Tauana Rodrigues Nagy

Determinação de mutações somáticas e germinativas em
pacientes pós menopausadas com câncer de mama

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida
Azevedo Koike Folgueira

São Paulo
2018

Tauana Rodrigues Nagy

Determinação de mutações somáticas e germinativas em
pacientes pós menopausadas com câncer de mama

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia
Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida
Azevedo Koike Folgueira

São Paulo
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nagy, Tauana Rodrigues

Determinação de mutações somática e germinativas
em pacientes pós menopausadas com câncer de mama /
Tauana Rodrigues Nagy. -- São Paulo, 2018.

Dissertação (mestrado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientadora: Maria Aparecida Azevedo Koike
Folgueira.

Descritores: 1.Pós-menopausa 2.Mutação em linhagem
germinativa 3.Mutação 4.Neoplasias da mama 5.Análise
de sequência de DNA 6.Genes supressores de tumor

USP/FM/DBD-108/18

Responsável: Kátia Maria Bruno Ferreira - CRB-8/6008

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Maria Aparecida Koike Folgueira pela oportunidade de aprender a fazer ciência pautada pela ética e pela excelência e por sempre me incentivar a aumentar meus horizontes acadêmicos através de sua orientação e paciência. Minha eterna admiração ao seu profissionalismo e dedicação.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas pela oportunidade de realizar este trabalho junto ao Centro Translacional em Oncologia (CTO) do Instituto do Câncer de São Paulo.

As Dras. Maria Lucia Katayama, Rosemeire Roela e, em especial, Simone Maistro por auxiliarem com seus conhecimentos e capacidade de ensinar para realização deste projeto.

A todas as amigas e amigos do CTO (em especial Daniela, Mayara e Samir Andrade) por todos os momentos de ajuda, companhia e compartilhamento de experiências.

Aos amigos Bárbara, Diego, Bruna, Franciele, Julia, Luan, Renan, Henrique e Samir por serem um grande ponto de suporte, sempre prontos para fazer meu dia ser melhor.

Aos meus pais e meu irmão, em especial a minha mãe, por, apesar de todas as circunstâncias, estarem sempre me incentivando a alcançar voos maiores e acreditar nos meus sonhos.

Ao meu marido Felipe, por estar sempre do meu lado e ter continuado ao meu lado mesmo nos momentos mais difíceis.

A todos que me ofereceram palavras de conforto, força ou carinho durante este período.

À CAPES pelo auxílio financeiro pessoal.

Nagy TR. *Determinação de mutações somáticas e germinativas em pacientes pós menopausadas com câncer de mama* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2018.

As maiores taxas de incidência de câncer de mama ocorrem em mulheres idosas, que apresentam tumores com expressão de receptores de estrógeno e/ou progesterona, de baixo estadiamento e menor taxa de proliferação, se comparado com as jovens. Um dos fatores de predisposição ao câncer de mama é mutação germinativa nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, que podem compreender entre 5-10% das pacientes diagnosticadas. A grande maioria dos casos são ditos esporádicos, em que não há como estabelecer um único fator determinante. Dentre o escopo de possíveis causas estão as mutações somáticas, acumuladas no tecido mamário ao longo da vida. A identificação destas mutações permite melhor compreensão da carcinogênese e possibilita a criação de tratamentos cada vez mais personalizados. O gene *PIK3CA*, por exemplo, já está determinado como *driver* (responsáveis pela obtenção de vantagem seletiva de um determinado clone) para câncer de mama. As mutações patogênicas que ocorrem neste gene levam a ativação da via de Akt/mTOR, entre outras, que mantém o ciclo celular ativo. Um gene que vem sendo estudado recentemente é o *PRKD1*, cujas funções parecem estar ligadas à manutenção do fenótipo epitelial das células do tecido mamário. Assim, o objetivo desse trabalho identificar mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, analisando também o histórico familiar para câncer de mama/ovário/próstata, e mutações somáticas no gene *PRKD1* em pacientes pós menopausadas,. Foram incluídas quarenta e nove pacientes diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo em idade superior a 54 anos, que preenchessem critérios da NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) para Síndrome de Câncer de Mama e/ou Ovário Hereditário e tinham disponível um fragmento tumoral emblocado em parafina coletado na ausência de tratamento neo adjuvante. A extração de DNA foi realizada a partir do sangue periférico para sequenciamento de *BRCA1* e *BRCA2*, realizado através da plataforma Ion Torrent™ ou pelo método de Sanger. Os resultados obtidos por Ion Torrent™ foram analisados, primeiramente, através da ferramenta *online Ion Reporter* e os de Sanger através do programa Mutation Surveyor v.3.20. Para a caracterização das variantes encontradas foram utilizados: os bancos de dados BIC, LOVD, LOVD-IARC, UMD e ClinVar além dos preditores *in silico* da conservação dos aminoácidos entre as espécies *Polyphen-2*, *SIF*, *Provean* e *AlignGVGD* e do preditor de efeito no *splicing* *HSF* e bancos de dados de frequência alélica *ExAC*, *1000 genomas* e *NHLBI GO Exome Sequencing Project*, seguindo os critérios da *American College of Medical Genetics and Genomics* em conjunto com a *Association for Molecular Pathology*. Para caracterização de mutação somática do gene *PRKD1* determinou-se duas regiões de maior importância para serem sequenciadas: Ser⁷³⁸/Ser⁷⁴² e Ser⁹¹⁰ que fosforilam o domínio quinase da proteína, ativando-o. Vinte e três amostras tumorais tiveram DNA extraído. Também foi

realizada uma análise das informações sobre *PRKD1* do banco de dados COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) e a construção de curvas de sobrevida (Kaplan-Meier) da expressão de *PRKD1* utilizando a ferramenta *online KM Plotter*. A idade mediana das pacientes foi de 62 anos ao diagnóstico e de 64 anos na época de inclusão no estudo. A maioria tinha tumores de grau histológico II (63,27%), estágio clínico II (20%) e do subtipo luminal B (53,06%). Trinta e duas relataram parentes de primeiro grau afetados com câncer de mama/ovário/próstata. Trinta e oito pacientes tiveram sequenciamento completo de *BRCA1* e *BRCA2* por Ion Torrent™ e onze tiveram sequenciamento parcial de *BRCA1* e *BRCA2* por Sanger. Variantes patogênicas foram encontradas em quatro pacientes (*BRCA1*=2/*BRCA2*=2). Uma nova variante *missense* foi identificada em *BRCA2*: c.3371A>G (p.Q1124R). Para o sequenciamento de *PRKD1* quinze foram sequenciadas para Ser⁹¹⁰ e de oito foi possível analisar o resultado. Nenhuma variante patogênica foi encontrada. Os dados obtidos sobre *PRKD1* no COSMIC foram: de 2773 amostras, em apenas 15 (0,54%) foram identificadas mutações em *PRKD1*, 46% (7/15) provém de mulheres com idade superior a 55 anos e subtipo molecular Luminal. *PRKD1* apresenta maiores frequência de mutação em câncer de intestino grosso (4,22%) e pele (4,02%). As curvas de sobrevida construídas no *KM Plotter* demonstram a alta expressão do gene parece ter impacto positivo na sobrevida das pacientes. Apesar da baixa frequência de mutações no *PRKD1* este gene, outros dados demonstram que parece ter um papel de gene supressor de tumor no câncer de mama, que deve ser inibido de através de outros mecanismos como metilação de DNA.

Descritores: pós menopausa; mutação em linhagem germinativa; mutação; neoplasia de mama; análise de sequência de DNA; genes supressores de tumor

Nagy TR. *Somatic and germline mutations in post menopausal women with breast cancer* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2018.

The highest rates of breast cancer incidence occur in elderly women, who present estrogen and / or progesterone receptor tumors, with a low clinical staging and lower proliferation rate compared to the young women. One of the factors predisposing to breast cancer is germline mutation in the *BRCA1* or *BRCA2* genes, which may comprise between 5-10% of the diagnosed patients. The vast majority of cases are said to be sporadic, in which there is no way to establish a single determining factor. Among the scope of possible causes are somatic mutations, accumulated in the breast tissue throughout life. The identification of these mutations allows a better understanding of carcinogenesis and enables the creation of increasingly personalized treatments. The *PIK3CA* gene, for example, is already determined as a driver (responsible for the selective advantage of a particular clone) for breast cancer. The pathogenic mutations that occur in this gene lead to the activation of Akt / mTOR pathway, among others, which keeps the cell cycle active. One gene that has recently been studied is *PRKD1*, whose functions seem to be linked to the maintenance of the epithelial phenotype of the mammary tissue cells. Thus, the objective of this work was to identify germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes, also analyzing the family history for breast / ovarian / prostate cancer, and somatic mutations in the *PRKD1* gene in postmenopausal patients. Forty-nine patients diagnosed with ipsilateral ductal carcinomas over the age of 54 years who completed NCCN (National Comprehensive Cancer Network) criteria for Breast Cancer and / or Hereditary Ovarian Syndrome and had a tumor paraffin embedded in paraffin collected in the absence of neo adjuvant treatment available. DNA extraction was performed from the peripheral blood for sequencing of *BRCA1* and *BRCA2*, performed through the Ion Torrent™ platform or by the Sanger method. The results obtained by Ion Torrent™ were first analyzed through the online tool Ion Reporter and those by Sanger through the program Mutation Surveyor v.3.20. The BIC, LOVD, LOVD-IARC, UMD and ClinVar databases were used in addition to the in silico predictors of amino acid conservation among Polyphen-2, SIF, Provean and AlignGVGD species and the effect predictor in the HSF splicing and allelic frequency databases ExAC, 1000 genomes and the NHLBI GO Exome Sequencing Project, following the criteria of the American College of Medical Genetics and Genomics in conjunction with the Association for Molecular Pathology. In order to characterize the somatic mutation of the *PRKD1* gene, we determined two regions of greater importance to be sequenced: Ser⁷³⁸ / Ser⁷⁴² and Ser⁹¹⁰ that phosphorylate the protein kinase domain, activating it. Twenty-three tumor samples had DNA extracted. An analysis of *PRKD1* information from the COSMIC (Catalog of

