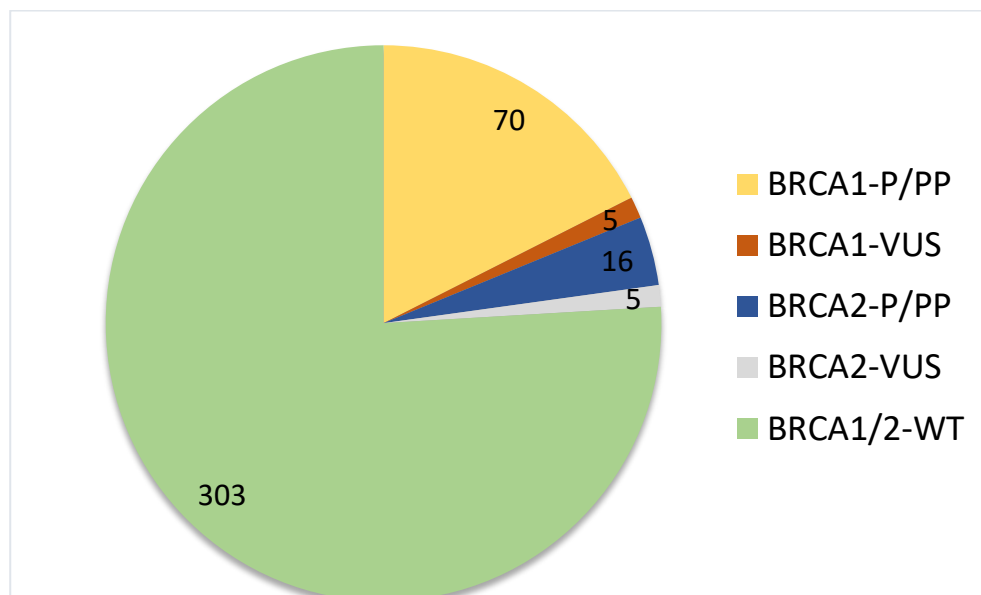


Tabela 4 - Variantes genéticas P/PP encontradas em *BRCA1* e *BRCA2* e suas classificações. ND: não disponível – o status de *BRCA1/2* foi obtido através do prontuário, não havendo amostra de DNA germinativo disponível no laboratório. (*) DNA do tumor analisado

Nº do caso	ID da amostra	Variante genética encontrada	Classificação da variante	Status BRCA1/2	Local responsável pela análise
15	Adamant34	NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC; p.(Gln1756Profs)	<i>BRCA1</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA1</i> -mutado	LGBM (outros estudos)
20	ND	NM_000059.4(BRCA2):c.5216dup; p.(Tyr1739*)	<i>BRCA2</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA2</i> -mutado	LDG
22	TBM_VG_P05	NM_007294.3(BRCA1):c.211A>G; p.(Arg71Gly)	<i>BRCA1</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA1</i> -mutado	LGBM (outros estudos)
30	CTC Meta 08	NM_000059.4(BRCA2):c.4808del; p.(Asn1603Thrfs*14)	<i>BRCA2</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA2</i> -mutado	LDG
34	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.791_794delGTTC; p.(Ser264Metfs)	<i>BRCA1</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA1</i> -mutado	LDG
38	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5074+2T>C	<i>BRCA1</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA1</i> -mutado	LDG
40	CTC Meta 23	NM_000059.4(BRCA2):c.2830A>T; p.(Lys944*)	<i>BRCA2</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA2</i> -mutado	LDG
41	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.1687C>T; p.(Gln563Ter)	<i>BRCA1</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA1</i> -mutado	LDG
43	Adamant20 / H19-035038 (pulmão)	NM_007294.3(BRCA1):c.34C>T; p.(Gln12Ter)	<i>BRCA1</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA1</i> -mutado	LGBM (outros estudos)
45	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.441+2T>A	<i>BRCA1</i> variante patogênica/PP	<i>BRCA1</i> -mutado	LDG
59	M305/ TN 27S / H15-012714-1B (SNC)	NM_007294.3(BRCA1):c.211A>G; p.(Arg71Gly)	<i>BRCA1</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA1</i> -mutado	LGBM (outros estudos)
63	M303/ TN21S	NM_007294.3(BRCA1):c.4484G>T; p.(Arg1495Met)	<i>BRCA1</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA1</i> -mutado	LGBM (outros estudos)
79	M281T	NM_000059.4(BRCA2):c.5644_5647del; p.(Ser1882Lysfs*26)	<i>BRCA2</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA2</i> -mutado	LGBM (outros estudos)
84	CTC Meta 11	NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC; p.(Gln1756Profs)	<i>BRCA1</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA1</i> -mutado	LDG
90	SM 170-1	NM_007294.3(BRCA1):c.1380dupA; p.(Phe461Ilefs)	<i>BRCA1</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA1</i> -mutado	LDG
95	M276T/ M276N	NM_007294.3(BRCA1):c.181T>G; p.(Cys61Gly)	<i>BRCA1</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA1</i> -mutado	LGBM (outros estudos)
96	M287T/ TN 22S	NM_007294.3(BRCA1):c.4183C>T; p.(Gln1395*)	<i>BRCA1</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA1</i> -mutado	LGBM (outros estudos)
97(*)	M721T	NM_007294.3(BRCA1):c.4964_4982del; p.(Ser1655fs)	<i>BRCA1</i> variante <i>P</i>	<i>BRCA1</i> -mutado	LGBM (este estudo)
103	M604T	NM_000059.4(BRCA2):c.3744_3747del; p.(Ser1248Argfs*10)	<i>BRCA2</i> variante <i>P</i> germinativa	<i>BRCA2</i> -mutado	LDG
107(*)	1027184-AAG (mama)	NM_007294.3(BRCA1):c.3607C>T; p.(Arg1203Ter)	<i>BRCA1</i> variante <i>P</i>	<i>BRCA1</i> -mutado	LGBM (este estudo)
114(*)	1144558-AA (mama)	NM_000059.4(BRCA2):c.4155_4156insT;p.Asp1386Ter	<i>BRCA2</i> variante <i>P</i>	<i>BRCA2</i> -mutado	LGBM (este estudo)

117(*)	1032143-AH (snc) / 1032143 AI (snc)	NM_007294.3(BRCA1):c.211A>G; p.(p.Arg71Gly)	<i>BRCA1 variante P</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (este estudo)
118(*)	1128616 AA (mama)	NM_000059.4(BRCA2):c.8165C>G; p.(Thr2722Arg)	<i>BRCA2 variante patogênica</i>	<i>BRCA2-mutado</i>	LGBM (este estudo)
119(*)	1114989-AH (mama) / 1210025-AA (osso)	NM_000059.4(BRCA2):c.9097delA; p.(Thr3033LeufsTer29)	<i>BRCA2 variante patogênica</i>	<i>BRCA2-mutado</i>	LGBM (este estudo)
133	Adamant53	NM_007294.3(BRCA1):c.3331_3334del; p.(Gln1111Asnfs*5)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
134	Adamant54	NM_007294.3(BRCA1):c.181T>G; p.(Cys61Gly)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
141	M267T/ TN18S	NM_007294.3(BRCA1):c.66dupA; p.(Glu23Argfs*18	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
146	Adamant72	NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC; p.(Gln1756Profs*74)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
157	Adamant59	NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC; p.(Gln1756Profs*74)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
168	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC; p.(Gln1756Profs*74)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
170	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.211A>G; p.(Arg71Gly)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
174	Adamant35	NM_000059.4(BRCA2):c.9382C>T; p.(Arg3128Ter)	<i>BRCA2 variante patogênica</i>	<i>BRCA2-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
179	Adamant26	NM_007294.3(BRCA1):c.3331_3334delCAAG; p.(Gln1111Asnfs*5)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
184	Adamant21	NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC; p.(Gln1756Profs*74)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
194	Adamant11	NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC; p.(Gln1756Profs*74)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
218	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC; p.(Gln1756Profs*74)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
219	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.1297del; p.(Ala433fs)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
221	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.4035del; p.(Glu1346fs)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
222	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.65T>C; p.(Leu22Ser)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
223	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5074+2T>C	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
226	ND	NM_000059.3(BRCA2):c.7900del; p.(Met2634fs)	<i>BRCA2 variante patogênica</i>	<i>BRCA2-mutado</i>	LDG
234	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC; p.(Gln1756Profs*74)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
242	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC; p.(Gln1756Profs*74)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
243	Adamant29	NM_007294.4(BRCA1):c.1687C>T; p.(Gln563Ter)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)

245	ND	NM_000059.3(BRCA2):c.4131_4132insTGAGGA; p.(Thr1378_Gly1712delinsTer)	<i>BRCA2 variante patogênica</i>	<i>BRCA2-mutado</i>	LDG
249	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.3770_3771delAG; p.(Glu1257Glyfs)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
254	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.3817C>T; p.(Gln1273Ter)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
257	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5300del; p.(Cys1767Phefs)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
258	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC; p.(Gln1756Profs*74)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
260	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5062_5064delGTT; p.(Val1688del)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
267	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5074+2T>C	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
273	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5074+2T>C	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
274	ND	NM_000059.3(BRCA2):c.4909_4910del; p.(Val1637Ter)	<i>BRCA2 variante patogênica</i>	<i>BRCA2-mutado</i>	LDG
279	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.4163_4164AG[1] (p.Gln1388_Ser1389insTer)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
280	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.66_67AG[1]; p.(Glu23fs)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
283	Adamant 46	NM_007294.3(BRCA1):c.4484G>T; p.(Arg1495Met)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
284	ND	NM_000059.3(BRCA2):c.6443_6444delCT; p.(Ser2148Tyrfs)	<i>BRCA2 variante patogênica</i>	<i>BRCA2-mutado</i>	LDG
290	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.66_67AG[1]; p.(Glu23fs)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
291	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.3331_3334delCAAG; p.(Gln1111Asnfs)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
297	M369T	NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC; p.(Gln1756Profs*74)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
303	ND	NM_000059.3(BRCA2):c.4005dupA; p.(Phe1336Ilefs)	<i>BRCA2 variante patogênica</i>	<i>BRCA2-mutado</i>	LDG
308	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.2389_2390delGA; p.(Glu797Thrfs)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
313	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC; p.(Gln1756Profs*74)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
325	M315T/ TN 23S	NM_007294.3(BRCA1):c.689_692delAGAC; p.(Glu230Glyfs*3)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
328	M280T/TN20S	NM_007294.3(BRCA1):c.1242delC; p.(Asp414Glufs*3)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
334	MIC234/ TN4S	NM_007294.3(BRCA1):c.188T>A; p.(Leu63*)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
336	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5074+2T>C	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
345	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5074+2T>C	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
347	MJ2034	NM_007294.3(BRCA1):c.5251C>T; p.(Arg1751*)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
348	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.3770_3771delAG; p.(Glu1257Glyfs)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG

349	SM95-1T	NM_007294.3(BRCA1):c.4287C>A; p.(Tyr1429*)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
350	MIC189/ TN 2S	NM_000059.3(BRCA2):c.2701del; p.(Ala902fs)	<i>BRCA2 variante patogênica</i>	<i>BRCA2-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
351	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC; p.(Gln1756Profs)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
355	M355T	NM_007294.3(BRCA1):c.181T>G; p.(Cys61Gly)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
360	M256T/ TN 6S	NM_007294.3(BRCA1):c.1A>G; p.(Met1?)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
367	MJ2026	NM_007294.3(BRCA1):c.3331_3334del; p.(Gln1111fs)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
374	M282T/TN19S	NM_007294.3(BRCA1):c.2524delT; p.(Glu842Lysfs*4)	<i>BRCA1 variante PP</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
376	ND	NM_000059.3(BRCA2):c.9382C>T; p.(Arg3128Ter)	<i>BRCA2 variante patogênica</i>	<i>BRCA2-mutado</i>	LDG
380	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5152+2T>C	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
382	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.4117G>T; p.(Glu1373Ter)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
384	MJ2021	NM_007294.3(BRCA1):c.181T>G; p.(Cys61Gly)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
390	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.5266dupC; p.(Gln1756Profs*74)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
394	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.66dupA; p.(Glu23Argfs)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
395	MJ2012	NM_007294.3(BRCA1):c.4963T>C; p.(Ser1655Pro)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LGBM (outros estudos)
396	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.3331_3334delCAAG; p.(Gln1111Asnfs)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG
398	ND	NM_007294.3(BRCA1):c.66_67AG[1]; p.(Glu23fs)	<i>BRCA1 variante patogênica</i>	<i>BRCA1-mutado</i>	LDG

Tabela 5 - Variantes de significado incerto (VUS) encontradas em *BRCA1* e *BRCA2*. ND: não disponível - o status de *BRCA1/2* foi obtido através do prontuário, não havendo amostra de DNA germinativo disponível no laboratório

Nº do caso	ID da amostra	DNA analisado/Origem da variante	Variante genética encontrada	Classificação da variante	Local responsável pela análise
3	M370T	Leucócito/Germinativa	NM_007294.3(BRCA1):c.5108A>G; p.(Tyr1703Cys)	VUS em <i>BRCA1</i>	LGBM (outros estudos)
4	MJ2037	Leucócito/Germinativa	NM_007294.3(BRCA1):c. 5006C>T; p.(Ala1669Val)	VUS em <i>BRCA1</i>	LGBM (outros estudos)
5	M386T	Leucócito/Germinativa	NM_000059.3(BRCA2):c.9364G>A; p.(Ala3122Thr)	VUS em <i>BRCA2</i>	LGBM (outros estudos)
6	TBM VG P08	Leucócito/Germinativa	NM_000059.3(BRCA2):c.5737T>G; p.(Cys1913Gly)	VUS em <i>BRCA2</i>	LGBM (outros estudos)
7	SG 18064	Leucócito/Germinativa	NM_000059.3(BRCA2):c.4928T>C; p.(Val1643Ala)	VUS em <i>BRCA2</i>	LGBM (este estudo)
126	ND	Leucócito/Germinativa	NM_000059.3(BRCA2):c.619A>G; p.(Thr207Ala)	VUS em <i>BRCA2</i>	LDG
264	Adamant13	Leucócito/Germinativa	NM_000059.3(BRCA2):c.9510C>G; p.(Asp3170Glu)	VUS em <i>BRCA2</i>	LGBM (outros estudos)
265	Adamant14	Leucócito/Germinativa	NM_007294.3(BRCA1):c.1712T>C; p.(Ile571Thr)	VUS em <i>BRCA1</i>	LGBM (outros estudos)
319	M292/ TN 25S	Leucócito/Germinativa	NM_007294.3(BRCA1):c.4096+1G>A	VUS em <i>BRCA1</i>	LGBM (outros estudos)
388	Adamant60	Leucócito/Germinativa	NM_007294.3(BRCA1):c.3677T>C; p.(Phe1226Ser)	VUS em <i>BRCA1</i>	LGBM (outros estudos)

Os dados clínicos disponíveis para os casos caracterizados para *BRCA1/2* (n=399) estão apresentados na Tabela 6, os casos considerados nesta tabela como “Sem variantes P/PP”, se referem aos casos selvagens e aos que apresentaram VUS em *BRCA1/2*. A média de idade ao diagnóstico foi de 46,8 anos entre todos os casos caracterizados geneticamente, sendo significativamente menor para *BRCA1*-P/PP (41,7 anos), e semelhante para *BRCA2*-P/PP (47,1 anos) e para as pacientes sem variantes P/PP (47,9 anos) (p=0,040).

Em relação as demais variantes, nenhuma delas se mostrou significativamente enriquecida em nenhum dos grupos relacionados ao status de *BRCA1* e *BRCA2*. De forma geral a cor/raça autodeclarada majoritária foi branca (82% 241/294), e a maior parte dos tumores eram T2, N0, estadiamento II, com grau 3 do tumor e, foram classificados como carcinoma invasivo de tipo não especial.

Tabela 6 -Dados clínicos dos 399 casos caracterizados geneticamente para *BRCA1/2*.

	No. de pacientes (%)			<i>P</i>
	<i>BRCA1-P/PP</i>	<i>BRCA2-P/PP</i>	Sem variantes (P/PP)	
Características	<i>N</i> = 70	<i>N</i> = 16	<i>N</i> = 313	
Idade ao diagnóstico de CMTN	41.7 [25-82]	47.1 [32-74]	47.9 [17-87]	.040
Etnia auto-declarada				
Branca	47 (67.1)	9 (56.3)	185 (59.1)	.401
Preta	0	1 (6.3)	10 (3.2)	
Parda	5 (7.1)	1 (6.3)	26 (8.3)	
Amarela	1 (1.4)	1 (6.3)	8 (2.6)	
Desconhecida	17 (24.3)	4 (25)	84 (26.8)	
Classificação de tumor				
T1	11 (15.7)	1 (6.3)	48 (15.3)	.424
T2	38 (54.3)	6 (37.5)	161 (51.4)	
T3	8 (11.4)	4 (25)	42 (13.4)	
T4	7 (10)	3 (18.8)	45 (14.4)	
TX	3 (4.3)	1 (6.3)	6 (1.9)	
Não disponível	3 (4.3)	1 (6.3)	11 (3.5)	
Classificação de linfonodo				
N0	35 (50)	6 (37.5)	138 (44.1)	.777
N1	16 (22.8)	5 (31.3)	92 (29.4)	
N2	10 (14.3)	1 (6.3)	38 (12.1)	
N3	4 (5.7)	1 (6.3)	19 (6.1)	
N4	0	0	2 (0.6)	
NX	2 (2.9)	2 (12.5)	12 (3.8)	
Não disponível	3 (4.3)	1 (6.3)	11 (3.5)	
Estadiamento				
I	12 (17.1)	1 (6.3)	33 (10.5)	.366
II	33 (47.1)	6 (37.5)	155 (49.5)	
III	17 (24.3)	6 (37.5)	86 (27.5)	
IV	2 (2.9)	2 (12.5)	20 (6.4)	
Não disponível	6 (8.6)	1 (6.3)	19 (6.1)	
Grau tumoral				
1	1 (1.4)	0	3 (0,10)	0.775
2	16 (22.9)	5 (31.3)	77 (24.6)	
3	44 (62.9)	10 (62.5)	220 (70.3)	
Não disponível	9 (12.9)	1 (6.3)	13 (4.1)	
Histologia				
Ductal	60 (85.7)	11 (68.8)	264 (84.3)	.071
Lobular	0	0	8 (2.6)	
Misto	1 (1.4)	3 (18.8)	26 (8.3)	
Outros*	6 (8.6)	1 (6.3)	13 (4.1)	
Não disponível	3 (4.3)	1 (6.3)	2 (0.6)	

* Metaplásico, sarcomatóide, medular, papilar, cístico, inflamatório e adenóide.