Somatic Mutations in Cancer) database and the construction of survival curves (Kaplan-Meier) for *PRKD1* expression using the online KM Plotter tool was also performed. The median age of the patients was 62 years at diagnosis and 64 years at the time of inclusion in the study. Most of them had tumors of histological grade II (63.27%), clinical stage II (20%) and molecular subtype luminal B (53.06%). Thirty-two reported first-degree relatives affected with breast / ovarian / prostate cancer. Thirty-eight patients had *BRCA1* and *BRCA2* complete sequencing by Ion Torrent [™] and eleven had *BRCA1* and *BRCA2* partial sequencing by Sanger. Pathogenic variants were found in four patients (*BRCA1* = 2 / *BRCA2* = 2). For *PRKD1* sequencing, fifteen patients tumors were sequenced for Ser⁹¹⁰ and in eight samples it was possible to analyze the result. No pathogenic variant was found. The data obtained on *PRKD1* in COSMIC were: from 2773 samples, in only 15 (0.54%) mutations were identified in *PRKD1*, 46% (7/15) came from women aged over 55 years and had tumor molecular subtype Luminal. *PRKD1* shows higher mutation frequency in cancer of the large intestine (4.22%) and skin (4.02%). The survival curves constructed in KM Plotter demonstrate the high expression of the gene seems to have a positive impact on the patients survival. Despite the low frequency of mutations in *PRKD1* gene, other data demonstrate that it appears to play a role of tumor suppressor gene in breast cancer, which must be inhibited by other mechanisms such as DNA methylation.

Descriptors: postmenopause; germ-line mutation; mutation; breast neoplasms; sequence analysis, DNA; genes, tumor suppressor

Esta dissertação ou tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals* Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journal Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2.OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetoivo primário.....	10
2.2 Objetivo ssecundários.....	10
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	11
3.1 Casuística.....	11
3.2 <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	13
3.2.1. Extração de DNA das Células Mononucleares do Sangue Periférico.....	13
3.2.2. Sequenciamento dos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> – Plataforma <i>Ion Torrent</i> .	15
3.2.3.Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sequenciamento de <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	30
3.2.4. MLPA (SALSA® MLPA® P002 <i>BRCA1</i> probemix e SALSA® MLPA® P045 <i>BRCA2/CHEK2</i> probemix, MRC-Holland).....	33
3.3 <i>PRKD1</i>	35
3,3.1. Extração de DNA de Tecido Parafinado para avaliação de mutação somática no gene <i>PRKD1</i>	35
3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sequenciamento do gene <i>PRKD1</i> pelo método de Sanger.....	36
3.3.3. Análise em bancos de dados.....	37
4. RESULTADOS.....	39
4.1 Características Clinicopatológicas.....	39
4.2 Sequenciamento dos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> – Plataforma <i>Ion Torrent™</i> (ThermoFisher Scientific) e Método de Sanger	40
4.3 .MLPA	46
4.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sequenciamento do gene <i>PRKD1</i> pelo método de Sanger.....	46
4.5. Análise de <i>PRKD1</i> em bancos de dados.....	48
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÃO.....	60
7. ANEXOS.....	61
8. REFERÊNCIAS.....	64

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), para 2018-2019 estimou-se que aproximadamente 59.7000 novos casos de câncer de mama serão diagnosticados. Em países desenvolvidos, esse é o segundo tipo de câncer que mais causa morte entre as mulheres, perdendo apenas para o câncer de pulmão (Siegel et al., 2018). Nos Estados Unidos, estimou-se a morte de cerca de 37 mil mulheres com câncer de mama, sendo a maioria (cerca de 22 mil) com mais de 65 anos (DeSantis et al., 2014). Neste grupo etário também ocorrem as maiores taxas de incidência e, com o envelhecimento da população, através da melhoria da qualidade de vida, esta doença se tornou um importante problema de saúde pública (Elomrani F et al, 2015). Segundo Diab et al. (2000) o câncer de mama diagnosticado em mulheres idosas tem características próprias: maior incidência de tumores com expressão de receptores hormonais e, em comparação com pacientes jovens, tumores de baixo estadiamento e taxa de proliferação.

Uma ferramenta de grande importância para avaliação de prognóstico e tratamento do câncer de mama é a classificação, através da expressão gênica, em cinco subtipos moleculares (Perou et al., 2000; Sørlie et al., 2001): a) luminal A, caracterizado pela expressão de receptores de estrógeno e progesterona; b) luminal B, que expressa de receptores de estrógeno e/ou progesterona, de marcadores de proliferação (como Ki-67) e, ocasionalmente, superexpressão de *ERBB2* (Cheang et al., 2009); c) HER-2 positivo, cujo perfil é marcado apenas pela superexpressão de *ERBB2*; d) *basal-like*, no qual é característico o aumento de expressão de citoqueratinas 5 e 17, laminina e proteína de ligação aos ácidos graxos 7 e e) *normal-like* que expressa genes comuns de tecido adiposo e outros de células não epiteliais. Cerca de 70% dos tumores do subtipo *basal-like* correspondem ao subtipo chamado triplo negativo, ou seja, não possuem expressão nem dos receptores hormonais, nem de *ERBB2*. Entretanto, apesar de sua incontestável utilidade para prognóstico e tratamento,

essa ferramenta não é suficiente para a compreensão de toda a complexidade do câncer de mama (Tabela 1).

Tabela 1 - Critérios para classificação nos subtipos moleculares (Coates et al., 2015)

Subtipo Molecular	Receptor Estrógeno (% IHC stained cells)	Receptor Progesterona (% IHC stained cells)	Ki-67 (% IHC stained cells)	Expressão <i>HER2</i> (% IHC stained cells) ^d
Luminal A	≥1	≥1	<14	<10 ^{a,b}
Luminal B	≥1	≥1	≥14 or	>10 ^c
HER2 ⁺	<1	<1	NA	> 10 ^c
TNBC	<1	<1	NA	>10 ^{a,b}

TNBC= triplo negativo

^a marcação de membrana incompleta que é fraca / pouco perceptível e em > 10% das células tumorais invasivas.

^b sem marcação observada ou mancha de membrana incompleta e fraca / pouco perceptível e dentro de ≤10% das células tumorais invasivas.

^c marcação circunferencial que é completa, observada intensamente em uma população homogênea e contígua e em > 10% das células tumorais invasivas.

^d resultados inconclusivos foram confirmados por FISH.

Há o componente hereditário, visto que é estimado na população geral aproximadamente 5-10% dos casos de câncer estejam relacionados a hereditariedade e que cerca de 10-20% das pacientes de câncer de mama ou câncer de ovário tem um parente de primeiro ou segundo grau previamente diagnosticado com a doença (Wooster e Weber, 2003). O principal fator de predisposição genética é a mutação germinativa nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Estes genes, localizados respectivamente no cromossomo 17 e no cromossomo 13, possuem como produto gênico proteínas que agem no reparo de quebras na fita dupla do DNA através de recombinação homóloga. O gene *BRCA1* tem penetrância estimada entre 40-87% para câncer de mama e de 22-65% para câncer de ovário. Mutações deletérias neste gene parecem estar associadas com tumores de mama do subtipo triplo negativo, e câncer de ovário. Para o gene *BRCA2* a penetrância está estabelecida entre 18-88% para câncer de mama e 10-35% para câncer de ovário. Mutações patogênicas estão relacionadas com o desenvolvimento de tumores dos subtipos luminais, bem como carcinoma de

pâncreas, próstata e melanoma (Mavaddat et al., 2012; Mercsh et al., 2015 ; Engel e Fisher, 2015).

No Brasil alguns estudos foram conduzidos para analisar a frequência de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* na população (Lourenço et al., 2004; Dufloth et al., 2005; Gomes et al., 2007; Esteves et al., 2009; Ewald et al., 2011; Dillenburger et al., 2012; Carraro et al., 2013; Felix et al., 2014; Silva et al., 2014; Schayek et al., 2016; Alemar et al., 2016; Fernandes et al., 2016; Maistro et al., 2016; Alemar et al., 2017). Apesar de ainda não haver evidência da existência de uma mutação fundadora brasileira, possivelmente devido a complexa mistura étnica da população, destaca-se a frequência da mutação fundadora c.5266dupin (referida na literatura também como 5382insC) do gene *BRCA1* nas regiões Sudeste e Sul do país. Segundo Hamel et al. (2011), esta variante foi descrita primeiramente como mutação fundadora da população de judeus Ashkenazi e supõe-se que tenha se originado em uma população do norte da Europa. Também encontrada em frequência elevada em pacientes com câncer de mama Rússia, Bielorrússia, Polônia, Letônia, República Tcheca e Grécia (Janavičius, 2010).

Rebbeck et al. (2015), após análise de múltiplos estudos incluindo 19.581 pacientes carreadoras de mutação em *BRCA1* e 11.900 pacientes carreadoras de mutações em *BRCA2*, observaram que mutações no exon 11 de *BRCA1* estão associadas com maior risco para câncer de ovário e que mutações em três regiões estão relacionadas a maior risco de câncer de mama: a) região BCCR1 entre o exon 3 e o exon 7, incluindo uma porção do domínio RING; b) região BCCR2 (exon 13 ao exon 16) e c) região BCCR23 que inclui os domínios BRCT (exon 13 ao exon 19 e exon 20 ao exon 24). No gene *BRCA2* observou-se que duas regiões estão relacionadas à maior risco de câncer ovário: OCCR1 no exon 11 e OCCR2 (exon 11 a exon 15); e 3 regiões estão associadas com risco de câncer de mama: a) região BCCR1 (exon 2 a exon 7); b) região BCCR 13 (exon 09 a exon 10) e c) BCCR2 (exon 14 a exon 22).

Contudo, a maioria dos casos (90-95%) são esporádicos, ou seja, sem associação com hereditariedade.. Acredita-se que estes casos podem ser decorrentes de mutações somáticas no tecido mamário acumuladas ao longo vida da paciente. Essas mutações podem ser devido a mudanças na sequência do DNA, alterações da estrutura da cromatina e da expressão gênica através de mudanças epigenéticas (Vogelstein e Kinzler, 2004; Stratton et al., 2009). Dentre as mutações observadas nas células tumorais, podemos caracterizar as mutações *driver*, ou seja, são responsáveis pela obtenção de vantagem seletiva em um clone e ligadas a oncogênese e as mutações *passenger* que não oferece nenhuma vantagem (Stratton et al, 2009). Partindo dessa ideia, a identificação de mutações somáticas em genes que estejam envolvidos na carcinogênese e progressão tumoral é um dos maiores interesses atuais da pesquisa em câncer, tendo como objetivo melhorar a compreensão dos mecanismos que atuam na transformação da célula normal e a identificação de potenciais alvos de diagnóstico e tratamento.

Em se tratando de câncer de mama, após a realização de estudos em grandes coortes de pacientes, alguns genes são têm alta frequência da mutação no câncer de mama, sugerindo um potencial papel como *cancer driver*: *TP53*, *PIK3CA*, *MYC*, *CCND1*, *PTEN*, *ERBB2*, *ZNF703/FGFR1locus*, *GATA3*, *RB1* e *MAP3K1* (Banerji et al., 2012; Ellis et al., 2012; Stephens et al., 2012; Pereira et al., 2015; Nik-Zainal et al., 2016). Com isso, nos últimos anos, também há uma busca por delinear uma forma de classificação que considere de maneira mais abrangente todos os agentes envolvidos na carcinogênese do câncer de mama. O estudo conduzido pelo *The Cancer Genome Atlas Network* (2012), ao avaliar *arrays* de número de cópias de DNA genômico, metilação de DNA, sequenciamento de exoma, *arrays* de RNA mensageiro, sequenciamento de microRNAs identificou a existência de 10 *clusters* integrativos que evidenciam que a heterogeneidade observada no câncer de mama ocorre dentro do subtipos moleculares já estabelecidos, aumentando as possibilidades de estratificação das

Figura 1. Representação gráfica da possível rede de interação gênica que envolve *PIK3CA* e *PRKD1*, sinalizados pelas flechas em vermelho. (Zanetti, Giselly Encinas. *Determinação de mutações somáticas e germinativas em pacientes jovens com câncer de mama*. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2015.)

O gene *PIK3CA*, localizado no cromossomo 3, codifica uma isoforma da subunidade catalítica da enzima *PI3K* (fosfatidilinositol-3-quinase), envolvida na mediação de diversas funções biológicas. De forma canônica, quando há estimulação dos receptores de membrana por fatores de crescimento, a subunidade catalítica de *PI3K* fica livre da repressão pela subunidade reguladora e converte fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP_2) em inositol trifosfato (IP_3) e, assim, cria um sítio de interação para Akt. A fosforilação do Akt resulta na sua ativação e inicia uma cascata de fosforilação que inclui mTOR (molécula alvo da droga rapamicina). No final, é possível observar o efeito da ativação dessa cascata em diversos eventos biológico. Foi demonstrado que a via encontra-se ativada em múltiplos tipos de câncer, incluindo câncer de mama (Zardavas, Phillips e Loi, 2014).

Figura 2. Esquema ilustrativo da via canônica de *PI3K*. FC: fator de crescimento.

Em metanálise sobre mutações somáticas em câncer de mama conduzida por Encinas et al. (2015), em um total de 1980 pacientes dos 26 estudos selecionados, foi observado que mutações somáticas em *PIK3CA* são mais

frequentes em pacientes mais velhas (idade acima de 35 anos) e com imunohistoquímica positiva para receptor de estrógeno (ER) se comparados com as pacientes jovens (idade abaixo dos 35 anos). As mutações acontecem com maior frequência em pontos específicos: o domínio em hélice codificado pelo exon 9, e o domínio quinase, codificado pelo exon 20. As mutações parecem ter atuações diferentes: se forem localizadas no domínio em hélice parecem atuar de maneira sinérgica com *Ras* para efetuar a transformação celular e também causam quebra da inibição da subunidade reguladora sobre a subunidade catalítica, causando aumento da atividade da proteína. As mutações do domínio quinase dependem da ligação de p85, a subunidade reguladora de *PI3K* (Huang et al., 2007; Chaussade et al., 2009). Os efeitos das mutações parecem associados com ativação de *AKT*, proliferação, resistência a apoptose, aumento de invasão e migração. Contudo, há associação da existência de mutações em *PIK3CA* com bom prognóstico (Cizkova et al., 2012).

Outro gene que em que foram identificada mutação em amostras de câncer de mama das pacientes jovens foi o gene *PRKD1*. Este gene é localizado no cromossomo 14 e membro de uma família de quinases serina/treonina que participam da regulação de uma vasta gama de processos celulares, tais como proliferação e migração celular. Os membros dessa família parecem ter comportamento tecido específico, sendo considerados supressores tumorais em alguns tecidos e oncogenes em outros (Durand et al., 2015). O gene *PRKD1* é altamente expresso e ativo nas células normais do tecido mamário, entretanto, sua expressão parecer ser afetada durante o processo de desenvolvimento do tumor, sendo bastante reduzida ou quase nula em tecido de carcinoma ductal invasivo e linhagem celular com características invasivas. Sua proteína na forma ativa reduz o nível de mRNA de diversas metaloproteinases diminuindo a capacidade de invasão (Eiseler et al., 2009a). *PRKD1* age na regulação da expressão de *CDH1* através de interação do domínio quinase com a *SNAI1* (co-repressor de *CDH1*) na Ser¹¹ causando a sua fosforilação, impedindo a sua interação com Ajuba, outro co-

repressor de *CDH1*, e resulta na expressão normal de E-caderina, suprimindo a transição epitélio-mesênquima no tecido mamário normal (Du et al., 2010; Bastea et al., 2012) (Figura 3). Bastea et al. (2012) observaram que a expressão de uma variante com o domínio quinase inativo era suficiente para o surgimento de um fenótipo EMT-like.

Figura 3. A: mecanismo proposto do funcionamento normal de SNAI1; B: mecanismo proposto de como *PRKD1* funciona como repressor de SNAI1. Modificado de: Bastea et al., 2012. *Protein Kinase D1 Maintains the Epithelial Phenotype by inducing a DNA-Bound, Inactive SNAI1 Transcriptional Repressor Complex.*

Borges et al. (2013) analisaram o estado de metilação do promotor de *PRDK1* (*protein kinase D1*, *PKD*; *PKCM*; *CHDED*; *PRKCM*; *PKC-UM*) e observaram que em amostras de tecido de tumores de pacientes com câncer de mama ductal invasivo ocorre silenciamento epigenético do promotor do gene enquanto em amostras de tecido normal adjacente mesmo fenômeno não foi observado. No mesmo trabalho, foi testado se inibição farmacológica da hipermetilação do promotor utilizando decitabina (droga inibidora de DNA metiltransferases, responsáveis pela metilação de DNA) levava a uma reversão do fenótipo invasivo e o resultado obtido foi: a) em cultura com a linhagem celular MDA-MB-231 observou-se uma significativa diminuição de invasão celular e b) em

modelo ortotópico de câncer de mama em camundongas da linhagem NOD *scid* foi observada inibição de invasão local do tumor e de metástases para o pulmão.

Em resumo, observamos em estudo prévio que pacientes jovens com câncer de mama de subtipo molecular luminal e que não apresentavam mutações germinativas em *BRCA1/BRCA2*, apresentavam mutação no gene *PIK3CA* e em outras quinases que se relacionam com a via de *PI3K*. Assim, nosso objetivo é analisar se em pacientes mais idosas, isto é, pós menopausadas, portadoras de *BRCA1/BRCA2* tipo selvagem também ocorrem mutações em quinases como o *PRKD1*, o que poderia revelar outro caminho de desenvolvimento da doença.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo Primário

Avaliar em amostras tumorais de pacientes pós menopausadas (≥ 55 anos) a presença de mutações do gene *PRKD1*.