4.3 Grupos CMTN e os sítios metastáticos

Dentre toda a casuística, 132 (33% - 132/400) casos foram acometidos por metástase a distância. Os primeiros sítios anatômicos acometidos por metástases com maior frequência foram: o pulmão (36% - 48/132), SNC (27% - 36/132) e ossos (18% - 24/132) (Tabela 7), sendo que 30,3% das pacientes (40/132) tiveram diagnóstico de metástase em apenas um sítio anatômico.

Tabela 7 - Primeiros sítios anatômicos que foram acometidos por metástase (n=132).

Local da metástase	Primeiro evento n (%) (n=132)
Pulmão	48 (36.4)
SNC	36 (27.3)
Ossos	24 (18.2)
Fígado	10 (7.6)
Baço	0
Pericárdio	0
Mediastino	2 (1.5)
Tireoide	1 (0,75)
Pele	2 (1.5)
Linfonodo distante	6 (4.5)
Ovário	1 (0,75)
Peritônio	0
Musculatura	2 (1.5)
Rim	0

Considerando os 132 casos metastáticos 131 foram caracterizados geneticamente para *BRCA1/2*. Desses casos, 18,3% apresentaram variantes P/PP em *BRCA1/2* (24/131), correspondendo a 12,2% (16/131) de portadoras de variantes P/PP em *BRCA1* e 6,1% (8/131) em *BRCA2*.

Considerando os sítios de primeiro acometimento por metástase, observou-se que pulmão ($p=0.05$) foi mais frequentemente acometido nos casos *BRCA1-P/PP* (50% - 8/16) e SNC foi o mais frequente nos casos *BRCA2-P/PP* (62,5% - 5/8). Também identificou-se um maior percentual

de casos de metástase óssea no grupo *BRCA2P/PP* (37,5%), mas sem significância estatística (Tabela 8).

Tabela 8 - Primeiro evento metastático entre os casos caracterizados geneticamente para *BRCA1/2* (n=131).

	No. de pacientes (%)			
	<i>BRCA1-P/PP</i>	<i>BRCA2-P/PP</i>	Sem variantes P/PP	<i>P</i>
<i>Variáveis</i>	<i>N = 16</i>	<i>N = 8</i>	<i>N = 107</i>	
Primeiro evento				
Osso	2 (12.5)	3 (37.5)	18 (16.8)	.18
Fígado	0	0	10 (9.3)	.30
Pulmão	8 (50)	0	40 (37.4)	.05
SNC	5 (31.3)	5 (62.5)	25 (23.4)	.04
Outros sítios*	1 (6.2)	0	13 (12.1)	.47
* Baço, pericárdio, mediastino, tireoide, pele, linfonodos distantes, ovário, peritônio, musculatura e rim.				

Em uma análise realizada a parte neste trabalho, onde optamos por avaliar se o risco de desenvolver metástases no SNC e em outros sítios anatômicos é maior em pacientes portadoras de variantes P/PP em *BRCA2* com diagnóstico de CMTN, nós avaliamos 381 casos, 116 casos com diagnóstico de CMTN que desenvolveram metástase a distância para qualquer sítio anatômico, e 265 casos com diagnóstico de CMTN que não desenvolveram nenhuma metástase a distância. Neste grupo de pacientes, 18,6% (71/381) eram *BRCA1-P/PP* e 3,4% (13/381) *BRCA2-P/PP*, enquanto 78% (297/381) não tinham variantes P/PP. O desenvolvimento de metástase ocorreu em 30,4% (116/381) dos casos, sendo o SNC (60,3%), pulmão (61,2%) e osso (45,7%) os locais mais acometidos. Observou-se maior frequência de metástases no SNC (100%) e no osso (80%) em *BRCA2-P/PP* em comparação com *BRCA1-P/PP* e sem variantes P/PP (68,7%, 62,5% e 56,8%, 61,1%, respectivamente).

Além disso, foi feita também uma análise usando modelos de regressão logística multivariada que mostrou que o risco para desenvolver metástase no grupo *BRCA2-P/PP* foi significativamente maior para o SNC (OR 3.784; p=0,035) quando comparado com pacientes sem

variantes P/PP em *BRCA1/2* e pacientes portadores de *BRCA1*-P/PP (OR 0,734; p=0,411). (Tabela 9). Não foi observado um risco significativamente maior para essas pacientes (portadoras de variante P) em desenvolver metástase óssea.

Tabela 9 - Análise de regressão logística simples e múltipla para avaliação de risco de desenvolvimento de metástase para osso e para o SNC entre os grupos CMTN.

Variável	Categoria	Regressão logística simples				Regressão logística múltipla			
		OR	IC(95%) para OR		valor p	OR	IC(95%) para OR		valor p
			Inferior	Superior			Inferior	Superior	
BRCA Status	Sem variantes P/PP	Ref				Ref			
	BRCA1-P/PP	,545	,222	1,337	,185	,588	,238	1,450	,249
	BRCA2-P/PP	2,625	,774	8,904	,121	3,240	,923	11,377	,067

Desfecho:
osso

Variável	Categoria	Regressão logística simples				Regressão logística múltipla			
		OR	IC(95%) para OR		Valor p	OR	IC(95%) para OR		valor p
			Inferior	Superior			Inferior	Superior	
BRCA	Sem variantes P/PP	Ref				Ref			
	BRCA1-P/PP	,825	,407	1,673	,594	,734	,350	1,536	,411
	BRCA2-P/PP	2,812	,886	8,932	,079	3,784	1,097	13,054	,035

Desfecho:
SNC

4.4 Análise de metilação dos genes *BRCA1* e *RAD51C*

Dentre toda a casuística, 44,3% (177/400) dos casos tiveram a análise de metilação do tumor primário realizada nos genes *BRCA1* e *RAD51C*. (Anexo 4) Não foi possível realizar a análise no restante dos casos, por não possuímos o tecido tumoral disponível.

Entre os 177 casos analisados, 68,2% (48/77) foram classificados como hipermetilados e 37,7% (29/77) como intermediários. Já em *RAD51C*, um número menor (11,9% (21/177) de casos apresentaram-se hipermetilados (3,4% (6/177) intermediários e 8,5% (15/177) hipermetilados.

Além disso, especificamente para os 132 casos metastáticos, 25 (18,9%) tiveram a análise de metilação do tumor metastático realizada, 16% (4/25) foram classificados como hipermetilados em *BRCA1* e 4% (1/25) intermediários e 80% (20/25) não-hipermetilados. Já em *RAD51C*, 8% (2/25) dos casos apresentaram-se hipermetilados, 4% (1/25) intermediários e 88% (22/25) não-hipermetilado. Ainda, 9% (16/177) dos casos tiveram as análises de tumores primários e metastáticos pareadas, e em 62,5% (10/16) para *BRCA1* e 87,5% (14/16) para *RAD51C* o resultado da metástase foi concordante com o do tumor primário. (Tabela 10)

Tabela 10 - Análise de metilação pareada entre os casos com tumor primário e metastático (n=16).

Nº do caso	ID da amostra	Metástase	Classificação do tecido	% Células neoplásicas	Metilação BRCA1 tu fresco	Metilação BRCA1 FFPE	Metilação RAD51C tu fresco	Metilação RAD51C FFPE	Classificação de metilação BRCA1 primário	Classificação de metilação RAD51C primário	Classificação de metilação BRCA1 metástase	Classificação de metilação RAD51C metástase
1	M302	Sim	Tumor fresco primário	N/D	4,60%	N/A	5,60%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
1	1399195-BAA (SNC)	Sim	Tumor FFPE metástase	40%	N/A	67,80%	N/A	3,50%	-	-	Hipermetilado	Não metilado
1	1230704-AA (osso)	Sim	Tumor FFPE metástase	40%	N/A	0,90%	N/A	1,30%	-	-	Não metilado	Não metilado
2	M262T/ TN10S	Sim	Tumor fresco primário	80%	1,50%	N/A	10,60%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
2	H15-001541-1A (pulmão)	Sim	Tumor FFPE metástase	20%	N/A	1,30%	N/A	2,20%	-	-	Não metilado	Não metilado

41	H17-002974-1-A (lombar)	Sim	Tumor FFPE metástase	55%	N/A	9,50%	N/A	14,40%	-	-	Não metilado	Não metilado
41	H15-018008-1A (mama)	Sim	Tumor FFPE primário	55%	N/A	2,00%	N/A	1,20%	Não metilado	Não metilado	-	-
49	M326T	Sim	Tumor fresco primário	N/D	80,30%	N/A	1,60%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
49	H15-025091-1A (pulmão)	Sim	Tumor FFPE metástase	40%	N/A	58,30%	N/A	1,40%	-	-	Hipermetilado	Não metilado
57	M737T / SG 21801	Sim	Tumor fresco primário	85%	1,10%	N/A	3,60%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
57	H17-011198 (snc)	Sim	Tumor FFPE metástase	60%	N/A	2,80%	N/A	2,80%	-	-	Não metilado	Não metilado
58	1239559 (mama)	Sim	Tumor FFPE primário	25%	N/A	15,33%	N/A	1,60%	Não metilado	Não metilado	-	-

58	H14-002630 1A (snc)	Sim	Tumor FFPE metástase	85%	N/A	2,60%	N/A	61,70%	-	-	Não metilado	Hipermetilado
59	M305/ TN 27S	Sim	Tumor fresco primário	40%	23,00%	N/A	2,40%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
59	H15-012714-1B (SNC)	Sim	Tumor FFPE metástase	40%	N/A	2,30%	N/A	1,80%	-	-	Não metilado	Não metilado
62	M380T	Sim	Tumor fresco primário	95%	67,40%	N/A	2,50%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
62	1364437-AAA (pulmão)	Sim	Tumor FFPE metástase	60%	N/A	2,00%	N/A	1,40%	-	-	Não metilado	Não metilado
65	Adamant10	Sim	Tumor fresco primário	N/D	28,80%	N/A	2,10%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
65	H18-005562 (osso)	Sim	Tumor FFPE metástase	40%	N/A	15,00%	N/A	3,60%	-	-	Não metilado	Não metilado

66	M293	Sim	Tumor fresco primário	N/D	28,80%	N/A	0,80%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
66	1227212-AA (SNC)	Sim	Tumor FFPE metástase	45%	N/A	1,20%	N/A	2,90%	-	-	Não metilado	Não metilado
71	1105896 AH (mama)	Sim	Tumor FFPE primário	90%	N/A	1,35%	N/A	2,34%	Não metilado	Não metilado	-	-
71	1310252 AAA (fígado)	Sim	Tumor FFPE metástase	90%	N/A	1,03%	N/A	0,70%	-	-	Não metilado	Não metilado
80	M259T/TN9S	Sim	Tumor fresco primário	100%	23,70%	N/A	2,70%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
80	H15-002175-1A (pele distante)	Sim	Tumor FFPE metástase	40%	N/A	1,50%	N/A	8,20%	-	-	Não metilado	Não metilado
84	948223-AA (mama)	Sim	Tumor FFPE primário	65%	N/A	55,90%	N/A	56,40%	Hipermetilado	Hipermetilado	-	-

84	H15-020315-3B (pulmão)	Sim	Tumor FFPE metástase	5%	N/A	1,20%	N/A	1,10%	-	-	Não metilado	Não metilado
85	M308	Sim	Tumor fresco primário	95%	1,00%	N/A	0,80%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
85	1025890-AB (SNC)	Sim	Tumor FFPE metástase	50%	N/A	1,50%	N/A	0,90%	-	-	Não metilado	Não metilado
93	M291	Sim	Tumor fresco primário	40%	1,00%	N/A	1,30%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
93	1255399 (pericárdio)	Sim	Tumor FFPE metástase	30%	N/A	3,10%	N/A	1,40%	-	-	Não metilado	Não metilado
104	M727T	Sim	Tumor fresco primário	60%	4,50%	N/A	3,30%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
104	H16-025935-1A (pele distante)	Sim	Tumor FFPE metástase	20%	N/A	1,22%	N/A	1,08%	-	-	Não metilado	Não metilado

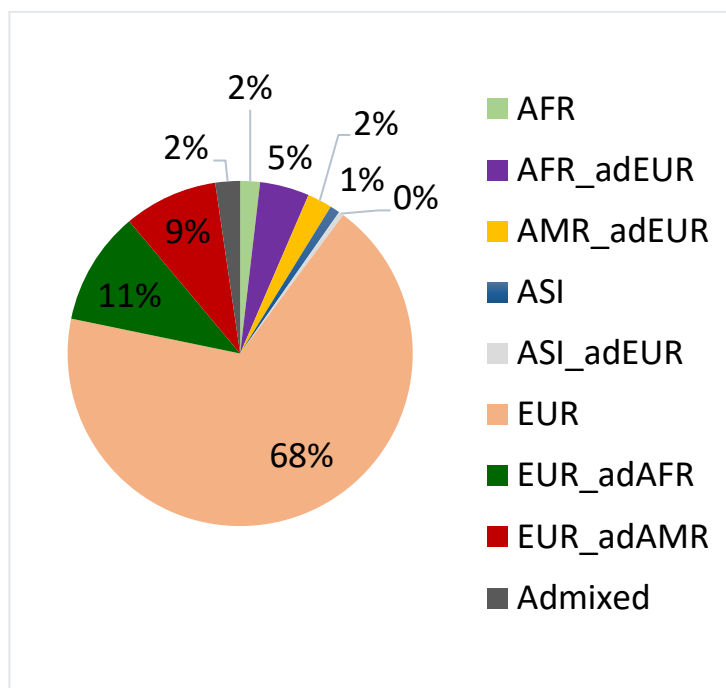
Ocorreu concordância entre a classificação de metilação em ambos os tumores (primário e metastático) em *BRCA1* para 62,5% (10/16) dos casos e em *RAD51C* para 87,5% (14/16). Nos casos discordantes não foi observado nenhuma tendência a maior ou menor nível de metilação nos tecidos metastáticos ou primários.

4.5 Análise de ancestralidade

A análise de ancestralidade foi realizada para 54% (216/400) dos casos (Anexo 5), sendo 173 casos investigados por análise de fragmentos e 86 por microarranjo de DNA de genotipagem (PMDA) e 40 em ambas. Quando o mesmo caso foi analisado pelas duas metodologias utilizadas, considerou-se o dado da metodologia de genotipagem.

A maioria dos casos foi categorizada como ancestralidade europeia (68%) (Gráfico 2) como ancestralidade primária, seguida de europeia como primária e africana (11%) e ameríndia (9%) como secundária, respectivamente.

Gráfico 2 - Ancestralidade genética categorizada segundo OAK et al, 2020(1) e Carrot-Zhang et al, 2020(2). Indivíduos que tinham a segunda ancestralidade com menos de 20% foram anotados com suas ancestralidades primárias. Indivíduos que tinham mais de 20% da ancestralidade secundária foram classificados como amostras mistas (“admixed”), e tanto as ancestralidades primárias quanto as secundárias foram anotadas. Indivíduos sem qualquer ancestralidade acima de 50% foram anotados como mistos.



Nós avaliamos as 9 categorias de ancestralidade em relação ao mecanismo de DRH, e foi visto que apesar da significância estatística encontrada entre o mecanismo genético (status de mutação de *BRCA1/2*) ($p=0,024$) e as categorias de ancestralidade, não ficou evidente se há associação de uma maior proporção deste evento nas mulheres com ancestralidade predominantemente europeia. (Tabela 11) Nenhuma associação entre o mecanismo epigenético (hipermetilação de *BRCA1* e/ou *RAD51C*) foi considerada entre as categorias de ancestralidade. (Tabela 12)

Tabela 11. Análise de associação entre os 9 grupos de ancestralidade genética e o mecanismo genético que leva a DRH

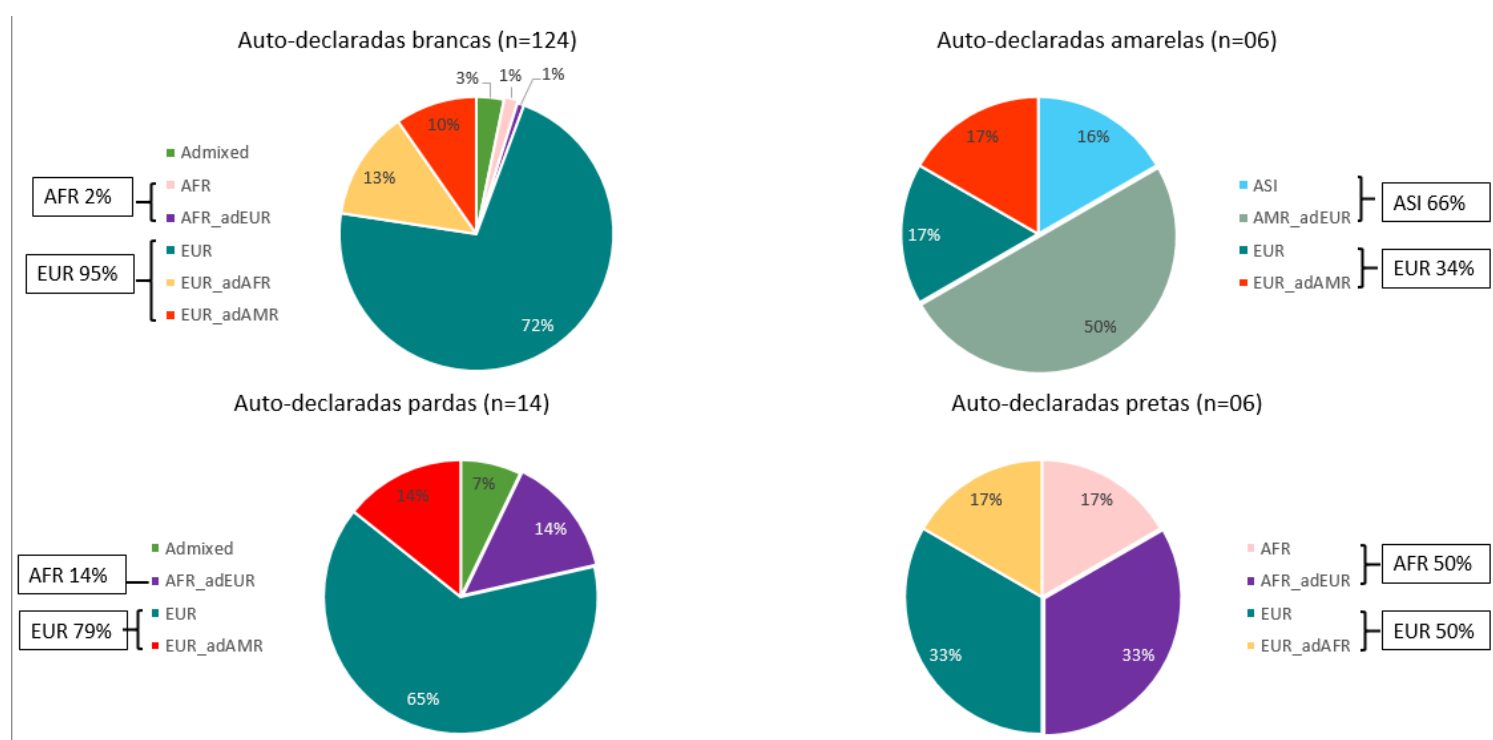
Classificação de ancestralidade	Status <i>BRCA1/2</i> (%)		P
	<i>BRCA1/2-P/PP</i> (n=34)	Sem variante <i>P/PP</i> (n=182)	
Admixed	3 (8,8)	2 (1,1)	0,024
AFR	1 (2,9)	3 (1,6)	
AFR_adEUR	1 (2,9)	9 (4,9)	
ASI	0	2 (1,1)	
ASI_adEUR	1 (2,9)	0	
AMR_adEUR	1 (2,9)	4 (2,2)	
EUR	17 (50)	130 (71,4)	
EUR_adAFR	6 (17,6)	17 (9,3)	
EUR_adAMR	4 (11,8)	15 (8,2)	

Tabela 12. Análise de associação entre os 8 grupos de ancestralidade genética e o mecanismo epigenético que leva a DRH

Classificação de ancestralidade	Status de metilação <i>BRCA1/RAD51C</i> (%)		P
	Hipermetilado (n=76)	Não metilado (n=66)	
Admixed	1 (1,4)	2 (3)	0,804
AFR	1 (1,4)	1 (1,5)	
AFR_adEUR	5 (6,6)	2 (3,1)	
ASI	1 (1,4)	0	
AMR_adEUR	2 (2,6)	3 (4,5)	
EUR	53 (69,7)	42 (63,6)	
EUR_adAFR	8 (10,5)	8 (12,1)	
EUR_adAMR	5 (6,6)	8 (12,1)	

Além disso, dentre os 216 casos que tiveram a análise genética de ancestralidade realizada, 69,4% (150/216) também possuíam o dado de etnia autodeclarada disponível. Dentre os 150 casos com ambos os dados disponíveis, observou-se uma concordância entre a informação autodeclarada e a ancestralidade predominante. No grupo de mulheres auto-declaradas brancas observou-se um percentual de 95% das pacientes com maior composição de ancestralidade europeia. Já o grupo de mulheres auto-declaradas pretas observou-se um percentual de 50% das pacientes com maior composição de ancestralidade africana. O grupo de mulheres que se autodeclararam amarelas encontramos 66% delas com maior composição de ancestralidade asiática e ameríndia. Por outro lado no grupo de mulheres autodeclaradas pardas, encontramos 66% de mulheres com ancestralidade europeia predominante e somente 14% com ancestralidade africana predominante (Gráfico 3).

Gráfico 3 - Análise de ancestralidade genética em comparação com a etnia auto-declarada (n=150).



5 DISCUSSÃO

Neste trabalho foram incluídos casos de mulheres com diagnóstico primário de câncer de mama do subtipo triplo-negativo com e sem o desenvolvimento de metástase à distância. Este subtipo acomete com maior frequência mulheres que apresentam mutações germinativas no gene *BRCA1*⁽⁶⁻⁹⁾, com percentagem de pacientes portadoras de variantes P/PP em *BRCA1* que variam de 8-30%⁽¹⁵⁾. No trabalho atual constatamos que 21,6% (86/399) das pacientes eram portadoras de variantes P/PP em *BRCA1* (17,5%) e *BRCA2* (4,1%). Esse dado reforça que grande percentual de mulheres diagnosticadas com esse subtipo de câncer de mama, independente de história familiar positiva para câncer, são portadoras de mutação em *BRCA1* conforme detectado em estudos prévios^(15, 67-68).

Outra característica das mulheres diagnosticadas com CMTN e portadoras de mutações em *BRCA1* é o diagnóstico em idade jovem (<40 anos)^(61,62). Conforme esperado, neste trabalho, a média da idade ao diagnóstico inicial foi de 46,8 anos para toda a casuística, e 41,7 anos para *BRCA1*/P/PP. Um estudo do grupo identificou 13% de casos *BRCA1*-P/PP, e esse número cresceu para 26% quando considerava-se apenas as mulheres jovens⁽¹⁵⁾; neste trabalho, embora haja uma sobreposição com a coorte do estudo anterior, conseguimos ver o mesmo padrão em uma casuística maior, pois identificou-se 17,5% (70/399) de *BRCA1*-P/PP entre toda a casuística, e esse número eleva-se para 25,4% (36/142) quando considera-se apenas os casos de mulheres jovens ao diagnóstico de CMTN com variantes P/PP em *BRCA1*.

Neste estudo, observou-se que o evento de hipermetilação em *BRCA1* ocorreu em 43,5% (77/177) dos casos, quando considera-se todos os casos analisados (177/400), confirmando o que já foi exposto na literatura, que a hipermetilação é um evento frequente em *BRCA1* ^(15,27) m um estudo do grupo, identificou-se que 33% das mulheres de 41 a 55 anos tiveram perda de função de *BRCA1* devido a hipermetilação da região promotora, e

esse número elevou-se para 55% quando considerado apenas as mulheres jovens⁽¹⁵⁾. Neste trabalho, observou-se que o mesmo padrão se mantém, onde dentre as mulheres mais velhas (≥ 41 anos), 39,2% (51/130) apresentaram hipermetilação em *BRCA1*, e o percentual aumentou quando considerou-se as mulheres mais jovens ≤ 40 anos, que apresentaram 55,3% (26/47) de hipermetilação em *BRCA1*.

Apesar do estudo de Polak et al trazer a associação de alterações epigenéticas em *BRCA1/RAD51C* com mulheres de ascendência africana, enquanto alterações genéticas em *BRCA1/2* estão mais associadas com mulheres de ascendência europeia⁽²⁷⁾, no nosso estudo não identificamos associação entre as categorias de ancestralidade analisadas e o status de mutação em *BRCA1/2* e hipermetilação de *BRCA1* e *RAD51C*.

Estudos têm mostrado que o subtipo TN está altamente relacionado com desenvolvimento de metástase a distância^(12,64), porém pouco ainda se sabe entre a associação de *BRCA1/2*-P/PP e o desenvolvimento de metástase entre esse subtipo de tumor. Neste trabalho, observamos que dentre os 32,8% (131/400) dos casos que desenvolveram metástase a distância e foram caracterizados para *BRCA1/2*, a maioria desenvolveu para os pulmões (61%) e SNC (59%), conforme identificado em outros trabalhos^(48,61). Verificou-se que os casos *BRCA1*-P/PP e sem variantes P/PP apresentaram maior associação com o desenvolvimento de metástase para pulmão e SNC, o que confirma o dado encontrado por Albiges e colaboradores⁽⁶⁶⁾.

Um trabalho de Song e colaboradores⁽⁴⁷⁾ identificou que a frequência de metástases no SNC foi significativamente maior para as mulheres com mutações germinativas em *BRCA1* ($p = .02$) e *BRCA2* ($p < .001$), e quando considerou-se o subtipo do CM, o CMTN apresentou uma maior frequência de metástases para o SNC no grupo de mulheres com mutações germinativas em *BRCA1* ($p = .04$). Foi visto também que o risco de desenvolver metástase para o SNC aumentava em mulheres com CM com

receptores hormonais positivos e que eram *BRCA2*-mut ($p<0,001$) e entre as mulheres com CMTN e *BRCA1*-mut ($p=0,04$). O nosso trabalho, por outro lado, contribuiu com a identificação do risco aumentado em quase 4 vezes para o desenvolvimento de metástase em SNC para o grupo de mulheres com CMTN e variantes P/PP em *BRCA2* ($p=0,035$).

Mesmo sendo o CMTN em pacientes portadoras de variantes P/PP em *BRCA2* um evento raro, foi possível identificar neste trabalho que mulheres portadoras de variantes P/PP em *BRCA2* possuem risco significativamente maior de desenvolverem metástase no SNC (OR 3,784; $p=0,035$) e próximo a significância de desenvolverem metástase óssea (OR 3,240; $p=0,067$). Assim são necessários esforços multicêntricos visando o aumento desse grupo para obtenção de uma análise estatística mais robusta para confirmar o maior risco de metástase no SNC e ósseo e, com isso, poder estabelecer vigilância diferenciada nessas mulheres.

6 CONCLUSÃO

A frequência de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* nessa casuística de CMTN foi de 21,6% (86/399) de variantes P/PP em ambos os genes, sendo a maioria no gene *BRCA1* (81,4% - 70/86) e menor frequência em *BRCA2* (18,6% - 16/86). Quando considerou-se mulheres jovens, esse número aumentou para 25,4%.

O evento de hipermetilação da região promotora em *BRCA1* ocorreu em 43,5% dos casos analisados (77/177) e em 11,9% (21/177) de *RAD51C*. O evento de hipermetilação em *BRCA1* também corrobora com dados anteriores do grupo uma vez que apresentou-se elevado (55,3%) em mulheres jovens, quando comparado com as mulheres com idade ≥ 41 anos (39,2%).

A análise de ancestralidade foi realizada para 216 casos, onde a maioria (68%) foi classificada como ancestralidade predominantemente europeia. Não foi identificada associação significativa entre os mecanismos genéticos e epigenéticos relacionados a DRH com as diferentes ancestralidades investigadas.

Os sítios anatômicos mais acometidos entre *BRCA1*/PP e sem variantes P/PP foram pulmão e SNC, enquanto que para *BRCA2*-P/PP os locais mais acometidos foram SNC e ossos. Análise de regressão multivariada mostrou que variante P em *BRCA2* aumenta quase em 4 vezes o risco de desenvolver metástase em SNC em mulheres com CMTN.

7 REFERÊNCIAS

1. Oak N, Cherniack AD, Mashl RJ, Network TA, Hirsch FR, Ding L. Ancestry-specific predisposing germline variants in cancer. *Genome Med.* 2020;12(51):1–15.
2. Carrot-Zhang J, Chambwe N, Damrauer JS, Knijnenburg TA, Robertson AG, Yau C, et al. Comprehensive Analysis of Genetic Ancestry and Its Molecular Correlates in Cancer. *Cancer Cell.* 2020;37(5):639–654.e6.
3. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil | INCA - Instituto Nacional de Câncer [Internet]. [cited 2020 May 22]. Available from: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>
4. (CDC) C for disease control and prevention. Breast Cancer: What Are the Risk Factors for Breast Cancer? [Internet]. 2018 [cited 2020 Jun 17]. Available from: https://www.cdc.gov/cancer/breast/basic_info/risk_factors.htm
5. (CDC) C for disease control and prevention. Hereditary Breast Cancer and BRCA Genes [Internet]. 2019 [cited 2021 Feb 3]. Available from: https://www.cdc.gov/cancer/breast/young_women/bringyourbrave/hereditary_breast_cancer/
6. Perou CM, Sørile T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Renshaw CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000 Aug 17;406(6797):747–52.
7. Serra KP, Ramalho S, Torresan R, Vassallo J, Sarian LOZ, Silva GR de P, et al. Nova classificação dos carcinomas da mama: Procurando o luminal a. *Rev Bras Ginecol e Obstet.* 2014;36(12):575–80.
8. Gutierrez C, Schiff R. HER 2: Biology, Detection, and Clinical Implications. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(1):55.
9. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Mar 10 [cited 2019 Oct 10];26(8):1275–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18250347>
10. Rummel S, Varner E, Shriver CD, Ellsworth RE. Evaluation of BRCA1 mutations in an unselected patient population with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2013 Jan [cited 2019 Oct 10];137(1):119–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23192404>
11. Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P, et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer* [Internet]. 2007 Aug 15 [cited 2019 Oct 10];110(4):876–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17620276>
12. Wu X, Baig A, Kasymjanova G, Kafi K, Holcroft C, Mekouar H, et al. Pattern of Local Recurrence and Distant Metastasis in Breast Cancer By Molecular Subtype. *Cureus* [Internet]. 2016 Dec 9 [cited 2019 Oct 10];8(12):e924. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28090417>
13. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: Primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 15;13(8):2329–34.
14. Robson M, Im SA, Senkus E, Xu B, Domchek SM, Masuda N, et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. *N Engl J Med.* 2017 Aug 10;377(6):523–33.
15. Brianese RC, Nakamura KD de M, de Almeida FG dos SR, Ramalho RF, Barros BD de F, e Ferreira EN, et al. BRCA1 deficiency is a recurrent event in early-onset triple-negative breast cancer: A comprehensive analysis of germline mutations and somatic promoter methylation. *Breast Cancer Res Treat.* 2018;167(3):803–14.

16. Buys SS, Sandbach JF, Gammon A, Patel G, Kidd J, Brown KL, et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer* [Internet]. 2017 [cited 2019 Oct 10];123(10):1721–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28085182>
17. Carraro DM, Koike Folgueira MAA, Garcia Lisboa BC, Ribeiro Olivieri EH, Vitorino Krepschi AC, de Carvalho AF, 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* [Internet]. 2013 [cited 2019 Oct 10];8(3):e57581. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23469205>
18. J.D. F, O.I. O. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2007;7(12):937–48. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L350165853%0Ahttp://dx.doi.org/10.1038/nrc2054>
19. Couch FJ, Nathanson KL, Offit K. Two decades after BRCA: Setting paradigms in personalized cancer care and prevention. Vol. 343, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2014. p. 1466–70.
20. Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, Chen H, Litton JK, Potter J, et al. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2019 Oct 10];17(5):1082–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21233401>
21. Greenup R, Buchanan A, Lorzio W, Rhoads K, Chan S, Leedom T, et al. Prevalence of BRCA mutations among women with triple-negative breast cancer (TNBC) in a genetic counseling cohort. *Ann Surg Oncol*. 2013 Oct;20(10):3254–8.
22. Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2012 Jan [cited 2019 Oct 10];21(1):134–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22144499>
23. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-guiu X, Lerma E, et al. Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(7):564–9.
24. Lips EH, Mulder L, Oonk A, van der Kolk LE, Hogervorst FBL, Imholz a LT, et al. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *Br J Cancer*. 2013;108(10):2172–7.
25. Xu Y, Diao L, Chen Y, Liu Y, Wang C, Ouyang T, et al. Promoter methylation of BRCA1 in triple-negative breast cancer predicts sensitivity to adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol*. 2013;24(6):1498–505.
26. Matros E, Wang ZC, Lodeiro G, Miron A, Iglehart JD, Richardson AL. BRCA1 promoter methylation in sporadic breast tumors: Relationship to gene expression profiles. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;91:179–86.
27. Polak P, Kim J, Braunstein LZ, Karlic R, Haradhavala NJ, Tiao G, et al. A mutational signature reveals alterations underlying deficient homologous recombination repair in breast cancer. *Nat Genet*. 2017 Aug;49(10):1476–86.
28. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2750–67.
29. Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, Valero V, Amos CI, Gonzalez-Angulo AM, et al. Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Sep 10 [cited 2019 Oct 10];26(26):4282–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18779615>
30. Ferreira EN, Brianese RC, de Almeida RVB, Drummond RD, de Souza JE, da Silva IT, et al. Influence of BRCA1 Germline Mutations in the Somatic Mutational Burden of Triple-Negative Breast Cancer. *Transl Oncol* [Internet]. 2019 Aug 13 [cited 2019 Oct 10];12(11):1453–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31419696>
31. Walsh CS. Two decades beyond BRCA1/2: Homologous recombination, hereditary