2.2. Objetivos Secundários

- Avaliação de história familiar de câncer de mama/ovário destas pacientes;
- Determinar a presença de mutações de linhagem germinativa, nos genes *BRCA1* e *BRCA2* realizando sequenciamento toda região codificadora destes genes;

3.CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

Este estudo integra o projeto “Determinação de Mutações Somáticas e Germinativas em Pacientes Jovens com Câncer de Mama” (nº CEP/FMUSP 397/11). As pacientes pós menopausadas formam o grupo controle comparativo. Estas pacientes estão em acompanhamento no ambulatório de Câncer Hereditário ou ambulatório de Oncologia Clínica – Mama do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). Os critérios de inclusão das pacientes foram: 1) diagnóstico histopatológico de câncer do tipo carcinoma ductal com idade superior a 54 anos; 2) preencher ao menos um dos critérios da *NCCN* (*National Comprehensive Cancer Network*) para Síndrome de Câncer de Mama e/ou Ovário Hereditário (Tabela 2); 3) ter disponível um fragmento tumoral emblocado em parafina coletado na ausência de tratamento neo adjuvante; 4) responder questionário de antecedentes pessoais e hábitos, e 5) assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Tabela 2 - Critérios NCCN para teste genético – Síndrome Hereditária de Mama e/ou Ovário

-
1. Indivíduo de família portadora de mutação deletéria conhecida nos genes *BRCA1* e *BRCA2*
 2. História pessoal de câncer de mama + uma ou mais características abaixo:
 - câncer de mama com ≤ 60 anos triplo negativo
 - diagnóstico em qualquer idade:
 - a) com ≥ 1 parente^a com câncer de mama diagnosticado ≤ 50 anos
 - b) com ≥ 2 parentes^a com câncer de mama em qualquer idade
 - c) com ≥ 1 parente^a com câncer epitelial de ovário
 - d) com ≥ 2 parentes com câncer de pâncreas e/ou câncer de próstata (Gleason score ≥ 7) em qualquer idade
 - e) parente^a masculino com câncer de mama
 3. História pessoal de câncer de ovário epitelial
 4. História pessoal de câncer de pâncreas em qualquer idade com ≥ 2 parentes^a com câncer de mama e/ou ovário e/ou pâncreas ou câncer agressivo de próstata (Gleason score ≥ 7) em qualquer idade
-

^aConsiderar parentes de primeiro, segundo e terceiro grau.

Traduzido de: NCCN: Genetic/Familial high-risk assessment: breast and ovarian version 2.2014.

Todas as pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram contatadas via telefone e convidadas a participar da pesquisa. Para aquelas que aceitaram participar, foi agendada uma consulta com data e horário marcado, onde foi explicado novamente os objetivos do estudo. Então, foi entregue o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), elaborado para o projeto “Determinação de Mutações Somáticas e Germinativas em Pacientes Jovens com Câncer de Mama”, contendo as informações sobre todos métodos que serão relatados adiante. Ao assinarem o TCLE responderam, logo em seguida, o questionário de Antecedentes Pessoais e Hábitos.

O questionário abordou questões referentes à ancestralidade, história menstrual e obstétrica, hábitos como uso de álcool e tabaco, local de moradia,

história de doenças prévias. Após a consulta, a paciente foi encaminhada para a coleta de sangue.

3.2. *BRCA1* e *BRCA2*

3.2.1. Extração de DNA das Células Mononucleares do Sangue Periférico

Para cada paciente, foi coletado, por meio de punção da veia do antebraço, três tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) de 2 ml cada. As amostras foram transportadas para o laboratório em caixa de isopor com gelo e posteriormente processadas.

O DNA foi extraído das células mononucleares do sangue periférico por meio do *Illustra Blond GenomicPreo Mini Spin Kit* (GE/28-9042-65), seguindo as orientações do fabricante. As amostras foram transferidas para tubos falcon de 15 ml e adicionado *RBC Lysis Buffer* em uma proporção de três vezes o volume da amostra de sangue inicial. Foi misturado por inversão várias vezes e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 500 g por 2 minutos onde foi descartado o sobrenadante. Para ressuspender as células brancas, foi adicionadas 100-150 µl de PBS para aumentar o volume do pellet e agitado com ajuda de vortéx por 1 minuto. As amostras foram transferidas a tubos de 2 ml e adicionado 20 µl de Proteinase K, realização de digestão proteolítica, e 400 µl de *Lysis Buffer Type 10*, formado por detergente e sais caotrópicos que lisam os leucócitos ao romper a estrutura da membrana celular (através da criação de um ambiente menos hidrofílico e enfraquecendo interações hidrofóbicas) e promovem um ambiente desnaturante e com uma alta concentração de sal que causa a ligação do DNA a membrana de sílica, onde foram misturados com ajuda de vortéx por 15 segundos.

Por fim, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Para ligação do DNA genômico a membrana da coluna, as amostras foram aplicadas na coluna, centrifugadas a 11.000 g por 1 minuto e descartado o

conteúdo do tubo coletor. Para lavagem das amostras, foram adicionados 500 µl de *Lysis Buffer Type 10* na coluna, centrifugado a 11.000 g por 1 minuto e descartado o conteúdo do tubo coletor. Para lavagem e secagem das amostras, foram adicionados 500µl de *Wash Buffer Type 6* na coluna, centrifugado a 11.000 g por 3 minutos e descartado o tubo coletor juntamente com seu conteúdo. Para a eluição do DNA, as colunas foram transferidas para tubos de 1,5 ml DNase-free, adicionado 70 µl de água livre de DNase no centro da coluna, para rehidratação do DNA, o que permite que ele se solte da membrana de sílica, incubado a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado a 11.000 g por 1 minuto. As colunas foram removidas e as amostras foram armazenadas a -20°C. Ao final da extração de DNA de sangue periférico utilizando o *kit Illustra Blood GenomicPrep Mini Spin* há pelo menos três tubos contendo DNA da mesma paciente.

Após a extração foi realizada a quantificação em espectrofotômetro (*NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1*, Labtrade). Após a conclusão do procedimento de inicialização, a água usada para eluição do DNA foi pipetada no leitor, para realizar a leitura da absorbância do branco e calibração do equipamento. Após a conclusão da leitura do branco, foram realizadas as leituras das absorbâncias das amostras. A concentração (fornecida em ng/µl), a relação 260 nm/280 nm (relação DNA x proteína) e a relação 260 nm/230 nm (relação DNA x sais e outros solventes) foram anotadas.

Uma alíquota do produto (3 µl) foi avaliada qualitativamente por gel de agarose diluída a 0,8% em TBE e corado com GelRed™ (Biotium), que se intercala ao DNA e pode ser observado sob luz ultravioleta. Após a polimerização do gel, as amostras foram preparadas com o corante xileno-cianol 1X e aplicadas no gel. A visualização da banda única permite avaliar a qualidade do DNA recém extraído.

3.2.2 Sequenciamento dos genes *BRCA1* e *BRCA2* – Plataforma *Ion Torrent™* (*ThermoFisher Scientific*)

O sequenciamento de *BRCA1* e *BRCA2* na plataforma *Ion Torrent™* (*ThermoFisher Scientific*) inicia-se com a quantificação das amostras no aparelho *Qubit® 3.0 Fluorometer* (*ThermoFisher Scientific*), utilizando o *kit Qubit™ dsDNA Assay BR*. Cada microtubo de 0.5 mL *Qubit® assay tubes* utilizado deve constar identificação da amostra escrita na tampa. A solução de uso para a leitura é preparada através da diluição de *Qubit® dsDNA BR Reagent* (contendo os corantes que emitem fluorescência quando ligados ao DNA) em *Qubit® dsDNA BR Buffer* na concentração de 1:200 e adicionada 190 µl em cada um dos microtubos destinados para os padrões e 198 µl da solução em cada um dos tubos destinados para as amostras. No microtubo identificado como “padrão” foi adicionado 10 µl de cada padrão e misturado à solução de uso com auxílio de vórtex por 2-3 segundos, tomando cuidado para não ocorrer formação de bolhas. Nos microtubos destinado a amostras foi adicionado 2 µl de cada amostra, misturando com a solução de uso com auxílio de vórtex por 2-3, tendo a mesma precaução com a formação de bolhas. Todos os microtubos foram incubados a temperatura de 22°C por 2 minutos. Na tela inicial do aparelho *Qubit® 3.0 Fluorometer* (*ThermoFisher Scientific*) foi selecionado *DNA* como tipo de amostra e em seguida *dsDNA Broad Range* como ensaio a ser realizado. A próxima tela mostrada pelo aparelho mostrou o botão *Read Standards*, que foi selecionado para realizar as leituras da concentração dos padrões. O microtubo identificado como Padrão 01 foi inserido na câmara interna do aparelho e a tampa do aparelho foi fechada, pressionando a opção *Read Standard*. Após a leitura o tubo foi retirado e foi realizado o mesmo procedimento para o Padrão 02. Ao final da leitura dos padrões, foi iniciada a leitura das amostras, pressionando a opção *Run samples* e informando: o volume de amostra contido nos microtubos e a unidade de concentração no qual o aparelho deveria dar os resultados. Cada microtubo correspondente a cada amostra foi inserido na câmara interna do aparelho,

obtendo-se a concentração de DNA. Ao final do procedimento, todas as amostras foram diluídas com água ultrapura para obter concentração final de 10 ng/μl.