- cancer risk and a target for ovarian cancer therapy. *Gynecol Oncol*. 2015 May;137(2):343–50.
32. Saito R de F, Lana MVG, Medrano RF V., Chammas R. Fundamentos de oncologia molecular. Atheneu. 2015;
 33. Felicio PS. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E EPIGENÉTICA DO GENE BRCA1 EM MULHERES BRASILEIRAS EM RISCO PARA CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO. TESE. 2015;127.
 34. Tutt A, Robson M, Garber JE, Domchek SM, Audeh W, Rey J, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. *www.thelancet.com* [Internet]. 2010;376:235–79. Available from: www.thelancet.com
 35. O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, Yoffe M, Patt D, Rocha C, et al. Iniparib plus Chemotherapy in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2011 Jan 20 [cited 2020 Dec 27];364(3):205–14. Available from: <http://ctep.cancer.gov>
 36. O'Shaughnessy J, Hellerstedt B, Schwartzberg L, Yardley DA, Danso MA, Robert N, et al. Phase III study of iniparib plus gemcitabine and carboplatin versus gemcitabine and carboplatin in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Dec 1 [cited 2020 Dec 27];32(34):3840–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25349301/>
 37. FDA approves olaparib for germline BRCA-mutated metastatic breast cancer | FDA [Internet]. [cited 2021 Nov 15]. Available from: <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-olaparib-germline-brca-mutated-metastatic-breast-cancer>
 38. Sonnenblick A, De Azambuja E, Azim HA, Piccart M. An update on PARP inhibitors - Moving to the adjuvant setting [Internet]. Vol. 12, *Nature Reviews Clinical Oncology*. Nature Publishing Group; 2015 [cited 2021 Feb 3]. p. 27–41. Available from: <https://www.nature.com/articles/nrclinonc.2014.163>
 39. Loibl S, Weber KE, Timms KM, Elkin EP, Hahnen E, Fasching PA, et al. Survival analysis of carboplatin added to an anthracycline/taxane-based neoadjuvant chemotherapy and HRD score as predictor of response—final results from GeparSixto. *Ann Oncol*. 2018 Dec;29(12):2341–7.
 40. Pellegrino B, Mateo J, Serra V, Balmaña J. Controversies in oncology: are genomic tests quantifying homologous recombination repair deficiency (HRD) useful for treatment decision making? *ESMO Open*. 2019 May;4(2):e000480.
 41. Chopra N, Tovey H, Pearson A, Cutts R, Toms C, Proszek P, et al. Homologous recombination DNA repair deficiency and PARP inhibition activity in primary triple negative breast cancer. *Nat Commun* [Internet]. 2020 May 29 [cited 2020 Jun 8];11(1):2662. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32471999>
 42. Gupta GP, Massagué J. Cancer Metastasis: Building a Framework.
 43. Nguyen DX, Massagué J. Genetic determinants of cancer metastasis. Vol. 8, *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group; 2007. p. 341–52.
 44. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2007 Aug 1 [cited 2019 Oct 10];13(15 Pt 1):4429–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671126>
 45. Li X, Yang J, Peng L, Sahin AA, Huo L, Ward KC, et al. Triple-negative breast cancer has worse overall survival and cause-specific survival than non-triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2017 [cited 2019 Oct 10];161(2):279–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27888421>
 46. Cimino-Mathews A, Subhawong AP, Illei PB, Sharma R, Halushka MK, Vang R, et al. GATA3 expression in breast carcinoma: utility in triple-negative, sarcomatoid, and metastatic carcinomas. *Hum Pathol* [Internet]. 2013 Jul [cited 2019 Oct 10];44(7):1341–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23375642>
 47. Song Y, Barry WT, Seah DS, Tung NM, Garber JE, Lin NU. Patterns of recurrence and metastasis in BRCA1/BRCA2-associated breast cancers. *Cancer* [Internet]. 2019 Oct 3

- [cited 2019 Oct 10]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31581314>
48. Lin NU, Claus E, Sohl J, Razzak AR, Arnaout A, Winer EP. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: High incidence of central nervous system metastases. *Cancer*. 2008 Nov 15;113(10):2638–45.
 49. Martin AM, Cagney DN, Catalano PJ, Warren LE, Bellon JR, Punglia RS, et al. Brain metastases in newly diagnosed breast cancer: A population-based study. *JAMA Oncol*. 2017 Aug 1;3(8):1069–77.
 50. Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, Theriault RL, Edge SB, Wong YN, et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. *Cancer*. 2012;118(22):617–32.
 51. Diossy M, Reiniger L, Sztupinszki Z, Krzystanek M, Timms KM, Neff C, et al. Breast cancer brain metastases show increased levels of genomic aberration-based homologous recombination deficiency scores relative to their corresponding primary tumors. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Oct 10];29(9):1948–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29917049>
 52. Michailidou K, Lindström S, Dennis J, Beesley J, Hui S, Kar S, et al. Association analysis identifies 65 new breast cancer risk loci. *Nature*. 2017 Nov 2;551(7678):92–4.
 53. Wang S, Pitt JJ, Zheng Y, Yoshimatsu TF, Gao G, Sanni A, et al. Germline variants and somatic mutation signatures of breast cancer across populations of African and European ancestry in the US and Nigeria. *Int J cancer* [Internet]. 2019 Jun 7 [cited 2019 Oct 10]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31173346>
 54. Carvalho FM, Bacchi LM, Pincerato KM, Van De Rijn M, Bacchi CE. Geographic differences in the distribution of molecular subtypes of breast cancer in Brazil [Internet]. 2014 [cited 2020 Jun 30]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1472-6874/14/102>
 55. (IBGE) IB de G e E. Características Étnico-raciais da População: Classificações e identidades. Rio de Janeiro; 2013.
 56. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May 8;17(5):405–24.
 57. ClinVar [Internet]. [cited 2020 Jun 22]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>
 58. (LOVD) LOVD. All genomic variants - Global Variome shared [Internet]. [cited 2020 Jun 22]. Available from: <https://databases.lovd.nl/shared/variants>
 59. Santos NPC, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-dos-Santos ÂKC, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat*. 2010 Feb;31(2):184–90.
 60. de Ramos BRA, D'Elia MPB, Amador MAT, Santos NPC, Santos SEB, da Cruz Castelli E, et al. Neither self-reported ethnicity nor declared family origin are reliable indicators of genomic ancestry. *Genetica*. 2016 Jun 1;144(3):259–65.
 61. Lee LJ, Alexander B, Schnitt SJ, Comander A, Gallagher B, Garber JE, et al. Clinical outcome of triple negative breast cancer in BRCA1 mutation carriers and noncarriers. *Cancer* [Internet]. 2011 Jul 15 [cited 2020 Oct 19];117(14):3093–100. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21264845/>
 62. Ishikawa Y, Horiguchi J, Toya H, Nakajima H, Hayashi M, Tagaya N, et al. Triple-negative breast cancer: Histological subtypes and immunohistochemical and clinicopathological features. *Cancer Sci*. 2011 Mar;102(3):656–62.
 63. Brianese RC, Nakamura KD de M, de Almeida FG dos SR, Ramalho RF, Barros BD de F, e Ferreira EN, et al. BRCA1 deficiency is a recurrent event in early-onset triple-negative breast cancer: A comprehensive analysis of germline mutations and somatic promoter methylation. *Breast Cancer Res Treat*. 2018;167(3):803–14.
 64. Singh J, Asad S, Zhang Y, Nock W, Adams E, Damicis A, et al. Aggressive Subsets of

- Metastatic Triple Negative Breast Cancer. *Clin Breast Cancer*. 2020 Feb 1;20(1):e20–6.
65. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2010 Jul 10;28(20):3271–7.
66. Albiges L, André F, Balleyguier C, Gomez-Abuin G, Chompret A, Delaloge S. Spectrum of breast cancer metastasis in BRCA1 mutation carriers: Highly increased incidence of brain metastases [2] [Internet]. Vol. 16, *Annals of Oncology*. *Ann Oncol*; 2005 [cited 2020 Oct 19]. p. 1846–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15972278/>
67. Rummel S, Varner E, Shriver CD, Ellsworth RE. Evaluation of BRCA1 mutations in an unselected patient population with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 Jan; 137(1):119-25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23192404/>
68. Bayraktar S, Gutierrez-Barrera AM, Liu D, Tasbas T, Akar U et al. Outcome of triple-negative breast cancer in patients with or without deleterious BRCA mutations. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Nov; 130(1): 145–153.. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4334122/>

8. ANEXOS

Anexo 1. Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).



A.C. Camargo Cancer Center
Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em reunião de 16/07/2019, aprovaram a realização do projeto nº. 2758/19 intitulado: "Avaliação do silenciamento de BRCA1 por mecanismos epigenéticos e genéticos em câncer de mama triplo-negativo metastático e sua associação com ancestralidade e prognóstico."

Pesquisador Responsável: Dirce Maria Carraro
Aluno: Julia Salles Oliveira (Mestrado)

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

São Paulo, 12 de agosto de 2019.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Caires Serrano
1ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2. Lista de genes contemplados pelos painéis de sequenciamento de nova geração utilizados neste estudo.

Hereditary Cancer Solution (Sophia Genetics) - 26 genes		Oncomine BRCA Expanded (Oncomine Tumor Specific Assay, Thermo Fischer)
<i>APC</i>	<i>MSH2</i>	<i>BRCA1</i>
<i>ATM</i>	<i>MSH6</i>	<i>BRCA2</i>
<i>BARD1</i>	<i>MUTHY</i>	
<i>BRCA1</i>	<i>NBN</i>	
<i>BRCA2</i>	<i>PALB2</i>	
<i>BRIP1</i>	<i>PIK3CA</i>	
<i>CDH1</i>	<i>PMS2</i>	
<i>CHEK2</i>	<i>PTEN</i>	
<i>EPCAM</i>	<i>RAD50</i>	
<i>FAM175A</i>	<i>RAD51C</i>	
<i>MLH1</i>	<i>RAD51D</i>	
<i>MRE11A</i>	<i>STK11</i>	
<i>XRCC2</i>	<i>TP53</i>	

Anexo 3. Tabela geral de dados clínicos e anatomopatológicos

Nº do caso	Idade ao diagnóstico TN	Status BRCA1/2	T	N	Estadiamento	Grau tumoral	Histologia	Cor/raça autodeclarada	Locais de metástase	Status de vida
1	61	Sem variantes P/PP	T3	N1	III	3	CDI	branca	Pulmão/Osso/Fígado/SNC/LFND distante	óbito
2	81	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	2	CLI	branca	Pulmão/Osso/Fígado/Pele	óbito
3	48	Sem variantes P/PP	T3	N0	IV	3	CDI	branca	Pulmão	viva
4	28	Sem variantes P/PP	T2	N3	III	3	CDI	N/D	SNC	óbito
5	49	Sem variantes P/PP	T4	N1	III	3	CDI	N/D	Fígado	óbito
6	44	Sem variantes P/PP	T3	N0	II	2	Carcinoma metaplásico com componente cartilaginoso	preta	Pulmão	óbito
7	54	Sem variantes P/PP	N/D	N/D	II	3	CDI	branca	Osso/LFND distante	viva
8	41	Sem variantes P/PP	T2	N2	III	3	CDI	N/D	SNC	óbito
9	39	Sem variantes P/PP	T2	N1	N/D	3	CDI	N/D	SNC	óbito
10	33	Sem variantes P/PP	T4	N2	III	3	CDI	parda	Pulmão	óbito
11	17	Sem variantes P/PP	T4	N2	III	3	CDI	branca	LFND distante, fígado, osso, pulmão, SNC	óbito
12	50	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	2	CDI	branca	SNC	óbito
13	34	Sem variantes P/PP	T3	N1	IV	2	CDI	parda	SNC / LFND distantes	óbito
14	37	Sem variantes P/PP	T4	N3	IV	N/D	Inflamatório (CD microinvasivo com invasão linfática extensa)	N/D	Osso	óbito
15	36	BRCA1-P/PP	T3	N3	III	N/D	N/D	branca	SNC/Fígado	óbito
16	28	Sem variantes P/PP	T3	N1	N/D	3	CDI	preta	Pulmão/Osso/Fígado/SNC	óbito
17	37	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI Metaplásico condroide	branca	Osso/pulmão	viva
18	30	Sem variantes P/PP	T3	N1	III	3	CDI	branca	SNC/osso	óbito
19	38	Sem variantes P/PP	T3	N3	III	3	CDI	preta	Pulmão/Osso/Fígado	viva
20	44	BRCA2-P/PP	T3	N1	IV	2	CDI	branca	Osso/Pulmão/SNC	óbito
21	72	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	2	CDI	branca	SNC	óbito
22	27	BRCA1-P/PP	T4	N3	N/D	3	CDI	branca	SNC/Pulmão	óbito
23	63	Sem variantes P/PP	T3	N2	III	3	CDI	branca	SNC	viva

24	29	Sem variantes P/PP	N/D	N/D	III	2	CLI	amarela	Ovário/Ossos	óbito
25	52	Sem variantes P/PP	T4	N1	N/D	2	CDI	branca	Osso/Fígado	óbito
26	63	Sem variantes P/PP	T3	NX	IV	3	CDI	preta	Pulmão/SNC	viva
27	61	Sem variantes P/PP	TX	NX	IV	3	CDI	branca	SNC/pulmão/fígado	óbito
28	31	Sem variantes P/PP	T3	N1	III	2	CDI	parda	Pulmão/Fígado/SNC	óbito
29	50	Sem variantes P/PP	T4	N2	III	2	CDI	branca	Fígado	viva
30	47	BRCA2-P/PP	T4	N3	III	2	CDI	branca	SNC	óbito
31	34	Sem variantes P/PP	T2	N0	IV	3	CDI	branca	Pulmão/LFND Distante/SNC	óbito
32	42	Sem variantes P/PP	T3	N2	III	2	CDI	branca	Pulmão/LFND distante/Musculatura	óbito
33	46	Sem variantes P/PP	T3	N3	III	3	CDI	branca	SNC	óbito
34	32	BRCA1-P/PP	T4	N2	IV	2	CDI	N/D	Pele/LFND Distante	viva
35	31	Sem variantes P/PP	T4	N3	IV	2	CDI	branca	Osso/Fígado/LFND Distante/SNC	óbito
36	45	Sem variantes P/PP	N/D	N/D	II	2	CDI	branca	Pulmão/SNC	óbito
37	64	Sem variantes P/PP	T4	N1	III	3	CDI	N/D	SNC	óbito
38	43	BRCA1-P/PP	T3	N1	II	3	CDI	branca	Meningeoma	viva
39	54	Sem variantes P/PP	T2	N1	III	3	CDI	parda	Pulmão/Osso/Fígado/SNC	óbito
40	36	BRCA2-P/PP	T2	N1	II	3	CDI	preta	SNC/Pulmão/Osso/	óbito
41	46	BRCA1-P/PP	T3	N1	III	2	CDI	branca	Pulmão/Osso/Fígado/Baço/Rim/LFND distante/SNC	viva
42	55	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	branca	Pulmão / osso / fígado / SNC	óbito
43	39	BRCA1-P/PP	T2	N0	I	3	CDI	parda	Pulmão	viva
44	41	Sem variantes P/PP	T2	N1	IV	N/D	CDI	branca	Osso/Fígado/LFND distante/Peritônio/SNC	viva
45	37	BRCA1-P/PP	T2	N1	II	3	CDI	branca	SNC / Fígado / osso / mediastino	óbito
46	37	Sem variantes P/PP	T2	NX	II	3	CDI	branca	Osso	óbito
47	68	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	branca	Pulmão/Osso/SNC	óbito
48	41	Sem variantes P/PP	T4	N3	III	2	CDI	N/D	SNC	óbito
49	30	Sem variantes P/PP	T4	N0	III	2	CDI	N/D	Pulmão/Osso/Mediastino/LFND distante/SNC	óbito
50	51	Sem variantes P/PP	T4	NX	IV	2	CDI	branca	osso / pulmão / SNC	óbito
51	53	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	N/D	Pulmão/Osso/Fígado	óbito

52	44	Sem variantes P/PP	T4	N3	III	3	CDI	N/D	Osso/Fígado/LFND distante/Musculatura	óbito
53	51	Sem variantes P/PP	T3	N1	III	3	Metaplásico	N/D	Osso/Fígado/SNC	viva
54	59	Sem variantes P/PP	T4	N2	III	3	CDI	branca	SNC/Rim	óbito
55	54	Sem variantes P/PP	T3	N0	N/D	3	Metaplásico	N/D	Pulmão	óbito
56	39	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	Carcinoma papilar sólido invasivo	N/D	Pulmão/Pele	óbito
57	63	Sem variantes P/PP	T4	N1	III	2	CDI	branca	SNC/Pulmão	óbito
58	29	Sem variantes P/PP	T4	N2	III	3	CDI	branca	SNC	óbito
59	42	BRCA1-P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca	Pulmão/SNC	óbito
60	70	Sem variantes P/PP	T2	N2	IV	3	CDI	parda	Pulmão	óbito
61	35	Sem variantes P/PP	T3	N3	III	3	CLI	N/D	SNC	óbito
62	51	Sem variantes P/PP	T4	N2	IV	3	CDI	preta	Pulmão/SNC	óbito
63	41	BRCA1-P/PP	T4	N1	III	3	CDI	N/D	Pulmão/Osso/Fígado	óbito
64	50	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	branca	Pulmão/LFND /SNC	viva
65	40	Sem variantes P/PP	T3	N1	III	2	CDI	parda	Osso/Fígado	óbito
66	47	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	2	CDI	branca	Fígado/SNC	óbito
67	34	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI sarcomatóide	branca	Pulmão/Pele/Musculatura/Rim	óbito
68	49	Sem variantes P/PP	T4	N0	IV	3	CDI	branca	Pulmão	óbito
69	36	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca	Pulmão	viva
70	31	Sem variantes P/PP	T4	N2	III	3	CDI	parda	SNC/Pulmão/Osso/Musculatura	óbito
71	52	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	N/D	Fígado/LFND distante	viva
72	53	Sem variantes P/PP	T4	N2	III	3	CDI	branca	Pulmão	viva
73	50	Sem variantes P/PP	T4	N4	IV	2	CDI	N/D	Pulmão/Osso/Pele/LFND distante	óbito
74	52	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	2	CDI	branca	Pulmão/osso	óbito
75	28	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	N/D	SNC	óbito
76	35	Sem variantes P/PP	T4	N3	IV	3	CDI	branca	LFND distante	viva
77	39	Sem variantes P/PP	T3	N2	IV	3	CDI	N/D	Pulmão/Osso/Fígado/SNC/Tireóide	óbito
78	38	Sem variantes P/PP	T2	N2	III	3	CDI	branca	SNC/Pulmão	óbito
79	32	BRCA2-P/PP	T2	N0	II	3	CDI	N/D	Pulmão/Osso/Fígado/Pele/Ovário/SNC	óbito
80	54	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	Metaplásico	branca	SNC/Pulmão/Osso/Pele	óbito

81	62	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N2	IV	2	CDI	branca	LFND distante / esterno / SNC / Ossos / pleura	óbito
82	36	<i>Sem variantes P/PP</i>	T4	N3	III	2	CDI	parda	Pulmão/Osso/Pericárdio/Musculatura	óbito
83	65	<i>Sem variantes P/PP</i>	T4	N1	III	2	CDI	branca	Mediastino/Pele/LFND distante/SNC	óbito
84	42	<i>BRCA1-P/PP</i>	T4	N2	III	3	CDI	parda	Pulmão/SNC/LFND distante/Mediastino	viva
85	59	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca	Musculatura/SNC	óbito
86	34	<i>Sem variantes P/PP</i>	T4	N1	III	3	CDI	branca	SNC/Pericárdio/Pele	óbito
87	38	<i>Sem variantes P/PP</i>	T4	N2	III	3	CDI	N/D	Pulmão/Osso/Fígado/SNC	óbito
88	43	<i>Sem variantes P/PP</i>	T4	N2	III	2	CDI	parda	Fígado	óbito
89	48	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N3	III	2	CDI	branca	Pulmão/Osso/Pericárdio/SNC	óbito
90	40	<i>BRCA1-P/PP</i>	T4	N2	III	3	CDI	N/D	SNC	óbito
91	18	<i>Sem variantes P/PP</i>	TX	NX	III	3	CDI	N/D	Pulmão/Osso/Fígado/SNC	óbito
92	52	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI	branca	Pulmão/Fígado/SNC	viva
93	50	<i>Sem variantes P/PP</i>	T4	N3	IV	3	CDI	branca	Pericárdio/Mediastino/LFND distante	viva
94	74	<i>Sem variantes P/PP</i>	TX	NX	IV	2	CDI	branca	Ossos	viva
95	40	<i>BRCA1-P/PP</i>	TX	N1	III	2	CDI	branca	Ossos/Fígado	óbito
96	44	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca	Pulmão/Osso/Fígado/Pele/SNC	óbito
97	82	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	II	2	CDI	branca	SNC/Pulmão	óbito
98	58	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca	SNC/Pulmão/Osso	óbito
99	47	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	parda	Pulmão	viva
100	44	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI	branca	SNC/Pulmão/Osso	óbito
101	44	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca	Pulmão/LFND distante	óbito
102	67	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI	N/D	Pulmão	óbito
103	46	<i>BRCA2-P/PP</i>	TX	NX	IV	3	CDI medular	amarela	fígado / ossos / SNC	óbito
104	69	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	NX	IV	3	CDI	branca	Pulmão/Osso/Fígado/Mediastino /Pele	viva
105	51	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	2	CDI	branca	Pulmão/Osso/Fígado/LFND distante	óbito
106	36	<i>Sem variantes P/PP</i>	T3	N2	III	3	CDI	branca	Ossos/Fígado	viva
107	51	<i>BRCA1-P/PP</i>	T4	N0	III	3	CDI	branca	Pulmão/Osso/Mediastino/LFND distante	viva
108	66	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N1	II	3	CDI	branca	Pulmão/Fígado	óbito

109	43	Sem variantes P/PP	TX	N3	III	2	CDI	N/D	Pele/LFND Distante/Musculatura	óbito
110	31	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	N/D	Pulmão	viva
111	49	Sem variantes P/PP	T3	N1	III	2	CDI	branca	Pulmão/Fígado/LFND distante	óbito
112	51	Sem variantes P/PP	T3	N2	III	3	CDI	branca	Fígado/LFND distante	óbito
113	70	Sem variantes P/PP	N/ D	N/D	N/D	N/D	CLI	N/D	Osso	óbito
114	47	BRCA2-P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca	SNC/pulmão/osso/Fígado/LFND distante	óbito
115	44	Sem variantes P/PP	T2	N2	III	3	CDI	N/D	Pulmão/Osso/LFND distante/SNC	óbito
116	59	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca	Pulmão/SNC/LFND distante	óbito
117	44	BRCA1-P/PP	T2	N1	II	2	CDI	N/D	Pulmão/SNC	óbito
118	34	BRCA2-P/PP	T2	N2	III	3	CDI	branca	SNC/Pulmão/Fígado	óbito
119	74	BRCA2-P/PP	T4	N0	III	2	CLI pleomórfico	branca	SNC/osso	óbito
120	31	Sem variantes P/PP	T3	N2	III	3	CDI	N/D	SNC/Fígado	óbito
121	37	N/A	N/ D	N/D	II	1	Carcinoma papilífero de baixo grau	branca	SNC/osso	óbito
122	72	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	3	CDI	N/D	Pulmão/Osso/Fígado/SNC	óbito
123	57	Sem variantes P/PP	T4	N1	III	3	CDI	parda	Pulmão/Osso/SNC	viva
124	39	Sem variantes P/PP	T4	N1	III	3	CDI	parda	SNC/pulmão/osso/Fígado/LFND distante	óbito
125	38	Sem variantes P/PP	T4	N1	III	3	CDI	parda	Pele/SNC	óbito
126	31	Sem variantes P/PP	T4	N1	IV	2	CDI	N/D	Pumão / fígado / mediastino / ossos / SNC	óbito
127	54	Sem variantes P/PP	T4	N2	III	3	CDI	amarela	Pulmão	óbito
128	43	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	branca	Fígado	óbito
129	39	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	N/D	Medular	branca	Pulmão	viva
130	50	Sem variantes P/PP	T4	N1	III	3	CDI	N/D	Pulmão	óbito
131	35	Sem variantes P/PP	T3	N2	III	2	CDI	branca	Osso	viva
132	41	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	2	CDI	branca	SNC / pulmão	viva
133	31	BRCA1-P/PP	T2	N1	II	3	CDI	N/D		viva
134	37	BRCA1-P/PP	T2	N1	II	N/D	CDI	N/D		viva
135	41	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	3	CDI	N/D		viva
136	48	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva

137	45	Sem variantes P/PP	T3	N0	II	3	CDI	N/D		viva
138	36	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	N/D		viva
139	64	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	N/D	CDI	N/D	-	viva
140	69	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	3	CDI comedocarcinoma	branca		viva
141	63	BRCA1-P/PP	T1	N0	I	2	CDI	parda		viva
142	45	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	2	CDI	branca	-	viva
143	34	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	branca		viva
144	44	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	2	CDI	N/D		viva
145	34	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	N/D		viva
146	38	BRCA1-P/PP	T2	N0	II	3	CDI	N/D		viva
147	51	Sem variantes P/PP	T4	N1	III	2	CDI	parda		viva
148	64	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	N/D		viva
149	37	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	3	CDI	branca		viva
150	43	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	N/D		viva
151	44	Sem variantes P/PP	T4	N1	III	3	CDI	branca		viva
152	41	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
153	38	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	N/D		viva
154	47	Sem variantes P/PP	T1	N1	II	2	CDI apócrino	branca		viva
155	26	Sem variantes P/PP	T3	N3	III	3	CDI	N/D		viva
156	47	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
157	34	BRCA1-P/PP	T2	N0	II	2	CDI	branca		viva
158	54	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	2	CDI	branca		viva
159	37	Sem variantes P/PP	T2	N0	I	2	CDI	branca	-	viva
160	40	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	2	CDI	branca		viva
161	51	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	branca		viva
162	53	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
163	37	Sem variantes P/PP	T3	N0	II	3	CDI	preta		viva
164	59	Sem variantes P/PP	N/D	N/D	II	3	CDI	branca		viva
165	44	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
166	51	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	parda	-	viva

167	58	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	3	Metaplásico	parda	-	viva
168	38	BRCA1-P/PP	T4	N1	III	2	CDI	branca	-	óbito
169	52	Sem variantes P/PP	T2	N2	N/D	3	CDI	branca		viva
170	41	BRCA1-P/PP	T2	N1	II	3	CDI com características medulares	branca	-	viva
171	27	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	2	CDI	branca	-	viva
172	38	Sem variantes P/PP	T1	N0	II	3	CDI	preta	-	viva
173	42	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	N/D	-	viva
174	44	BRCA2-P/PP	T3	N1	III	2	CLI clássico e pleomórfico	N/D		viva
175	34	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	branca		viva
176	38	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	branca		viva
177	33	Sem variantes P/PP	T2	N2	III	3	CDI	branca		viva
178	33	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	branca		viva
179	49	BRCA1-P/PP	T1	N0	II	3	CDI	branca		viva
180	50	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	branca	-	viva
181	32	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	2	CDI	branca		viva
182	34	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	2	CLI	branca		viva
183	46	Sem variantes P/PP	T3	N0	II	3	CDI	branca		viva
184	62	BRCA1-P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
185	42	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	branca		viva
186	41	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
187	41	Sem variantes P/PP	T3	N1	III	3	CDI	branca		viva
188	42	Sem variantes P/PP	T1	NX	N/D	3	CDI	parda	-	viva
189	42	Sem variantes P/PP	T3	N1	II	3	CDI	branca	-	viva
190	80	Sem variantes P/PP	T2	N2	III	3	CDI	parda	-	viva
191	67	Sem variantes P/PP	T2	NX	II	2	CDI	parda	-	viva
192	59	Sem variantes P/PP	N/D	N/D	N/D	2	CDI	N/D	-	viva
193	30	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	2	CDI	branca	-	viva
194	40	BRCA1-P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
195	62	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	N/D	CDI	branca		viva

196	50	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	2	CDI	branca		viva
197	64	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
198	37	Sem variantes P/PP	T4	N1	III	2	CDI	branca		viva
199	49	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
200	57	Sem variantes P/PP	T2	N2	III	2	CDI	amarela	-	viva
201	51	Sem variantes P/PP	T1	N1	II	2	CDI	parda	-	viva
202	35	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca	-	viva
203	73	Sem variantes P/PP	T3	N1	III	3	CDI	preta		viva
204	56	Sem variantes P/PP	T1	N3	III	2	CLI com característica apócrinas	branca	-	viva
205	30	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca	-	viva
206	34	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	Carcinoma Adenoide cístico	branca	-	viva
207	59	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	3	CDI	branca	-	viva
208	45	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI medular	branca	-	viva
209	50	Sem variantes P/PP	T3	N2	III	3	CDI	preta	-	viva
210	44	Sem variantes P/PP	T3	NX	II	1	CDI	parda	-	viva
211	68	Sem variantes P/PP	N/D	N/D	N/D	3	CDI	branca	-	viva
212	34	Sem variantes P/PP	T2	N1	N/D	3	CDI	branca	-	viva
213	64	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca	-	viva
214	36	Sem variantes P/PP	T3	N2	III	2	CDI	branca	-	viva
215	41	Sem variantes P/PP	T2	N0	N/D	3	CDI	branca	-	viva
216	51	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	3	CDI	branca	-	viva
217	30	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	3	CDI	branca	-	viva
218	40	BRCA1-P/PP	T1	N0	I	N/D	N/D	branca	-	viva
219	44	BRCA1-P/PP	T2	N1	II	3	CDI	branca	-	viva
220	32	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca	-	viva
221	39	BRCA1-P/PP	N/D	N/D	II	3	CDI	branca	-	viva
222	49	BRCA1-P/PP	TX	NX	III	N/D	medular	branca	-	viva
223	28	BRCA1-P/PP	T2	N1	II	3	CDI	branca	-	viva
224	50	Sem variantes P/PP	T2	N0	N/D	3	CDI	branca	-	viva

225	63	<i>Sem variantes P/PP</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	viva
226	45	<i>BRCA2-P/PP</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	viva
227	37	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N1	II	3	CDI	branca	-	viva
228	63	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca	-	viva
229	39	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI Metaplásico	branca	-	viva
230	56	<i>Sem variantes P/PP</i>	T3	N0	II	3	CDI Metaplásico	branca	-	viva
231	30	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	I	3	CDI medular	branca	-	viva
232	53	<i>Sem variantes P/PP</i>	T4	N2	III	3	CDI	branca	-	viva
233	51	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	I	3	CDI	branca	-	viva
234	60	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	N/D	3	CDI	branca	-	viva
235	37	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca	-	viva
236	32	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	III	3	CDI	branca	-	viva
237	39	<i>Sem variantes P/PP</i>	T3	N1	III	2	CLI	branca	-	viva
238	37	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	I	3	CDI Metaplásico	branca	-	viva
239	48	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca	-	viva
240	43	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N1	II	3	CDI Metaplásico	branca	-	viva
241	42	<i>Sem variantes P/PP</i>	TX	NX	N/D	2	CDI	branca	-	viva
242	34	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	N/D	3	CDI	branca	-	viva
243	34	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	II	N/D	CDI	branca		viva
244	74	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI	branca	-	viva
245	50	<i>BRCA2-P/PP</i>	T2	NX	II	2	CPI	branca	-	viva
246	34	<i>Sem variantes P/PP</i>	T3	N1	N/D	N/D	CDI	branca	-	viva
247	47	<i>Sem variantes P/PP</i>	T4	N0	III	3	CDI	branca	-	viva
248	55	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	N/D	3	CDI	N/D	-	viva
249	30	<i>BRCA1-P/PP</i>	T3	N2	III	3	CDI	branca	-	viva
250	30	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N1	III	2	CDI	branca	-	viva
251	30	<i>Sem variantes P/PP</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	CDI	N/D	-	viva
252	32	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	N/D	-	viva
253	33	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	parda		viva

254	40	<i>BRCA1-P/PP</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	viva
255	52	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	N/D	-	viva
256	52	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	Metaplásico	branca	-	viva
257	59	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	II	2	Medular	N/D	-	viva
258	40	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca	-	viva
259	54	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca	-	viva
260	55	<i>BRCA1-P/PP</i>	T1	N1	II	3	CDI	branca	-	viva
261	52	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI	branca	-	viva
262	50	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI	branca	-	viva
263	48	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
264	53	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	2	CDI	branca		viva
265	33	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI	branca		viva
266	33	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	Metaplásico	branca		viva
267	43	<i>BRCA1-P/PP</i>	T1	N0	I	3	CDI	N/D	-	viva
268	51	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
269	32	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	preta	-	viva
270	39	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
271	32	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
272	37	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI	parda	-	viva
273	42	<i>BRCA1-P/PP</i>	N/D	N/D	N/D	N/D	CDI	N/D	-	viva
274	56	<i>BRCA2-P/PP</i>	T1	N0	I	3	CDI	parda	-	viva
275	47	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	N/D	-	viva
276	59	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	amarela		viva
277	83	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	N/D		viva
278	33	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	I	3	CDI	branca	-	viva
279	39	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	N/D	-	viva
280	32	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI	branca	-	viva
281	60	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	I	3	CDI	N/D	-	viva
282	40	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	II	3	CDI	N/D		viva

283	44	<i>BRCA1-P/PP</i>	T3	N2	III	3	CDI	N/D		viva
284	53	<i>BRCA2-P/PP</i>	T3	N1	III	3	CDI	branca	-	viva
285	44	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	I	2	CDI	N/D		viva
286	57	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	2	CDI	branca		viva
287	65	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	I	3	CDI	branca		viva
288	32	<i>Sem variantes P/PP</i>	T3	N1	III	3	CDI	branca		viva
289	70	<i>Sem variantes P/PP</i>	T3	N0	II	3	CDI	N/D		viva
290	45	<i>BRCA1-P/PP</i>	T1	N0	I	3	CDI	branca	-	viva
291	29	<i>BRCA1-P/PP</i>	T1	N0	I	3	CDI	branca	-	viva
292	44	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	N/D		viva
293	56	<i>Sem variantes P/PP</i>	T4	N1	III	3	CDI	N/D		viva
294	52	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N2	III	2	CDI	amarela	-	viva
295	70	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI micropapilar	N/D		viva
296	54	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	I	3	CDI	branca		viva
297	50	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N2	III	3	CDI	branca		viva
298	56	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N1	II	2	CDI	N/D		viva
299	79	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N3	III	3	CDI medular atípico	N/D		viva
300	70	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	I	2	CDI	branca		viva
301	77	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	N/D		viva
302	42	<i>Sem variantes P/PP</i>	T4	N3	III	2	CDI	N/D		óbito
303	44	<i>BRCA2-P/PP</i>	T3	N0	II	3	CDI	N/D	-	viva
304	73	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	Carcinoma papilar sólido invasivo	N/D		viva
305	47	<i>Sem variantes P/PP</i>	T3	N1	III	3	CDI	branca		viva
306	57	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI medular	branca		viva
307	29	<i>Sem variantes P/PP</i>	T3	N2	III	3	CDI	N/D		viva
308	47	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	I	3	CDI	amarela	-	viva
309	60	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
310	53	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	I	3	CDI	branca	-	viva
311	49	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	Medular atípico	branca	-	viva