O preparo da molécula de DNA para a realização da técnica de sequenciamento inicia-se com a amplificação da região alvo. Em 3 microtubos de 0,2 mL identificados como A, B, e C foi adicionado 2 μl de 5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix (contendo dNTPs, tampão, DNA polimerase), 5 μl do pool de primer respectivo (A,B ou C) e 3 μl do DNA genômico com concentração 10 ng/μl, utilizando a pipeta para homogeneizar. As amostras foram submetidas à seguinte variação de temperatura: um ciclo de 99°C por 2 minutos e 19 ciclos de 99°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. O conteúdo dos três microtubos distintos foi misturado em um único microtubo e a mistura foi homogeneizada com a própria pipeta

A etapa seguinte é a construção das bibliotecas, ligando o DNA aos *barcodes* (marcadores para permitir a identificação da amostra de cada paciente) e adaptadores (local de reconhecimento para ligação do amplicon na micropartícula). Da mistura dos pools de primers foi retirada uma alíquota de 20 μl, transferida para um tubo de 0,2 mL limpo e identificado e foi adicionado 2 μl da enzima FuPa (que faz a digestão parcial dos primers e fornece o fosfato necessário para que a DNA ligase faça a ligação dos adaptadores e barcodes) e homogeneizado com auxílio de vórtex. As amostras foram submetidas ao seguinte programa de variação térmica: um ciclo 50°C por 10 minutos, 55°C por 10 minutos, 60°C por 20 minutos e 10°C por até uma hora (se necessário). Ao final do programa foi adicionado aos microtubos: 2 μl do mix de barcodes diluídos e adaptadores A e P1, homogeneizado com auxílio de vórtex e centrifugado por 2 segundos. As amostras foram submetidas novamente a variação térmica: 22°C por 30 minutos, 72°C por 10 minutos e 10°C por até 01 hora. Ao final do programa é possível guardar as amostras em temperatura -20°C ou seguir com o protocolo.

A biblioteca de DNA passou por um processo de purificação para retirada dos reagentes do processo anterior, que estão em excesso, antes do processo de

equalização, conforme descrito a seguir. O procedimento se dá com o uso do reagente Agencourt® AMPure® XP (*Beckam Coulter*) que deve ser retirado antecipadamente da geladeira e homogeneizado com auxílio de vórtex para dispersão das *beads* antes do uso. Neste reagente há *beads* magnéticas e um buffer que seletivamente favorece a ligação de fragmentos de DNA às *beads*, permitindo que o excesso de primers, nucleotídeos, sais e enzima sejam removidos. Também foi preparado de forma prévia álcool 70%, assim como a identificação de microtubos de 1,5 mL DNA *LoBind* (*Eppendorf*). Nestes tubos foram adicionados 45 µl do reagente Agencourt® AMPure® XP e 30 µl da biblioteca. A mistura foi homogeneizada com a própria pipeta e em seguida, os tubos foram posicionados em estante magnética, por 2 minutos para reter *beads* ligados aos fragmentos de DNA correspondentes aos amplicons de *BRCA1/BRCA2*. O sobrenadante foi retirado e foi adicionado 500 µl de etanol 70% e os microtubos colocados na estante magnética foram girados em 180°, com rapidez para que as *beads* passassem através do álcool, realizando uma lavagem. Os microtubos foram girados novamente em 180°, completando 360°. O sobrenadante foi novamente retirado e novamente foi adicionado 500 µl de etanol 70%, realizando o mesmo procedimento descrito anteriormente. O sobrenadante foi novamente retirado e os microtubos foram brevemente centrifugados e colocados na estante magnética para retirada do excesso de etanol. Os microtubos foram deixados abertos para evaporação de qualquer resíduo de álcool, tomando o cuidado para que não ocorresse a secagem em excesso.

Segue-se para a etapa de equalização das amostras, com a finalidade de normalizar concentração da biblioteca de fragmentos de DNA para 100 pM. Os microtubos foram identificados para cada amostra e foram adicionados 2 µl de *Equalizer™ Primers* no fundo do tubo. Os microtubos foram retirados da estante magnética e foi adicionado 50 µl de Platinum® PCR SuperMix High Fidelity (contendo dNTPs, tampão, DNA polimerase), sendo homogeneizados com o uso da própria pipeta. Todo o volume foi transferido para os microtubos contendo o *Equalizer™ Primers* e a solução foi homogeneizada com auxílio de vórtex e

brevemente centrifugada. As amostras foram submetidas ao seguinte programa: um ciclo de 98°C por dois minutos e 10 ciclos de 98°C por 15 segundos e 64°C por 1 minuto. Enquanto as amostras estão no termociclador as *Equalizer™ Beads*, que possibilitam a captura de 100 pM, devem ser retiradas da geladeira e lavadas em um microtubo 1,5 mL DNA LoBind (*Eppendorf*) utilizando 30 µl de *Equalizer™ Beads* e 60 µl de *Equalizer™ Wash Buffer*, misturando com auxílio da pipeta. O tubo foi colocado em estante magnética por 3 minutos ou até que a solução ficasse clara. O sobrenadante foi retirado com cuidado, evitando contato com o precipitado. O microtubo foi retirado da estante e foi adicionado 66 µl de *Equalizer™ Wash Buffer*, homogeneizando a mistura com a própria pipeta. Essa mistura foi distribuída de forma que cada microtubo de 1,5 mL DNA LoBind (*Eppendorf*) identificado contivesse 6 µl. Nos microtubos que estavam no termociclador foi adicionado 10 µl do *Equalizer™ Capture*. A solução foi ressuspensa com a própria pipeta e incubada por 5 minutos. O conteúdo desses microtubos foi transferido para os microtubos contendo as *Equalizer™ Beads* e o *Equalizer™ Wash Buffer* e ressuspensa com o uso da pipeta e incubado por 5 minutos. Os microtubos foram colocados na estante magnética novamente por 2 minutos ou até que a solução ficasse clara. O sobrenadante foi removido e descartado com cuidado, evitando contato da ponteira da pipeta com o precipitado. Foi adicionado 200 µl de *Equalizer™ Wash Buffer* e os microtubos foram girados em 180°, com rapidez para que as *beads* passassem através do *buffer* e depois novamente em 180°, completando 360°. Houve remoção e descarte do sobrenadante, evitando contato com o precipitado. Esse procedimento foi repetido mais uma vez, seguido de centrifugação para auxiliar na remoção de excessos. Após um minuto, foi adicionado 100 µl *Equalizer™ Elution Buffer* e homogeneizado com auxílio de vórtex. A solução foi incubada por 5 minutos a 32°C e os microtubos foram colocados novamente na estante magnética por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e armazenado em microtubo de 0,2 mL previamente identificado para cada amostra.

As bibliotecas equalizadas seguiram para a realização da PCR em emulsão, processo em que os fragmentos de DNA são ligados em micropartículas e amplificados com uso do *kit Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit (A27739, Thermofisher Scientific)*, conforme a seguir. Em um microtubo 1,5 mL *DNA LoBind (Eppendorf)* foi adicionado 5 µl de cada biblioteca equalizada e foi realizada homogeneização da mistura com auxílio de vórtex e centrifugação breve. Foram transferidas 10 amostras de pacientes diferentes, usando a capacidade máxima do *chip*. Da mistura de bibliotecas foram transferidos 3 µl para um microtubo de 0,2 mL limpo e identificado seguido da adição de 22 µl de água ultrapura. Os reagentes *Ion PGM™ Hi-Q™ Reagent Mix* e *Ion PGM™ Hi-Q™ ISPs* (as micropartículas nas quais os amplicons vão se ligar para serem amplificados) foram homogeneizados com auxílio de vórtex por 30 segundos e 1 minuto, respectivamente, antes do uso. No tubo que contém o *Ion PGM™ Hi-Q™ Reagent Mix* foi adicionado 25 µl de água, 50 µl de *Ion PGM™ Hi-Q™ Enzyme Mix*, 25 µl do pool de bibliotecas e 100 µl da o *Ion PGM™ Hi-Q™ ISPs* e a solução foi homogeneizada com auxílio de vórtex por 5 segundos. Foram coletados 1000 µl da mistura e a ponteira foi encaixada no orifício mais afastado do *Ion OneTouch™ Reaction Filter* (Figura 4). Foi adicionado, encaixando a ponteira no mesmo orifício, 850 µl de *Ion OneTouch™ Reaction Oil* por 2 vezes, trocando as ponteiras. O tubo foi colocado invertido no aparelho *Ion OneTouch™ 2 Instrument* (Figura 5). Foram adicionados 150 µl de *Ion OneTouch™ Breaking Solution*, responsável por quebrar as micelas ao final da PCR e liberar as micropartículas, em dois *Ion OneTouch™ Recovery Tubes* (tubos específicos que recebem as amostras ao final da reação de PCR em emulsão). Os *Ion OneTouch™ Recovery Tubes* são conectados pelo *Ion OneTouch™ Recovery Router* e inseridos na centrífuga do *Ion OneTouch™ 2 Instrument* (Figura 5). Ao ligar o aparelho foi selecionada a opção *Run* e no menu seguinte a opção *PGM: Ion PGM™ Hi-Q™ OT2 Kit – 200*. Na próxima tela foi selecionado o modo *Assisted*, no qual o aparelho guia o usuário em um passo-a-passo do que deve ser realizado para iniciação da PCR. As amostras podem ser retiradas do aparelho em um período de até 16 horas após o final da reação, sempre centrifugando antes da retirada no próprio aparelho, apertando a opção

Open Lid na tela do aparelho. O *Ion OneTouch™ Recovery Router* foi descartado e os dois *Ion OneTouch™ Recovery Tubes* foram removidos do aparelho e colocados em estante normal para microtubos. A solução contida no interior dos tubos foi todo retirado, fazendo-se movimentos circulares com a pipeta, até que restassem 100 µl. Essa medida foi realizada utilizando-se um microtubo de 1,5 mL contendo 100 µl de água e comparando com o conteúdo no *Ion OneTouch™ Recovery Tubes*. A solução foi ressuspendida com o auxílio de ponteira nova, até a dispersão do precipitado formado no fundo do tubo. Em cada *Ion OneTouch™ Recovery Tubes* foi adicionado 500 µl de *Ion OneTouch™ Wash Solution* e homogeneizado com a própria pipeta. Ambas as suspensões foram transferidas para um microtubo 1,5 mL *DNA LoBind (Eppendorf)* limpo e identificado e centrifugadas a 15.500g por 2 minutos e 30 segundos. Ao final da centrifugação o sobrenadante foi retirado de forma cuidadosa, com a ponteira posicionada no lado oposto ao do precipitado, deixando 100 µl no tubo, que será utilizado no próximo procedimento.