312	38	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	Carcinoma Lobular Pleomórfico	branca		viva
313	41	BRCA1-P/PP	T1	N0	I	3	CDI	parda	-	viva
314	48	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	3	CDI	branca		viva
315	65	Sem variantes P/PP	T2	N3	III	2	CLI	branca		viva
316	36	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	3	CDI	N/D		viva
317	29	Sem variantes P/PP	T4	N1	III	3	CDI	N/D	-	viva
318	46	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	N/D		óbito
319	34	Sem variantes P/PP	T3	N1	III	2	CDI	branca		viva
320	44	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI medular atípico	N/D		viva
321	78	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	2	CDI	N/D		viva
322	62	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
323	36	Sem variantes P/PP	T2	N2	III	3	CDI	N/D		viva
324	42	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	2	CDI	N/D		viva
325	58	BRCA1-P/PP	T2	N2	II	2	CDI	N/D		viva
326	77	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
327	44	Sem variantes P/PP	N/ D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	-	viva
328	36	BRCA1-P/PP	T2	N2	III	2	CDI	branca		viva
329	30	Sem variantes P/PP	T2	N2	III	3	CDI	N/D		viva
330	48	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	2	CDI	N/D		viva
331	51	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	1	Carcinoma Adenoide cístico	N/D		viva
332	83	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	2	Carcinoma Lobular Pleomórfico	amarela		viva
333	41	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	3	CDI	amarela		viva
334	56	BRCA1-P/PP	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
335	45	Sem variantes P/PP	T4	N4	III	2	CDI	branca		viva
336	47	BRCA1-P/PP	T2	N0	I	2	CDI	branca	-	viva
337	64	Sem variantes P/PP	T2	N1	II	3	CDI	N/D		viva
338	47	Sem variantes P/PP	T2	N0	II	2	CDI	branca		viva
339	73	Sem variantes P/PP	T1	N1	II	2	CDI	N/D		viva
340	46	Sem variantes P/PP	T1	N0	I	2	CDI	branca		viva

341	42	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	III	2	CDI	branca	-	viva
342	87	<i>Sem variantes P/PP</i>	T4	N2	III	2	CDI	N/D		óbito
343	71	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	N/D		viva
344	64	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI medular	N/D		viva
345	43	<i>BRCA1-P/PP</i>	T3	N2	III	3	CDI	branca	-	viva
346	52	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI	branca		viva
347	25	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
348	39	<i>BRCA1-P/PP</i>	T1	N0	I	2	CDI	N/D	-	viva
349	40	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	N/D		viva
350	53	<i>BRCA2-P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI	branca		viva
351	30	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca	-	viva
352	47	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	I	3	metaplásico	parda	-	óbito
353	35	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	Metaplásico	branca		viva
354	48	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI medular atípico	N/D		viva
355	43	<i>BRCA1-P/PP</i>	T1	N0	I	2	CDIS	branca		viva
356	40	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	2	CDI	parda		viva
357	64	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N3	III	3	CDI	branca		viva
358	51	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	III	3	CDI	branca		viva
359	87	<i>Sem variantes P/PP</i>	TX	NX	II	3	CDI	branca		óbito
360	35	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	II	3	Medular	branca		viva
361	58	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI medular	branca		viva
362	64	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI	branca		viva
363	66	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
364	40	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	amarela		viva
365	61	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI	N/D		viva
366	43	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N1	II	3	CDI	branca		viva
367	31	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	II	3	Medular	branca		viva
368	44	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N2	III	3	CDI	N/D		viva
369	42	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
370	37	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI	branca		viva

371	35	<i>Sem variantes P/PP</i>	N/D	N/D	N/D	3	CDI	branca		viva
372	52	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI medular	branca		viva
373	46	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
374	38	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N3	N/D	3	CDI	branca		viva
375	47	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	I	1	CDI	branca	-	viva
376	48	<i>BRCA2-P/PP</i>	T4	N0	III	3	CDI	branca	-	viva
377	26	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	I	3	CDI	branca	-	viva
378	41	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	3	CDI	parda		viva
379	46	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	2	CDI	branca		viva
380	53	<i>BRCA1-P/PP</i>	T1	N0	I	N/D	CDI	N/D	-	viva
381	51	<i>Sem variantes P/PP</i>	T4	N2	III	3	CDI	N/D		óbito
382	33	<i>BRCA1-P/PP</i>	T3	N3	III	2	CDI	branca	-	viva
383	26	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
384	27	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	II	3	Metaplásico	branca		viva
385	76	<i>Sem variantes P/PP</i>	T4	N2	III	N/D	Medular atípico	N/D		óbito
386	35	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca	-	viva
387	79	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	N/D	Medular	branca		viva
388	53	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	2	CDI	N/D		viva
389	47	<i>Sem variantes P/PP</i>	T3	N1	III	3	CDI	branca		viva
390	53	<i>BRCA1-P/PP</i>	TX	NX	IV	1	CDI	branca	-	óbito
391	65	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
392	35	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
393	75	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	I	3	CDI	branca		viva
394	38	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N2	III	3	CDI	parda	-	viva
395	29	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N0	II	3	CDI	branca		viva
396	44	<i>BRCA1-P/PP</i>	T2	N1	II	N/D	CDI	branca	-	viva
397	47	<i>Sem variantes P/PP</i>	T2	N1	II	N/D	CLI	branca	-	viva
398	41	<i>BRCA1-P/PP</i>	T3	N1	III	2	CDI	branca	-	viva
399	54	<i>Sem variantes P/PP</i>	T1	N0	I	2	CDI	branca		viva
400	56	<i>Sem variantes P/PP</i>	T3	N2	III	3	CDI	N/D		óbito

Anexo 4. Análise de metilação das regiões promotoras dos genes *BRCA1* e *RAD51C* em tecido tumoral primário de CMTN e metastático

Nº do caso	ID da amostra	Idade diagnóstico de TN	Metástase	Classificação do tecido	% Células neoplásicas	Metilação <i>BRCA1</i> tumor fresco	Metilação <i>BRCA1</i> FFPE	Metilação <i>RAD51C</i> tumor fresco	Metilação <i>RAD51C</i> FFPE	Classificação de metilação <i>BRCA1</i> primário	Classificação de metilação <i>RAD51C</i> primário	Classificação de metilação <i>BRCA1</i> metástase	Classificação de metilação <i>RAD51C</i> metástase
1	M302	61	Sim	Tumor fresco primário	N/D	4,60%	N/A	5,60%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
1	1399195-BAA (SNC)		Sim	Tumor FFPE metástase	40%	N/A	67,80%	N/A	3,50%	-	-	Hipermetilado	Não metilado
1	1230704-AA (osso)		Sim	Tumor FFPE metástase	40%	N/A	0,90%	N/A	1,30%	-	-	Não metilado	Não metilado
2	M262T/ TN10S	81	Sim	Tumor fresco primário	80%	1,50%	N/A	10,60%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
2	H15-001541-1A (pulmão)		Sim	Tumor FFPE metástase	20%	N/A	1,30%	N/A	2,20%	-	-	Não metilado	Não metilado
3	M370T	48	Sim	Tumor fresco primário	100%	2,10%	N/A	2,10%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
5	M386T / 14064160 BAC (mama)	49	Sim	Tumor fresco primário	N/D	3,30%	N/A	76,70%	N/A	Não metilado	Hipermetilado	-	-
11	M740T / SG 45482	17	Sim	Tumor fresco primário	80%	2,00%	N/A	1,60%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
16	H19-004084-1A (fígado)	28	Sim	Tumor FFPE metástase	60%	N/A	32,80%	N/A	50%	-	-	Intermediário	Hipermetilado
17	H20-011056 (pulmão)	37	Sim	Tumor FFPE metástase	60%	N/A	60,10%	N/A	4,90%	-	-	Hipermetilado	Não metilado
19	Adamant05	38	Sim	Tumor fresco primário	N/D	49,68%	N/A	15,82%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
20	H17-025982-1A (SNC)	44	Sim	Tumor FFPE metástase	50%	N/A	1,90%	N/A	3,40%	-	-	Não metilado	Não metilado
20	H17-025516 (pulmao)		Sim	Tumor FFPE metástase	60%	N/A	1,20%	N/A	1,10%	-	-	Não metilado	Não metilado
21	Adamant07	72	Sim	Tumor fresco primário	N/D	51,00%	N/A	2,10%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
23	Adamant03	63	Sim	Tumor fresco primário	N/D	1,23%	N/A	2,01%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
24	Adamant01	29	Sim	Tumor fresco primário	N/D	25,80%	N/A	9,00%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
25	M729T / SG 27959	52	Sim	Tumor fresco primário	80%	4,30%	N/A	6,10%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
26	H17-001005 (mama)	63	Sim	Tumor FFPE primário	50%	N/A	1,90%	N/A	79,50%	Não metilado	Hipermetilado	-	-
27	H19-033119 (snc)	61	Sim	Tumor FFPE metástase	75%	N/A	2,90%	N/A	13,40%	-	-	Não metilado	Não metilado
29	SG 28516 / H16-029983 (mama)	50	Sim	Tumor FFPE primário	20%	N/A	14,70%	N/A	19,70%	Não metilado	Não metilado	-	-
30	CTC Meta 08 / H16-022735 (mama)	47	Sim	Tumor fresco primário	30%	N/A	1,10%	N/A	5,70%	Não metilado	Não metilado	-	-

32	M736T / SG 27193	42	Sim	Tumor fresco primário	80%	16,50%	N/A	20,80%	N/A	Não metilado	Intermediário	-	-
34	H16-014310-1A (mama)	32	Sim	Tumor FFPE primário	50%	5,70%	N/A	90,80%	N/A	Não metilado	Hipermetilado	-	-
35	H16-013493 (mama)	31	Sim	Tumor FFPE primário	20%	1,70%	N/A	91,40%	N/A	Não metilado	Hipermetilado	-	-
37	H16-017933-1-C (mama)	64	Sim	Tumor FFPE primário	50%	N/A	2,90%	N/A	0,93%	Não metilado	Não metilado	-	-
38	H15-032182 (mama)	43	Sim	Tumor FFPE primário	40%	N/A	41,80%	N/A	16,90%	Hipermetilado	Não metilado	-	-
39	SG 28608 / H15-031379-1A	54	Sim	Tumor FFPE primário	50%	N/A	13,60%	N/A	23,10%	Não metilado	Intermediário	-	-
40	CTC Meta 23 / H17-014152-1A (mama) / H15-027173-1A (mama)	36	Sim	Tumor FFPE primário	90%	N/A	2,50%	N/A	0,90%	Não metilado	Não metilado	-	-
41	H17-002974-1-A (lombar)	46	Sim	Tumor FFPE metástase	55%	N/A	9,50%	N/A	14,40%	-	-	Não metilado	Não metilado
41	H15-018008-1A (mama)		Sim	Tumor FFPE primário	55%	N/A	2,00%	N/A	1,20%	Não metilado	Não metilado	-	-
43	Adamant20	39	Sim	Tumor fresco primário	N/D	48,30%	N/A	4,30%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
44	H15-003824-3-C (mama)	41	Sim	Tumor FFPE primário	80%	N/A	25,10%	N/A	2,80%	Intermediário	Não metilado	-	-
46	M735T / SG 23547	37	Sim	Tumor fresco primário	85%	2,00%	N/A	2,30%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
47	M728T	68	Sim	Tumor fresco primário	85%	3,00%	N/A	3,90%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
49	M326T	30	Sim	Tumor fresco primário	N/D	80,30%	N/A	1,60%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
49	H15-025091-1A (pulmão)		Sim	Tumor FFPE metástase	40%	N/A	58,30%	N/A	1,40%	-	-	Hipermetilado	Não metilado
51	M726T / SG 20557	53	Sim	Tumor fresco primário	30%	12,40%	N/A	16,70%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
52	M734T / SG 20852	44	Sim	Tumor fresco primário	80%	3,10%	N/A	3,10%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
53	M725T	51	Sim	Tumor fresco primário	40%	52,10%	N/A	1,90%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
54	H16-008326 AD (mama)	59	Sim	Tumor FFPE primário	80%	N/A	18,10%	N/A	1,97%	Não metilado	Não metilado	-	-
55	M266T/ TN 16S	54	Sim	Tumor fresco primário	N/D	29,60%	N/A	1,20%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
56	M258/TN8S / 1244360-AC (mama)	39	Sim	Tumor FFPE primário	85%	N/A	85,70%	N/A	1,35%	Hipermetilado	Não metilado	-	-
57	M737T / SG 21801	63	Sim	Tumor fresco primário	85%	1,10%	N/A	3,60%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
57	H17-011198 (snc)		Sim	Tumor FFPE metástase	60%	N/A	2,80%	N/A	2,80%	-	-	Não metilado	Não metilado
58	1239559 (mama)	29	Sim	Tumor FFPE primário	25%	N/A	15,33%	N/A	1,60%	Não metilado	Não metilado	-	-
58	H14-002630 1A (snc)		Sim	Tumor FFPE metástase	85%	N/A	2,60%	N/A	61,70%	-	-	Não metilado	Hipermetilado

59	M305/ TN 27S	42	Sim	Tumor fresco primário	40%	23,00%	N/A	2,40%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
59	H15-012714-1B (SNC)		Sim	Tumor FFPE metástase	40%	N/A	2,30%	N/A	1,80%	-	-	Não metilado	Não metilado
60	M304	70	Sim	Tumor fresco primário	N/D	56,70%	N/A	0,80%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
61	1388007-AAB (mama)	35	Sim	Tumor FFPE primário	85%	N/A	42,30%	N/A	74,80%	Hipermetilado	hipermetilado	-	-
62	M380T	51	Sim	Tumor fresco primário	95%	67,40%	N/A	2,50%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
62	1364437-AAA (pulmão)		Sim	Tumor FFPE metástase	60%	N/A	2,00%	N/A	1,40%	-	-	Não metilado	Não metilado
63	M303/ TN21S	41	Sim	Tumor fresco primário	N/D	0,50%	N/A	0,50%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
64	M365T / SG 15923	50	Sim	Tumor fresco primário	N/D	82,20%	N/A	14,40%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
65	Adamant10	40	Sim	Tumor fresco primário	N/D	28,80%	N/A	2,10%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
65	H18-005562 (osso)		Sim	Tumor FFPE metástase	40%	N/A	15,00%	N/A	3,60%	-	-	Não metilado	Não metilado
66	M293	47	Sim	Tumor fresco primário	N/D	28,80%	N/A	0,80%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
66	1227212-AA (SNC)		Sim	Tumor FFPE metástase	45%	N/A	1,20%	N/A	2,90%	-	-	Não metilado	Não metilado
67	M366T	34	Sim	Tumor fresco primário	N/D	44,40%	N/A	6,50%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
68	1110197 AA (mama)	49	Sim	Tumor FFPE primário	50%	N/A	34,30%	N/A	16,00%	Intermediário	Não metilado	-	-
69	M357T-A / 14038832 AAB (mama)	36	Sim	Tumor fresco primário	N/D	2,00%	N/A	1,40%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
71	1105896 AH (mama)	52	Sim	Tumor FFPE primário	90%	N/A	1,35%	N/A	2,34%	Não metilado	Não metilado	-	-
71	1310252 AAA (fígado)		Sim	Tumor FFPE metástase	90%	N/A	1,03%	N/A	0,70%	-	-	Não metilado	Não metilado
72	M723T/SG 15070	53	Sim	Tumor fresco primário	50%	21,00%	N/A	1,20%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
73	M364T	50	Sim	Tumor fresco primário	N/D	9,40%	N/A	4,40%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
74	M724T / SG 17142	52	Sim	Tumor fresco primário	20%	39,70%	N/A	1,20%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
77	M286T	39	Sim	Tumor fresco primário	N/D	38,30%	N/A	10,30%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
78	M298 / 1113671-AA (mama)	38	Sim	Tumor fresco primário	N/D	0,90%	N/A	2,70%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
79	M281T	32	Sim	Tumor fresco primário	N/D	6,70%	N/A	22,40%	N/A	Não metilado	Intermediário	-	-
80	M259T/TN9S	54	Sim	Tumor fresco primário	100%	23,70%	N/A	2,70%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
80	H15-002175-1A (pele distante)		Sim	Tumor FFPE metástase	40%	N/A	1,50%	N/A	8,20%	-	-	Não metilado	Não metilado

82	M7T/ M7S	36	Sim	Tumor fresco primário	90%	21,00%	N/A	1,60%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
83	M378T	65	Sim	Tumor fresco primário	N/D	5,10%	N/A	3,80%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
84	948223-AA (mama)	42	Sim	Tumor FFPE primário	65%	N/A	55,90%	N/A	56,40%	Hipermetilado	Hipermetilado	-	-
84	H15-020315-3B (pulmão)		Sim	Tumor FFPE metástase	5%	N/A	1,20%	N/A	1,10%	-	-	Não metilado	Não metilado
85	M308	59	Sim	Tumor fresco primário	95%	1,00%	N/A	0,80%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
85	1025890-AB (SNC)		Sim	Tumor FFPE metástase	50%	N/A	1,50%	N/A	0,90%	-	-	Não metilado	Não metilado
86	M32T	34	Sim	Tumor fresco primário	100%	52,70%	N/A	2,50%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
87	M722T / SG 9137	38	Sim	Tumor fresco primário	90%	75,80%	N/A	1,50%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
88	M300/M301/ 814244 M (mama)	43	Sim	Tumor fresco primário	N/D	5,30%	N/A	6,10%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
89	MIC191	48	Sim	Tumor fresco primário	N/D	1,80%	N/A	1,80%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
90	SM 170-1 / 915703 (SNC) / 943390 (SNC)		Sim	Tumor FFPE metástase	70%	N/A	1,30%	N/A	1,60%	-	-	Não metilado	Não metilado
91	MIC146	18	Sim	Tumor fresco primário	N/D	16,10%	N/A	3,40%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
92	MIC185/M216N	52	Sim	Tumor fresco primário	N/D	3,40%	N/A	3,30%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
93	M291	50	Sim	Tumor fresco primário	40%	1,00%	N/A	1,30%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
93	1255399 (pericárdio)		Sim	Tumor FFPE metástase	30%	N/A	3,10%	N/A	1,40%	-	-	Não metilado	Não metilado
94	M730T / SG 28474 / H16-015395-1A (osso)	74	Sim	Tumor fresco primário	60%	4,20%	N/A	1,00%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
95	M276T/ M276N	40	Sim	Tumor fresco primário	N/D	3,40%	N/A	14,50%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
96	M287T/ TN 22S	44	Sim	Tumor fresco primário	N/D	3,10%	N/A	2,60%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
97	M721T	82	Sim	Tumor fresco primário	70%	1,20%	N/A	1,80%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
98	19064T	58	Sim	Tumor fresco primário	N/D	11,40%	N/A	9,50%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
99	M351T	47	Sim	Tumor fresco primário	100%	1,50%	N/A	1,30%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
100	M350T	44	Sim	Tumor fresco primário	N/D	61,60%	N/A	5,10%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
101	M347T	44	Sim	Tumor fresco primário	70%	50,40%	N/A	8,20%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
102	M345T	67	Sim	Tumor fresco primário	100%	9,50%	N/A	2,80%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-