Figura 4. Imagem ilustrativa do *Ion OneTouch™ Reaction Filter*, destacando o orifício de entrada onde a mistura, formada por *Ion PGM™ Hi-Q™ ISPs* e os fragmentos de DNA, é depositada.

Figura 5. Imagem ilustrativa do aparelho *Ion OneTouch™ 2 Instrument*, realçando: a) espaço de encaixe do *Ion OneTouch™ Reaction Filter* e b) centrífuga que recebe os *Ion OneTouch™ Recovery Tubes* (onde ocorre a quebra das micelas para recuperação dos fragmentos de DNA e das *Ion PGM™ Hi-Q™ ISPs*) e o *Ion OneTouch™ Recovery Router* (haste que conecta os *Ion OneTouch™ Recovery Tubes*).
Fonte: ThermoFisher Scientific

O próximo procedimento é o enriquecimento para DNA alvo, onde são descartadas as micropartículas nas quais não houve ligação de amplicons e consequentemente não houve amplificação. Primeiramente, foi preparada a solução *Melt Off* em microtubo 1.5 mL utilizando 280 µl da solução Tween® e 40 µl de NaOH 1M recém preparado. Depois foram preparadas as *Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads* conforme o seguinte: a) as *Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads* foram ressuspensas com o uso de vórtex por 30 segundos, seguido de centrifugação por 2 segundos; b) foram transferidos 13 µl de *Dynabeads® MyOne™ Streptavidin C1 Beads* para um microtubo 1,5 mL *DNA LoBind (Eppendorf)* limpo; c) o tubo foi colocado em estante magnética por 2 minutos e o sobrenadante foi removido e descartado com cuidado para não mexer

no precipitado e d) o tubo foi retirado da estante magnética e foi adicionado 130 µl de *MyOne™ Beads Wash Solution*, homogeneizado com auxílio de vórtex e centrifugado por 2 segundos. Foi utilizado um *strip* para preparo das amostras (Figura 6) disponível no *Ion OneTouch™ ES Supplies Kit* e seus poços foram preenchidos conforme a ordem: poço 2 – 130 µl da solução contendo as *beads*, previamente ressuspensas; poço 3,4,5 - 300 µL de *Ion OneTouch™ Wash Solution*; poço 6- vazio; poço 7 - 300 µL da solução *Melt Off* e poço 1 – amostra, previamente ressuspensa com auxílio da pipeta. Do poço contendo amostra foram retirados 2 µl para realização de controle de qualidade das micropartículas. O *strip* foi posicionado na bandeja do aparelho *Ion OneTouch™ ES* (Figura 7) e uma ponteira limpa foi posicionada no braço mecânico do aparelho (Figura 6) com auxílio do suporte *Tip Loader*. A seguir foram adicionadas 10 µL de *Neutralization Solution* em um microtubo de 0,2 mL que foi encaixado aberto próximo a base do *Tip Loader*. O aparelho *Ion OneTouch™ ES* foi inicializado e na sua tela apareceu *rdy*, sendo selecionada a opção *Start/Stop* e o processo se iniciou, com mudança para *run* na tela do aparelho e durou cerca de 40 minutos.

Figura 6. *Strip* contendo as diferentes soluções a serem utilizadas no aparelho *Ion OneTouch™ ES* para enriquecimento das amostras.

Fonte: Ion PI™ Template OT2 200 Kit v2. User Guide (Pub. no. MAN0007624 Rev. 2.0)

Figura 7. Imagem ilustrativa do aparelho *Ion OneTouch™ ES*, destacando: a) bandeja de encaixe do *strip*; b) local de encaixe do microtubo de 0,2 mL com *Neutralization Solution* e c) *Tip Loader*. Aparelho utilizado para realização de enriquecimento em DNA alvo, com eliminação das micropartículas nas quais não ocorreu amplificação de nenhum fragmento.

Fonte: https://americanlaboratorytrading.com/lab-equipment-products/life-technologies-inc.-ion-torrent-ion-onetouch-2-system-with-es_12429

Para realização do controle de qualidade das micropartículas que foram usadas no sequenciamento foi utilizado o *Ion Sphere™ Quality Control Kit*. Na alíquota de 2 µl retirada da amostra no momento da montagem da sequência de enriquecimento, foram adicionados 19 µL de *Annealing Buffer* e 1 µL de *Ion Probes*. A solução foi submetida a variação térmica de 95°C por 2 minutos e 37°C

por 2 minutos e ao final, após a retirada do tubo do termociclador, foi adicionado 200 µL de *Quality Control Wash Buffer*. A mistura foi homogeneizada com auxílio de vórtex e centrifugada a 15.500g por 1 minuto e 30 segundos. Houve descarte do sobrenadante, com cuidado para não perturbar o precipitado, deixando 10 µl com auxílio de tubo de referência. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes e na última vez foi adicionado 190 µL de *Quality Control Wash Buffer* ao microtubo contendo a amostra e em outro microtubo foi adicionado apenas 200 µL de *Quality Control Wash Buffer*. A leitura da quantidade de micropartículas contendo amplicons foi realizada no *Qubit® Fluorometer*, selecionando a opção *Ion Sphere™ Assay*, sendo que primeiramente foi feita a leitura do tubo que continha apenas o *Quality Control Wash Buffer*. Os resultados da leitura da quantidade de micropartículas contendo amplicons foram colocados na planilha de Microsoft™ Excel™ nomeada *Qubit Easy Calculator*, disponibilizada na *Ion Community*. A porcentagem de micropartículas contendo amplicons deve ser 10-30%.

Ao final do processo de enriquecimento as amostras estão prontas para a realização do sequenciamento. O primeiro passo a ser feito é o planejamento da corrida. Na rede de Internet no qual o *Ion PGM™ Sequencer* está conectado, o *Ion Torrent Browser* foi inicializado para que o *Ion Torrent Server* se conectasse ao sequenciador. No *Ion Torrent Browser* foi selecionada a aba *Plan* e em seguida a opção *Templates*. Nesta seção foi selecionada a aplicação *AmpliSeq DNA* do sequenciamento e em seguida a opção *Plan New Run*, utilizando um *template* genérico para a aplicação desejada. As informações da corrida foram editadas e revisadas em todas as abas e salvas ao clicar *Plan Run*. Antes do processo de inicialização do aparelho as soluções estoque para as DNTPs foram retiradas do *freezer* e foi verificada se a pressão do tanque de gás nitrogênio ligado ao aparelho era de 500 psi. Também foram preparadas as garrafas que contêm as substâncias que fazem a lavagem do *chip* durante o sequenciamento (Figura 8), conforme o seguinte: a) a garrafa identificada como *Wash W2* (2L) foi lavada três vezes com água 18 MΩ e as garrafas identificadas como *Wash W1* e *Wash W3*

com 50 mL de água 18 MΩ; b) foi preparado 1000 µl de NaOH 100 mM, diluindo 100 µl de NaOH 1M em 900 µl de água livre de nucleasse; c) a garrafa *Wash W2* foi preenchida com água 18 MΩ até a linha modelo, assim como foi adicionada toda a solução *Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing W2 Solution* e 100 µl de NaOH 100 mM e a garrafa foi fechada e invertida diversas vezes para homogeneizar a mistura; d) a garrafa identificada como *Wash W1* foi preenchida com 350 µl de NaOH 100 mM e imediatamente tampada e e) a garrafa identificada como *Wash W3* foi preenchida com 50 mL de *Ion PGM™ Sequencing W3 Solution* e fechada. O aparelho foi inicializado, ligando-o e selecionando a opção *Initialize* no menu principal. Na próxima tela foi selecionada a opção *Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Kit* (utilizado para preparo das amostras). O sistema faz uma checagem da pressão do nitrogênio e pede a confirmação de que o *Ion 314™ Chip*, os canudos e os recipientes de coleta estão nos lugares corretos. Após a confirmação, o operador do aparelho trocou de luvas e trocou o canudo da tampa na posição *W2*, tomando cuidado para que o canudo não entrasse em contato com nenhuma superfície, e afixou a garrafa identificada como *W2* na posição, fechando-a com tampa que possui o canudo. Novamente o operador trocou de luva e repetiu o mesmo procedimento com as garrafas *W1* e *W3*. O sequenciador, então, faz um ajuste do pH da solução que está na garrafa *W2*, que dura cerca de 30 minutos. Enquanto isso foi realizada o preparo das DNTPs em tubos de 50 mL do tipo Falcon providos pelo fabricante do aparelho, identificados com etiquetas (dGTP, dCTP, dATP e dTTP). A solução estoque de cada DNTP foi homogeneizada com auxílio de vórtex, centrifugada brevemente e 20 µl de cada DNTP foi transferido para o respectivo tubo Falcon. Os tubos foram fechados e guardados para uso posterior. Depois da inicialização com as soluções de lavagem ter finalizada o operador do aparelho trocou de luva, os canudos de DNTP foram trocados e os tubos contendo as DNTPs foram afixados de maneira firme, seguindo as instruções do aparelho. O aparelho faz a medição de pH de todos os reagentes e se todos estiverem com o pH correto aparece uma tela verde com a palavra *Passed* e o processo de inicialização foi finalizado e seguiu-se para a realização do protocolo de sequenciamento.

Figura 8. Imagem ilustrativa do aparelho *Ion PGM™ Sequencer*, onde ocorre a reação de sequenciamento.
 Fonte: ThermoFisher Scientific

As amostras passaram por uma etapa de preparação antes de serem carregadas no *Ion 314™ Chip* (Figura 9). As *Control Ion Sphere™ Particles* (controle para o sistema, livre de ligantes, como referência de *background*) foram retiradas do *freezer*, homogeneizadas com uso do vórtex e centrifugadas brevemente, sendo 5 µl adicionados à amostra enriquecida. A mistura foi homogeneizada com auxílio da pipeta para 200 µl, centrifugada por 2 minutos a 15.500 g com o microtubo posicionado na centrífuga de forma que o precipitado se forme na parede oposta a da tampa do microtubo. O sobrenadante foi descartado, evitando contato com o precipitado, deixando cerca de 15 µl, usando um tubo de referência visual. O *Ion Sequencing Primer* também foi retirado do *freezer*, homogeneizado com auxílio de vórtex por 5 segundos, centrifugado por 3 segundos e adicionado 12 µl na amostra. A mistura foi homogeneizada com auxílio da pipeta e o microtubo foi submetido a seguinte variação de temperatura: 95°C por 2 minutos e 37°C por 2 minutos.

Figura 9 Imagem ilustrativa do *Ion 314™ Chip*, que é preenchido com amostra de DNA acoplado a *Ion PGM™ Hi-Q™ ISPs*, destacando-se o orifício de carregamento de amostras.

Fonte ThermoFisher Scientific

O *Ion 314™ Chip* passou por um processo de checagem pelo aparelho antes do carregamento da amostra em seu interior. No menu principal da tela do *Ion PGM™ Sequencer*, foi selecionado o botão *Run* e a garrafa de descarte foi esvaziada (Figura 8). Quando foi solicitado o uso de um chip, foi utilizado o mesmo que da inicialização e o aparelho realizou a limpeza as linhas de fluído. Quando foi solicitado, foi selecionado o aparelho usado para o enriquecimento da amostra. Foi necessário tirar as luvas e passar a mão no bloco metalizado presente no sequenciador, para remover a estática das mãos. Um *Ion 314™ Chip* novo foi retirado do seu pacote e foi identificado o experimento realizado. O *chip* que estava no aparelho foi trocado pelo *chip* novo. Quando solicitado foi usado o *scanner* para ler o código de barras que estava no pacote do *Ion 314™ Chip*. Foi selecionada a opção *Chip Check* e ao final do procedimento, a garrafa de descarte foi esvaziada e foi selecionado *Waste bottle is empty*.

Depois da checagem do *Ion 314™ Chip* e do preparo da amostra, ocorreu o carregamento da amostra no chip. O processo começa com a adição de 3 µl de

Ion PGM™ Hi-Q™ Sequencing Polymerase à amostra seguido de homogeneização com auxílio da pipeta de 20 µl cerca de 30 vezes e incubação por 5 minutos. Ao final da checagem do *Ion 314™ Chip* remover do sequenciador e colocando o *chip* usado na inicialização. O *Ion 314™ Chip* novo foi inclinado em um ângulo de 45° para que o orifício de carregamento fosse o orifício mais baixo (Figura 9). A ponteira foi inserida firmemente no orifício de carregamento para remover a maior quantidade de líquido possível, proveniente do processo de checagem, descartando-o. O *Ion 314™ Chip* foi inserido com o orifício de carregamento em contato com a caçapa de centrifugação e colocar a caçapa na centrífuga com a aba do *chip* na direção do rotor da centrífuga (Figura 10) e foi centrifugado por 5 minutos para retirada de todo o líquido. O *chip* foi retirado da caçapa que foi limpa com um papel absorvente e novamente o *chip* foi inserido com a parte de trás em contato com a caçapa. A caçapa foi apoiada sobre a bancada e 10 µl da amostra foram inseridos no orifício de carregamento do *Ion 314™ Chip*: com a ponteira firmemente inserida no orifício de carregamento, o botão de pipetagem foi apertado e depois o botão de ajuste de volume foi lentamente girado. Para evitar bolhas no interior do *chip*, foi deixada uma pequena quantidade da amostra na ponteira. Excesso de líquido foi retirado e descartado, usando o outro orifício do *chip* e foi realizada centrifugação do *Ion 314™ Chip* com a sua aba voltada na direção do rotor da centrífuga por 30 segundos e depois com a aba voltada na direção da tampa da centrífuga por 30 segundos. O *Ion 314™ Chip* foi retirado da caçapa e colocado sobre a bancada. Uma pipetada foi acertada para o volume de 5 µl e o *Ion 314™ Chip* foi inclinado novamente a 45°. A ponteira foi inserida no orifício de carregamento e a amostra foi pipetada e depois depositada novamente no *Ion 314™ Chip*, pipetando devagar para evitar bolhas. Excesso de líquido foi reitrado e o *Ion 314™ Chip* foi centrifugado novamente com o orifício de carregamento em contato com a caçapa de centrifugação por 5 segundos. Qualquer excesso de líquido ainda presente no chip foi removido e descartado.

Figura 10. Imagem ilustrativa da *Ion Chip™ Minifuge*, a centrífuga utilizada para ajudar a preencher todo o espaço do *Ion 314™ Chip* com a amostra.
Fote ThermoFisher Scientific

Ao final do procedimento para carregamento do *Ion 314™ Chip* foi selecionado *Next* na tela do aparelho e a corrida foi inicializada imediatamente. Na próxima tela foi selecionada a opção *Browser* perto do campo *Planned Run* e foi selecionado o nome da corrida planejada. As configurações da corrida foram confirmadas e conforme solicitado, o *Ion 314™ Chip* foi preso ao sequenciador. No início da corrida o aparelho realiza calibração do *Ion 314™ Chip* e ao final o aparelho indicase a calibração foi bem sucedida e depois de cerca de 1 minuto o aparelho começa a realizar a corrida. Ao fim da corrida (que estende-se por cerca de 8 horas) os dados ficaram disponíveis no *Torrent Browser* e foi feito o *upload* para a *software Ion Reporter™*, que permite a análise dos dados de qualquer computador.

Ao fim da corrida (que estende-se por cerca de 8 horas) os dados ficaram disponíveis no *Torrent Browser* e foi feito o *upload* para a *software Ion Reporter™*, que permite a análise dos dados de qualquer computador, utilizando o *workflow*

AmpliSeq BRCA single sample – High sensitivity, um conjunto de componentes de análise que automatizam a análise de dados previamente selecionados, detectando variantes germinativas com sensibilidade aumentada.

3.2.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sequenciamento de *BRCA1* e *BRCA2*

Para sequenciamento de toda região codificante dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, foi necessário inicialmente realização da PCR. Os primers para o gene *BRCA1* e *BRCA2* utilizados foram desenhados de modo que suas localizações estejam a uma distância de 50 a 100 pares de bases de cada exon, permitindo assim, também a análise de regiões intrônicas próximas aos exons, onde eventuais alterações podem ser importantes por estarem localizadas em sítios de splicing alternativo.

Foram utilizados os reagentes: deoxinucleotídeos (dNTPs) a 0,16 mM (Invitrogen), *primers* senso e anti-senso a 0,4 μ M cada (Invitrogen), enzima *Platinum™ Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) a 0,4U/ μ l, tampão para a enzima 1X, cloreto de magnésio para *Platinum™ Taq DNA Polymerase* ($MgCl_2$, concentração variando de 2 mM a 3 mM, de acordo com o fragmento que foi amplificado) e DNA. O volume da reação foi completado com água ultrapura livre de RNases e DNases para o volume final de 10 μ l.

A reação foi realizada em aparelho termociclador Veriti (Applied Biosystems) e submetida à variação de temperatura: 95°C por 10 minutos (ativação da enzima); 40 ciclos: 94°C por 50 segundos (desnaturação das fitas), 56-66°C por 50 segundos (anelamento dos primers – as temperaturas ideais para cada exon foram padronizadas de acordo com as bandas apresentadas), 72°C por 50 segundos (extensão da fita pela ação da enzima); 72°C por 7 minutos (extensão final da fita) e 4°C por tempo indeterminado (final da reação).

Uma alíquota do produto (3 µl) foi avaliada qualitativamente por gel de agarose diluída a 1.5% em TBE e corado com SYBR Safe (Invitrogen), que se intercala ao DNA e pode ser observado sob luz ultravioleta. Após a polimerização do gel, as amostras foram preparadas com o corante xileno-cianol 1X e aplicadas. Foi utilizado o marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen), possibilitando a avaliação do tamanho das bandas após o processo.

O produto da PCR foi purificado utilizando *illustra™ ExoStar™ 1-Step* (GE Healthcare Life Sciences). Foi adicionado 1 µl de ExoStar em cada produto de PCR e colocado em termociclador *Veriti* a 37°C por 15 minutos e posteriormente 80°C por 15 minutos. A fosfatase alcalina e exonuclease 1 contidas neste reagente, removem resíduos e partículas não incorporadas na reação de PCR. Todas as amostras foram armazenadas em freezer (-20°C) até o sequenciamento.