103	M604T	46	Sim	Tumor fresco primário	40%	1,10%	N/A	37,10%	N/A	Não metilado	Intermediário	-	-
104	M727T	69	Sim	Tumor fresco primário	60%	4,50%	N/A	3,30%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
104	H16-025935-1A (pele distante)		Sim	Tumor FFPE metástase	20%	N/A	1,22%	N/A	1,08%	-	-	Não metilado	Não metilado
107	1027184-AAG (mama)	51	Sim	Tumor FFPE primário	85%	N/A	7,70%	N/A	10,80%	Não metilado	Não metilado	-	-
108	1143944-AK (mama)	66	Sim	Tumor FFPE primário	55%	N/A	6,50%	N/A	1,10%	Não metilado	Não metilado	-	-
109	1256831-AW (mama)	43	Sim	Tumor FFPE primário	90%	N/A	2,60%	N/A	1,80%	Não metilado	Não metilado	-	-
110	H15-010879-1E (mama)	31	Sim	Tumor FFPE primário	85%	N/A	2,30%	N/A	15,70%	Não metilado	Não metilado	-	-
111	H15-010984-1A (mama)	49	Sim	Tumor FFPE primário	50%	N/A	33,50%	N/A	24,90%	Intermediário	Intermediário	-	-
112	H16-024256-1F (mama)	51	Sim	Tumor FFPE primário	90%	N/A	8,30%	N/A	10,50%	Não metilado	Não metilado	-	-
113	1107017 AA (osso) / 1107017 AB (osso)	70	Sim	Tumor FFPE metástase	70%	N/A	1,55%	N/A	1,64%	-	-	Não metilado	Não metilado
114	1144558-AA (mama)	47	Sim	Tumor FFPE primário	95%	N/A	47,90%	N/A	1,30%	Hipermetilado	Não metilado	-	-
116	1031298-AM (pulmão) / 1031298 AK (pulmão)	59	Sim	Tumor FFPE metástase	60%	N/A	44,70%	N/A	1,49%	-	-	Hipermetilado	Não metilado
117	1032143-AH (snc) / 1032143 AI (snc)	44	Sim	Tumor FFPE metástase	50%	N/A	5,10%	N/A	20,80%	-	-	Não metilado	Intermediário
119	1114989-AH (mama) / 1210025-AA (osso)	74	Sim	Tumor FFPE metástase	50%	N/A	19,00%	N/A	17,30%	-	-	Não metilado	Não metilado
121	116364 (mama)	37	Sim	Tumor FFPE primário	90%	11,40%	N/A	0,90%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
122	1256777 B1 (mama)	72	Sim	Tumor FFPE primário	15%	N/A	17,60%	N/A	2,30%	Não metilado	Não metilado	-	-
123	H15-028502-1A (mama)	57	Sim	Tumor FFPE primário	60%	N/A	13,50%	N/A	1,70%	Não metilado	Não metilado	-	-
125	H15-035552-1M (mama)	38	Sim	Tumor FFPE primário	75%	N/A	6,40%	N/A	3,00%	Não metilado	Não metilado	-	-
127	MIC25T	54	Sim	Tumor fresco primário	N/D	18,30%	N/A	1,10%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
128	MIC21	43	Sim	Tumor fresco primário	50%	33,40%	N/A	2,00%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
129	M343T	39	Sim	Tumor fresco primário	N/D	23,90%	N/A	6,00%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
130	MIC20T	50	Sim	Tumor fresco primário	N/D	1,70%	N/A	3,10%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
141	M267T/ TN18S	63	Não	Tumor fresco primário	N/D	12,30%	N/A	5,20%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
181	Adamant22	32	Não	Tumor fresco primário	N/D	47,60%	N/A	2,90%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-

183	Adamant18	46	Não	Tumor fresco primário	N/D	46,00%	N/A	3,90%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
184	Adamant21	62	Não	Tumor fresco primário	N/D	47,40%	N/A	2,80%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
185	Adamant17	42	Não	Tumor fresco primário	N/D	34,80%	N/A	1,60%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
186	Adamant16	41	Não	Tumor fresco primário	N/D	1,01%	N/A	73,94%	N/A	Não metilado	Hipermetilado	-	-
187	Adamant15	41	Não	Tumor fresco primário	N/D	25,60%	N/A	2,70%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
194	Adamant11	40	Não	Tumor fresco primário	N/D	41,10%	N/A	3,70%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
195	Adamant09	62	Não	Tumor fresco primário	N/D	26,60%	N/A	3,70%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
197	Adamant06	64	Não	Tumor fresco primário	N/D	45,20%	N/A	4,90%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
198	Adamant04	37	Não	Tumor fresco primário	N/D	3,10%	N/A	18,50%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
199	Adamant02	49	Não	Tumor fresco primário	N/D	53,60%	N/A	13,10%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
203	Adamant12	73	Não	Tumor fresco primário	N/D	45,70%	N/A	2,60%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
264	Adamant13	53	Não	Tumor fresco primário	N/D	57,40%	N/A	2,20%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
265	Adamant14	33	Não	Tumor fresco primário	N/D	55,90%	N/A	2,40%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
266	M385T	33	Não	Tumor fresco primário	N/D	56,20%	N/A	2,60%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
268	M384T	51	Não	Tumor fresco primário	N/D	7,60%	N/A	62,00%	N/A	Não metilado	Hipermetilado	-	-
270	M382T	39	Não	Tumor fresco primário	N/D	39,80%	N/A	2,40%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
271	M325T	32	Não	Tumor fresco primário	N/D	52,90%	N/A	2,40%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
276	M268T/TN 17S	59	Não	Tumor fresco primário	N/D	3,90%	N/A	4,60%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
277	M381T	83	Não	Tumor fresco primário	N/D	25,40%	N/A	2,40%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
285	M265T/ TN 15S	44	Não	Tumor fresco primário	N/D	48,50%	N/A	9,80%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
287	M263T/TN 11S	65	Não	Tumor fresco primário	N/D	13,20%	N/A	4,50%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
288	M379T	32	Não	Tumor fresco primário	N/D	46,20%	N/A	3,90%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
292	M373T	44	Não	Tumor fresco primário	N/D	38,50%	N/A	2,00%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
293	M374T	56	Não	Tumor fresco primário	N/D	21,70%	N/A	84,50%	N/A	Intermediário	Hipermetilado	-	-

295	M371T	70	Não	Tumor fresco primário	N/D	1,40%	N/A	70,70%	N/A	Não metilado	Hipermetilado	-	-
297	M369T	50	Não	Tumor fresco primário	N/D	2,30%	N/A	2,70%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
298	M367T	56	Não	Tumor fresco primário	N/D	51,20%	N/A	2,40%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
299	M368T	79	Não	Tumor fresco primário	N/D	6,60%	N/A	7,30%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
301	M363T	77	Não	Tumor fresco primário	N/D	60,70%	N/A	4,00%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
302	M362T	42	Não	Tumor fresco primário	N/D	34,30%	N/A	6,60%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
304	M361T	73	Não	Tumor fresco primário	N/D	54,30%	N/A	2,90%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
306	M260T/ TN 12S	57	Não	Tumor fresco primário	N/D	0,70%	N/A	0,80%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
312	M299	38	Não	Tumor fresco primário	N/D	46,30%	N/A	0,90%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
314	M319T	48	Não	Tumor fresco primário	N/D	1,30%	N/A	1,80%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
316	M285T/ TN 24S	36	Não	Tumor fresco primário	N/D	0,80%	N/A	0,90%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
318	M15T	46	Não	Tumor fresco primário	N/D	59,10%	N/A	1,00%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
319	M292/ TN 25S	34	Não	Tumor fresco primário	N/D	0,80%	N/A	0,90%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
320	M284T	44	Não	Tumor fresco primário	N/D	5,70%	N/A	74,40%	N/A	Não metilado	Hipermetilado	-	-
321	M321T/ TN 26S	78	Não	Tumor fresco primário	N/D	4,10%	N/A	10,60%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
322	M316	62	Não	Tumor fresco primário	N/D	1,00%	N/A	1,80%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
323	M275T-B	36	Não	Tumor fresco primário	N/D	26,10%	N/A	9,00%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
325	M315T/ TN 23S	58	Não	Tumor fresco primário	N/D	3,10%	N/A	2,70%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
326	M323T	77	Não	Tumor fresco primário	N/D	2,90%	N/A	55,80%	N/A	Não metilado	Hipermetilado	-	-
328	M280T/TN20S	36	Não	Tumor fresco primário	N/D	6,70%	N/A	5,00%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
329	M313	30	Não	Tumor fresco primário	N/D	65,50%	N/A	7,10%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
330	M312/SG11391	48	Não	Tumor fresco primário	N/D	13,10%	N/A	2,80%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
331	M311T	51	Não	Tumor fresco primário	N/D	1,90%	N/A	2,20%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
332	M322T	83	Não	Tumor fresco primário	N/D	0,50%	N/A	1,60%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-

333	M278T	41	Não	Tumor fresco primário	N/D	10,00%	N/A	1,00%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
334	MIC234/ TN4S	56	Não	Tumor fresco primário	N/D	1,70%	N/A	1,80%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
335	M277T/SG11029	45	Não	Tumor fresco primário	N/D	2,90%	N/A	2,00%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
337	MIC228	64	Não	Tumor fresco primário	N/D	0,70%	N/A	0,80%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
338	MIC224/ TN 3S	47	Não	Tumor fresco primário	N/D	46,00%	N/A	1,80%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
339	M255T/ TN5S	73	Não	Tumor fresco primário	N/D	2,00%	N/A	1,50%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
340	M310	46	Não	Tumor fresco primário	N/D	28,80%	N/A	2,60%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
342	M314	87	Não	Tumor fresco primário	N/D	23,20%	N/A	20,60%	N/A	Intermediário	Intermediário	-	-
343	MIC218	71	Não	Tumor fresco primário	N/D	72,20%	N/A	1,80%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
344	M309	64	Não	Tumor fresco primário	N/D	12,40%	N/A	2,40%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
346	M324T	52	Não	Tumor fresco primário	N/D	14,70%	N/A	12,00%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
349	SM95-1T	40	Não	Tumor fresco primário	N/D	48,80%	N/A	3,00%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
350	MIC189/ TN 2S	53	Não	Tumor fresco primário	N/D	26,90%	N/A	53,50%	N/A	Intermediário	Hipermetilado	-	-
353	M274T -B	35	Não	Tumor fresco primário	N/D	25,40%	N/A	2,40%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
354	M356T	48	Não	Tumor fresco primário	N/D	3,90%	N/A	2,20%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
355	M355T	43	Não	Tumor fresco primário	N/D	2,61%	N/A	12,20%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
356	MIC183	40	Não	Tumor fresco primário	N/D	60,70%	N/A	0,50%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
357	MIC144	64	Não	Tumor fresco primário	N/D	55,80%	N/A	2,20%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
358	17791/11T/ 11S	51	Não	Tumor fresco primário	N/D	10,80%	N/A	12,90%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
359	18030/ 6T	87	Não	Tumor fresco primário	N/D	16,30%	N/A	7,30%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
360	M256T/ TN 6S	35	Não	Tumor fresco primário	N/D	0,70%	N/A	0,60%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
361	MIC142T/35526T/53T/ 53S	58	Não	Tumor fresco primário	N/D	0,60%	N/A	0,60%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
363	4956	66	Não	Tumor fresco primário	N/D	32,00%	N/A	2,00%	N/A	Intermediário	Não metilado	-	-
365	MIC141	61	Não	Tumor fresco primário	N/D	0,70%	N/A	78,40%	N/A	Não metilado	Hipermetilado	-	-

366	M214/MIC177/ MT32	43	Não	Tumor fresco primário	N/D	44,20%	N/A	6,50%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
368	MIC137/26762	44	Não	Tumor fresco primário	N/D	47,60%	N/A	1,20%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
370	MIC134	37	Não	Tumor fresco primário	N/D	2,70%	N/A	1,90%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
372	M352T	52	Não	Tumor fresco primário	N/D	15,00%	N/A	3,10%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
373	M377T	46	Não	Tumor fresco primário	N/D	60,30%	N/A	2,10%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
374	M282T/TN19S	38	Não	Tumor fresco primário	N/D	11,30%	N/A	8,00%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
378	MIC175/ MT15S/M217	41	Não	Tumor fresco primário	N/D	8,70%	N/A	2,60%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
379	M348T	46	Não	Tumor fresco primário	N/D	1,30%	N/A	0,80%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
385	M341T	76	Não	Tumor fresco primário	N/D	10,70%	N/A	6,30%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
387	M346T	79	Não	Tumor fresco primário	N/D	2,50%	N/A	5,20%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-
389	MIC68T	47	Não	Tumor fresco primário	N/D	72,80%	N/A	1,40%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
391	M344T	65	Não	Tumor fresco primário	N/D	75,00%	N/A	92,30%	N/A	Hipermetilado	Hipermetilado	-	-
399	17755/ 37S	54	Não	Tumor fresco primário	N/D	87,20%	N/A	11,90%	N/A	Hipermetilado	Não metilado	-	-
400	5228T	56	Não	Tumor fresco primário	N/D	0,40%	N/A	0,40%	N/A	Não metilado	Não metilado	-	-

Anexo 5. Análise de ancestralidade genética

Nº do caso	ID da amostra	Cor/raça autodeclarada	Nat, American	African	European	Asiatic	Classificação de ancestralidade	Metodologia
1	M302	branca	0,007	0,085	0,909	N/A	EUR	Análise de fragmentos
2	TN10S	branca	0,008	0,006	0,986	N/A	EUR	Análise de fragmentos
3	M370T	branca	0,057	0,034	0,91	N/A	EUR	Análise de fragmentos
4	MJ2037	N/D	0,013	0,184	0,802	N/A	EUR	Análise de fragmentos
5	M386T	N/D	0,004	0,04	0,956	N/A	EUR	Análise de fragmentos
6	TBM_VG_P08	preta	0,176949	0,555966	0,266245	0,00084	AFR_adEUR	PDMA
7	SG 18064	branca	0,16	0,04	0,80	0,00001	EUR	PDMA
8	Adamant63	N/D	0,00	0,28	0,72	0,00001	EUR_adAFR	PDMA
10	Adamant39	parda	0,00	0,00	1,00	0,00001	EUR	PDMA
11	SG 45482	branca	0,08	0,33	0,59	0,00001	EUR_adAFR	PDMA
12	Adamant50	branca	0,00	0,02	0,98	0,00001	EUR	PDMA
15	Adamant34	branca	0,21	0,28	0,51	0,000432	Admixed	PDMA
16	Adamant28	preta	0,18	0,16	0,66	0,000822	EUR	PDMA
17	Adamant27	branca	0,04	0,11	0,86	0,000543	EUR	PDMA
18	Adamant19	branca	0,12	0,28	0,60	0,002995	EUR_adAFR	PDMA
19	Adamant05	preta	0,07	0,71	0,22	0,00001	AFR_adEUR	PDMA
21	Adamant07	branca	0,00	0,00	1,00	0,00001	EUR	PDMA
22	TBM_VG_P05	branca	0,051924	0,040973	0,907093	0,00001	EUR	PDMA
23	Adamant03	branca	0,04	0,25	0,70	0,010877	EUR_adAFR	PDMA
24	Adamant01	amarela	0,00	0,00	0,00	0,99997	ASI	PDMA
25	SG 27959	branca	0,00	0,01	0,99	0,00001	EUR	PDMA

29	SG 28516	branca	0,00	0,02	0,98	0,00001	EUR	PDMA
32	SG 27193	branca	0,00	0,00	1,00	0,000262	EUR	PDMA
39	SG 28608	parda	0,00	0,01	0,99	0,00001	EUR	PDMA
43	Adamant20	parda	0,03	0,04	0,93	0,005856	EUR	PDMA
46	SG 23547	branca	0,21	0,37	0,42	0,00001	Admixed	PDMA
49	M326T	N/D	0,085	0,009	0,906	N/A	EUR	Análise de fragmentos
51	SG 20557	N/D	0,00	0,66	0,33	0,006558	AFR_adEUR	PDMA
52	SG 20852	N/D	0,00	0,01	0,99	0,00001	EUR	PDMA
55	TN 16S	N/D	0,003	0,002	0,995	N/A	EUR	Análise de fragmentos
56	M258/TN8S	N/D	0,085	0,046	0,869	N/A	EUR	Análise de fragmentos
57	SG 21801	branca	0,00	0,11	0,89	0,00001	EUR	PDMA
59	M305/ TN 27S	branca	0,44	0,06	0,5	N/A	EUR_adAMR	Análise de fragmentos
60	M304	parda	0,09	0,561	0,349	N/A	AFR_adEUR	Análise de fragmentos
62	M380T	preta	0,014	0,24	0,746	N/A	EUR_adAFR	Análise de fragmentos
63	M303/ TN21S	N/D	0,003	0,547	0,45	N/A	AFR_adEUR	Análise de fragmentos
64	M365T / SG 15923	branca	0,008	0,01	0,983	N/A	EUR	Análise de fragmentos
65	Adamant10	parda	0,14	0,15	0,71	0,00001	EUR	PDMA
66	M293	branca	0,004	0,005	0,991	N/A	EUR	Análise de fragmentos
67	M366T	branca	0,046	0,067	0,887	N/A	EUR	Análise de fragmentos
69	M357T-A	branca	0,004	0,021	0,974	N/A	EUR	Análise de fragmentos
70	M290	parda	0,09	0,034	0,876	N/A	EUR	Análise de fragmentos
72	SG 15070	branca	0,08	0,16	0,76	0,00001	EUR	PDMA

73	M364T	N/D	0,046	0,005	0,949	N/A	EUR	Análise de fragmentos
74	SG 17142	branca	0,02	0,01	0,97	0,000296	EUR	PDMA
76	-	branca	0,017	0,033	0,95	N/A	EUR	Análise de fragmentos
77	M286T	N/D	0,08	0,042	0,879	N/A	EUR	Análise de fragmentos
78	M298	branca	0,002	0,002	0,996	N/A	EUR	Análise de fragmentos
79	M281T	N/D	0,016	0,012	0,972	N/A	EUR	Análise de fragmentos
80	M259T/TN9S	branca	0,008	0,009	0,983	N/A	EUR	Análise de fragmentos
82	M7T/ M7S	parda	0,005	0,05	0,945	N/A	EUR	Análise de fragmentos
83	M378T	branca	0,002	0,008	0,99	N/A	EUR	Análise de fragmentos
85	M308	branca	0,004	0,339	0,657	N/A	EUR_adAFR	Análise de fragmentos
86	M32T	branca	0,009	0,061	0,931	N/A	EUR	Análise de fragmentos
87	SG 9137	N/D	0,00	0,00	0,99	0,012207	EUR	PDMA
88	M300	parda	0,204	0,005	0,791	N/A	EUR_adAMR	Análise de fragmentos
90	SM 170-1	N/D	0,11	0,12	0,77	0,005998	EUR	PDMA
91	MIC146	N/D	0,039	0,004	0,957	N/A	EUR	Análise de fragmentos
92	M216N	branca	0,006	0,003	0,991	N/A	EUR	Análise de fragmentos
93	M291	branca	0,011	0,002	0,987	N/A	EUR	Análise de fragmentos
94	SG 28474)	branca	0,14	0,40	0,46	0,00001	EUR_adAFR	PDMA
95	M276N	branca	0,002	0,005	0,992	N/A	EUR	Análise de fragmentos

96	TN 22S	branca	0,027	0,005	0,968	N/A	EUR	Análise de fragmentos
98	19064T	branca	0,006	0,018	0,976	N/A	EUR	Análise de fragmentos
99	M351T	parda	0,218	0,033	0,749	N/A	EUR_adAMR	Análise de fragmentos
100	M350T	branca	0,19	0,003	0,806	N/A	EUR	Análise de fragmentos
101	M347T	branca	0,013	0,002	0,985	N/A	EUR	Análise de fragmentos
102	M345T	N/D	0,009	0,027	0,964	N/A	EUR	Análise de fragmentos
104	SG 15611	branca	0,00	0,00	1,00	0,00001	EUR	PDMA
127	MIC25T	amarela	0,508	0,078	0,414	N/A	AMR_adEUR	Análise de fragmentos
128	MIC21	branca	0,005	0,008	0,986	N/A	EUR	Análise de fragmentos
129	M343T	branca	0,008	0,005	0,987	N/A	EUR	Análise de fragmentos
130	MIC20T	N/D	0,058	0,016	0,925	N/A	EUR	Análise de fragmentos
133	Adamant53	N/D	0,26	0,19	0,55	0,00001	EUR_adAMR	PDMA
134	Adamant54	N/D	0,17	0,11	0,71	0,00001	EUR	PDMA
135	Adamant56	N/D	0,22	0,05	0,72	0,002283	EUR_adAMR	PDMA
136	Adamant51	branca	0,35	0,03	0,63	0,00001	EUR_adAMR	PDMA
137	Adamant52	N/D	0,08	0,03	0,89	0,003766	EUR	PDMA
138	Adamant49	N/D	0,08	0,16	0,76	0,00001	EUR	PDMA
140	M261T/ TN13S	branca	0,004	0,013	0,983	N/A	EUR	Análise de fragmentos
141	M267T/ TN18S	parda	0,433	0,242	0,325	N/A	Admixed	Análise de fragmentos
144	Adamant73	N/D	0,00	0,02	0,98	0,00001	EUR	PDMA
146	Adamant72	N/D	0,01	0,07	0,42	0,504607	ASI_adEUR	PDMA
147	Adamant69	parda	0,08	0,09	0,82	0,00001	EUR	PDMA

148	Adamant70	N/D	0,00	0,00	0,00	0,99997	ASI	PDMA
149	Adamant67	branca	0,19	0,18	0,62	0,00001	EUR	PDMA
150	Adamant68	N/D	0,12	0,48	0,40	0,00001	AFR_adEUR	PDMA
151	Adamant66	branca	0,02	0,06	0,92	0,00001	EUR	PDMA
152	Adamant65	branca	0,08	0,08	0,84	0,0043	EUR	PDMA
153	Adamant61	N/D	0,14	0,05	0,80	0,005275	EUR	PDMA
154	Adamant64	branca	0,00	0,97	0,02	0,009255	AFR	PDMA
155	Adamant57	N/D	0,00	0,00	1,00	0,00001	EUR	PDMA
156	Adamant58	branca	0,07	0,08	0,84	0,00001	EUR	PDMA
157	Adamant59	branca	0,28	0,07	0,65	0,00001	EUR_adAMR	PDMA
158	Adamant47	branca	0,14	0,40	0,46	0,001061	EUR_adAFR	PDMA
160	Adamant 45	branca	0,01	0,02	0,95	0,022397	EUR	PDMA
161	Adamant43	branca	0,05	0,07	0,88	0,001068	EUR	PDMA
162	Adamant42	branca	0,50	0,24	0,26	0,00001	Admixed	PDMA
163	Adamant41	preta	0,17	0,19	0,63	0,00001	EUR	PDMA
164	Adamant38	branca	0,03	0,02	0,96	0,00001	EUR	PDMA
165	Adamant37	branca	0,16	0,09	0,75	0,00001	EUR	PDMA
169	Adamant36	branca	0,05	0,08	0,87	0,008049	EUR	PDMA
174	Adamant35	N/D	0,08	0,04	0,87	0,007657	EUR	PDMA
175	Adamant33	branca	0,04	0,01	0,94	0,00676	EUR	PDMA
176	Adamant31	branca	0,17	0,25	0,58	0,00001	EUR_adAFR	PDMA
177	Adamant32	branca	0,04	0,08	0,88	0,009553	EUR	PDMA
178	Adamant25	branca	0,13	0,07	0,80	0,00001	EUR	PDMA
179	Adamant26	branca	0,08	0,05	0,87	0,00001	EUR	PDMA
181	Adamant22	branca	0,16	0,08	0,75	0,003832	EUR	PDMA
182	Adamant24	branca	0,16	0,04	0,80	0,00001	EUR	PDMA
183	Adamant18	branca	0,02	0,33	0,65	0,010197	EUR_adAFR	PDMA
184	Adamant21	branca	0,24	0,26	0,50	0,00001	Admixed	PDMA
185	Adamant17	branca	0,12	0,19	0,69	0,00001	EUR	PDMA
186	Adamant16	branca	0,38	0,19	0,42	0,007517	EUR_adAMR	PDMA
187	Adamant15	branca	0,02	0,01	0,96	0,010568	EUR	PDMA

194	Adamant11	branca	0,13	0,25	0,61	0,006899	EUR_adAFR	PDMA
195	Adamant09	branca	0,04	0,06	0,90	0,00001	EUR	PDMA
196	Adamant08	branca	0,20	0,10	0,69	0,005321	EUR_adAMR	PDMA
197	Adamant06	branca	0,01	0,01	0,97	0,003052	EUR	PDMA
198	Adamant04	branca	0,22	0,00	0,78	0,00001	EUR_adAMR	PDMA
199	Adamant02	branca	0,08	0,03	0,89	0,00001	EUR	PDMA
203	Adamant12	preta	0,00	0,94	0,05	0,011928	AFR	PDMA
243	Adamant29	branca	0,06	0,77	0,16	0,00001	AFR	PDMA
253	Adamant40	parda	0,09	0,47	0,44	0,00001	AFR_adEUR	PDMA
263	Adamant44	branca	0,01	0,02	0,96	0,013135	EUR	PDMA
264	Adamant13	branca	0,08	0,64	0,28	0,004314	AFR_adEUR	PDMA
265	Adamant14	branca	0,04	0,05	0,91	0,003316	EUR	PDMA
266	M385T	branca	0,042	0,119	0,84	N/A	EUR	Análise de fragmentos
268	M384T	branca	0,005	0,005	0,99	N/A	EUR	Análise de fragmentos
270	M382T	branca	0,346	0,004	0,651	N/A	EUR_adAMR	Análise de fragmentos
276	M268T/TN 17S	amarela	0,434	0,103	0,462	N/A	EUR_adAMR	Análise de fragmentos
277	M381T	N/D	0,611	0,009	0,38	N/A	AMR_adEUR	Análise de fragmentos
282	Adamant55	N/D	0,11	0,04	0,84	0,008883	EUR	PDMA
283	Adamant 46	N/D	0,17	0,16	0,67	0,00001	EUR	PDMA
285	TN 15S	N/D	0,003	0,547	0,45	N/A	AFR_adEUR	Análise de fragmentos
287	TN 11S	branca	0,008	0,047	0,945	N/A	EUR	Análise de fragmentos
288	M379T	branca	0,007	0,003	0,99	N/A	EUR	Análise de fragmentos
289	M376T	N/D	0,012	0,01	0,978	N/A	EUR	Análise de fragmentos
292	M373T	N/D	0,004	0,022	0,974	N/A	EUR	Análise de fragmentos

293	M374T	N/D	0,067	0,028	0,906	N/A	EUR	Análise de fragmentos
295	M371T	N/D	0,003	0,642	0,354	N/A	AFR_adEUR	Análise de fragmentos
297	M369T	branca	0,005	0,003	0,992	N/A	EUR	Análise de fragmentos
298	M367T	N/D	0,53	0,019	0,452	N/A	AMR_adEUR	Análise de fragmentos
299	M368T	N/D	0,004	0,004	0,992	N/A	EUR	Análise de fragmentos
300	M360T	branca	0,202	0,005	0,793	N/A	EUR_adAMR	Análise de fragmentos
301	M363T	N/D	0,003	0,016	0,98	N/A	EUR	Análise de fragmentos
302	M362T	N/D	0,021	0,375	0,604	N/A	EUR_adAFR	Análise de fragmentos
304	M361T	N/D	0,003	0,003	0,994	N/A	EUR	Análise de fragmentos
305	M358T	branca	0,002	0,002	0,996	N/A	EUR	Análise de fragmentos
306	TN 12S	branca	0,066	0,025	0,909	N/A	EUR	Análise de fragmentos
307	M269T	N/D	0,031	0,426	0,544	N/A	EUR_adAFR	Análise de fragmentos
309	TN 7S	branca	0,011	0,008	0,982	N/A	EUR	Análise de fragmentos
312	M299	branca	0,002	0,011	0,987	N/A	EUR	Análise de fragmentos
314	M319T	branca	0,008	0,003	0,988	N/A	EUR	Análise de fragmentos
315	M320T	branca	0,016	0,019	0,965	N/A	EUR	Análise de fragmentos
316	TN 24S	N/D	0,003	0,002	0,996	N/A	EUR	Análise de fragmentos
318	M15T	N/D	0,039	0,292	0,669	N/A	EUR_adAFR	Análise de fragmentos

319	TN 25S	branca	0,287	0,003	0,71	N/A	EUR_adAMR	Análise de fragmentos
320	M284T	N/D	0,149	0,021	0,83	N/A	EUR	Análise de fragmentos
321	TN 26S	N/D	0,007	0,007	0,985	N/A	EUR	Análise de fragmentos
322	M316	branca	0,218	0,06	0,722	N/A	EUR_adAMR	Análise de fragmentos
323	M275T-B	N/D	0,002	0,122	0,876	N/A	EUR_adAFR	Análise de fragmentos
324	M283T	N/D	0,113	0,025	0,862	N/A	EUR	Análise de fragmentos
325	TN 23S	N/D	0,005	0,009	0,986	N/A	EUR	Análise de fragmentos
326	M323T	branca	0,491	0,01	0,499	N/A	EUR_adAMR	Análise de fragmentos
328	TN20S	branca	0,002	0,244	0,753	N/A	EUR_adAFR	Análise de fragmentos
329	M313	N/D	0,086	0,003	0,911	N/A	EUR	Análise de fragmentos
330	SG11391	N/D	0,002	0,004	0,994	N/A	EUR	Análise de fragmentos
331	M311T	N/D	0,005	0,006	0,989	N/A	EUR	Análise de fragmentos
332	M322T	amarela	0,6	0,008	0,392	N/A	AMR_adEUR	Análise de fragmentos
333	M278T	amarela	0,52	0,072	0,407	N/A	AMR_adEUR	Análise de fragmentos
334	TN4S	branca	0,466	0,008	0,527	N/A	EUR_adAMR	Análise de fragmentos
335	SG11029	branca	0,002	0,002	0,996	N/A	EUR	Análise de fragmentos
337	MIC228	N/D	0,355	0,018	0,627	N/A	EUR_adAMR	Análise de fragmentos
338	TN 3S	branca	0,003	0,007	0,99	N/A	EUR	Análise de fragmentos

339	TN5S	N/D	0,005	0,004	0,991	N/A	EUR	Análise de fragmentos
340	M310	branca	0,006	0,007	0,987	N/A	EUR	Análise de fragmentos
342	M314	N/D	0,012	0,004	0,984	N/A	EUR	Análise de fragmentos
343	MIC218	N/D	0,015	0,005	0,98	N/A	EUR	Análise de fragmentos
344	M309	N/D	0,04	0,901	0,06	N/A	AFR	Análise de fragmentos
346	M324T	branca	0,004	0,044	0,952	N/A	EUR	Análise de fragmentos
347	MJ2034	branca	0,006	0,299	0,695	N/A	EUR_adAFR	Análise de fragmentos
349	SM95-1T	N/D	0,039	0,008	0,953	N/A	EUR	Análise de fragmentos
350	TN 2S	branca	0,002	0,415	0,583	N/A	EUR_adAFR	Análise de fragmentos
353	M274T -B	branca	0,08	0,072	0,849	N/A	EUR	Análise de fragmentos
354	M356T	N/D	0,007	0,02	0,973	N/A	EUR	Análise de fragmentos
355	M355T	branca	0,002	0,291	0,707	N/A	EUR_adAFR	Análise de fragmentos
356	MIC183	parda	0,112	0,043	0,845	N/A	EUR	Análise de fragmentos
357	MIC144	branca	0,005	0,003	0,992	N/A	EUR	Análise de fragmentos
358	17791/11T/ 11S	branca	0,003	0,057	0,94	N/A	EUR	Análise de fragmentos
359	18030	branca	0,018	0,003	0,979	N/A	EUR	Análise de fragmentos
360	TN 6S	branca	0,002	0,003	0,995	N/A	EUR	Análise de fragmentos
361	53S	branca	0,021	0,166	0,813	N/A	EUR_adAFR	Análise de fragmentos

362	4S	branca	0,034	0,058	0,908	N/A	EUR	Análise de fragmentos
363	4956	branca	0,021	0,235	0,744	N/A	EUR_adAFR	Análise de fragmentos
364	43T/ SM29T	amarela	0,631	0,311	0,058	N/A	EUR	Análise de fragmentos
365	MIC141	N/D	0,278	0,01	0,713	N/A	EUR_adAMR	Análise de fragmentos
366	M214	branca	0,01	0,025	0,966	N/A	EUR	Análise de fragmentos
367	MJ2026	branca	0,011	0,005	0,984	N/A	EUR	Análise de fragmentos
368	26762	N/D	0,075	0,007	0,918	N/A	EUR	Análise de fragmentos
369	M492N	branca	0,059	0,006	0,935	N/A	EUR	Análise de fragmentos
371	M288T	branca	0,011	0,01	0,979	N/A	EUR	Análise de fragmentos
374	TN19S	branca	0,005	0,456	0,539	N/A	EUR_adAFR	Análise de fragmentos
378	M217	parda	0,054	0,013	0,933	N/A	EUR	Análise de fragmentos
379	M348T	branca	0,02	0,026	0,955	N/A	EUR	Análise de fragmentos
381	MIC82-T	N/D	0,007	0,069	0,924	N/A	EUR	Análise de fragmentos
383	MJ2003	branca	0,056	0,016	0,929	N/A	EUR	Análise de fragmentos
384	MJ2021	branca	0,012	0,009	0,979	N/A	EUR	Análise de fragmentos
385	M341T	N/D	0,02	0,02	0,96	N/A	EUR	Análise de fragmentos
387	M346T	branca	0,098	0,032	0,87	N/A	EUR	Análise de fragmentos
388	Adamant60	N/D	0,08	0,21	0,71	0,001986	EUR_adAFR	PDMA

389	MIC68T	branca	0,047	0,017	0,935	N/A	EUR	Análise de fragmentos
392	MJ2014	branca	0,061	0,004	0,935	N/A	EUR	Análise de fragmentos
395	MJ2012	branca	0,007	0,004	0,989	N/A	EUR	Análise de fragmentos
399	37S	branca	0,025	0,041	0,934	N/A	EUR	Análise de fragmentos
400	5228T	N/D	0,002	0,002	0,995	N/A	EUR	Análise de fragmentos