Uma nova PCR da amostra de DNA amplificado foi preparada. Nesta etapa utilizamos um primer (senso ou anti-senso) para cada tubo. Para essa reação foi utilizado o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1 (Life Technologies). Foi adicionado 1 µl de DNA (produto da PCR), oligonucleotídeos iniciadores (1pmol), tampão 5x e Big Dye contendo os demais reagentes da reação. O volume final de 10 µl, foi completado com água ultra-pura, livre de RNases e DNases em placa de 96 wells. A reação foi levada ao termociclador e submetida a 96°C por 1 minuto (desnaturação), 35 ciclos com variação de temperatura: 96°C por 15 segundos (anelamento), 50°C por 15 segundos (extensão) e 60°C por 4 minutos (extensão da final) e a 4°C por tempo indeterminado.

A próxima etapa consiste na purificação do produto do seqüenciamento. Para tal, foi utilizado o protocolo *in house* de precipitação por EtOH e EDTA. Foram adicionados 2,5 µl de EDTA (125 mM) e 30 µl de EtOH absoluto em cada poço da placa, selando a placa com adesivo resistente a etanol, seguida de homogeneização por inversão por várias vezes. A reação foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e protegida de luz. Após a incubação, foi

centrifugada a 2000g por 30 minutos, temperatura ambiente ($\pm 22^{\circ}\text{C}$) com descartar sobrenadante. Então, foram adicionados 30 μl de EtOH 70% e centrifugar a 1650g por 15 minutos e houve descartar do sobrenadante, deixando placa bem seca. A última etapa é a adição de 10 μl de Formamida Hi-Di. O produto dessa reação foi analisado no aparelho de seqüenciamento automático ABI ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) do Centro Translacional em Oncologia (CTO)/LIM 24, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Todas as mutações deletérias foram confirmadas em um segundo sequenciamento.

As seqüências obtidas foram analisadas pelo programa Mutation Surveyor version 3.20 (SoftGenetics LLC) e comparadas com a seqüência normal do gene descrita no GenBank (BRCA1 NM_007294 e BRCA2 NM_000059). As mutações encontradas foram classificadas utilizando critérios recomendado pela ACMG (*American College of Medical Genetic and Genomics*) (Richards et al., 2015) em conjunto com AMP (*Association of Molecular Pathology*) (ANEXO A). a partir das informações obtidas nos seguintes bancos de dados: *Breast Cancer Information Core* (BIC) (Szabo et al., 2000), *Leiden Open Variation Database* (LOVD) (Fokkema et al., 2011; *Mutation Database Universal (UMD)/BRCA Share™* (Beroud et al., 2000) e *ClinVar* (Landrum et al., 2016) assim como dos preditores *n silico Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2)* (Ramensky et al., 2002); *Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT)* (Ng e Henikoff, 2001); *Align-GVGD* (Tavtigian et al., 2005); *Human Slicing Finder (HSF)* (Desmet et al., 2009) e da literatura. Também foram consultados os seguintes bancos de dados de frequência alélica: *Exome Aggregation Consortium* (ExAC) (<http://exac.broadinstitute.org/>); *Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project* (GO-ESP) (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>); *NCBI dbSNP* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>) e *NCBI 1000 Genomes Browser* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes>)

3.2.4 MLPA (SALSA® MLPA® P002 *BRCA1 probemix* e SALSA® MLPA® P045 *BRCA2/CHEK2 probemix*, MRC-Holland)

A reação de MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) é utilizada para analisar grandes inserções e deleções que não são detectadas pelo sequenciamento de Sanger ou Sequenciamento de Nova Geração. São utilizados os seguintes reagentes: DNA de interesse e DNA de referência (indivíduos saudáveis), as sondas correspondentes aos exons dos genes (*BRCA1* ou *BRCA2/CHEK2*) o *buffer* (contendo todos os reagentes necessários para a reação), e DNA ligase.

Em tubos de 0,2 µl, foram adicionados 80 ng de DNA em um volume de 2,5 µl completados com água ultra pura. Em seguida, as amostras foram colocadas em termociclador a 98°C por 10 minutos, para desnaturação do DNA e depois resfriadas a 25°C antes de abrir o termociclador. Foram adicionados 1,5 µl de sonda MLPA e 1,5 µl de MLPA *buffer* e incubados a 95°C por 1 minuto, seguida de um hold a 60°C por 17 horas (podendo variar de 12 a 24 horas). A mistura de sondas de MLPA adicionada a amostra é formada por sondas tamanhos diferentes, devido a inserção de sequência *stuffer*, e é composta de dois oligonucleotídeos iniciadores que se ligam a pontos adjacentes na região alvo. Além desta região de hibridização, as sondas possuem regiões complementares a um par de primers marcados com o fluoróforo FAM (estes oligonucleotídeos marcados são os mesmos para todas as sondas de todos os kits oferecidos pela MRC Holland, podendo variar o fluoróforo).

A etapa seguinte começa com redução da temperatura 54°C antes de abrir o termociclador. Em cada amostra foram adicionados 32 µl de Mix Ligase (3 µl de ligase buffer A, 3 µl de ligase buffer B, 1 µl de Ligase-65, 25 µL de água estéril). Em seguida as amostras com o mix serão incubadas a 54°C por 15 minutos, 98°C por 5 minutos e resfriadas a 20°C. Caso a sequência alvo esteja presente na amostra os oligonucleotídeos serão hibridizados após a adição da Ligase-65 a

fim de serem unidos, formando uma única sonda. Então, em um novo tudo de 0,2 µl será preparado o Mix Polimerase (2 µl de Salsa PCR primers, 0,5 µl de Salsa polimerase e 7,5 µl de água estéril), adicionados 10 µl em cada amostra e incubada a 95°C por 1 minuto. Em seguida, esta reação será submetida à variação de temperatura: 35 ciclos: 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos; 72°C por 20 minutos e mantidas a 15°C. A realização de uma reação de PCR tem como objetivo amplificar o fragmento resultante da ação da ligase, o que só ocorre quando as sondas estão conectadas. Serão gerados fragmentos de tamanhos diferentes (130 a 490 bp), conforme o tamanho da sonda. Diferenças nos valores relativos referentes à amplificação são expressas em tamanhos ou áreas diferentes entre amostras de pacientes e de controles negativos (pessoas saudáveis). Nossos controles serão amostras de sangue de mulheres sem câncer de mama.

Ao fim da PCR as amostras seguem para o aparelho de sequenciamento automático. O produto da reação de PCR será diluído em uma proporção de 1:10, ou seja, 1 µl de produto em 9 µl de água. Em seguida, será preparado um mix: 9 µl de Formamida HiDi (Life Technologies) e 0.075 µl de Gene Scan-600 Liz size standard (Life Technologies) e adicionado 1 µl de produto da PCR diluído. Esta reação foi incubada a 80°C por dois minutos e analisada após “corrida” no aparelho de sequenciamento automático ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems). O resultado da análise dos fragmentos foi visualizado através do *software Coffalyser.Net* (MRC-Holland) observando-se o eletroferograma e um gráfico de barras onde é possível analisar se houve desvio no padrão de tamanho dos éxons.

Cada *kit*, além dos controles externos, contém seus controles internos (sondas que hibridizam a regiões cromossômicas diferentes) e controles de quantidade e desnaturação do DNA: Q-fragments e D-fragments, respectivamente. Os Q-fragments estão presentes em todos os kits de MLPA e são quatro fragmentos (64, 70, 76 e 82 nt) que não dependem da ligação de sondas: quando seus picos estão maiores que a metade do tamanho dos picos dos D-fragments e

das sondas de MLPA indicam uma quantidade de DNA insuficiente ou falha na reação. D-fragments, presentes na maioria dos kits, são três sondas dependentes de ligação (88, 92 e 96 nt) como qualquer outra do kit de MLPA; sendo assim, seus picos devem ser de tamanho semelhante ao das outras sondas do kit, indicando que o DNA foi devidamente desnaturado e houve ligação das sondas.

3.3 *PRKD1*

3.3.1. Extração de DNA de Tecido Parafinado para avaliação de mutação somática no gene *PRKD1*

Para cada amostra uma lâmina foi corada com hematoxilina-eosina (HE) e analisada pelo médico-patologista para auxiliar na identificação da região tumoral. A região de interesse com $\geq 70\%$ de células tumorais foi demarcada e foram obtidos 4 cortes com 10 μ m de espessura no micrótomo (*Leica Biosystems* - RM2235). O DNA destas amostras será extraído usando o *kit QIAamp® DNA FFPE Tissue* (*Qiagen*).

A técnica se inicia com a incubação da amostra em xilol para desparafinação das amostras, adicionando 1 ml de xilol 100% e agitando em vortéx por 10 segundos. As amostras são centrifugadas (20.000 g por 2 minutos), o xilol é removido e é adicionado 1 ml de etanol 100%. A mistura é agitada em vortéx por 15 segundos e centrifugada (20.000 g 2 minutos). Os tubos são invertidos e incubados com a tampa aberta a temperatura ambiente por 30 minutos, para remoção de todo etanol. A próxima etapa do processo baseia-se em digestão das proteases, adicionando-se 180 μ l de *Buffer ATL* (que contém detergentes) e 20 μ l de Proteinase K, seguida de homogeneização por vortéx durante 15 segundos. As amostras são incubadas a 56°C por 4 horas, agitando ocasionalmente, e a 90°C por 30 minutos, o que impede a formação de crosslinking de DNA por conta do formaldeído usado como fixador no momento da inclusão do tecido em parafina.

Para garantir remoção de RNA, são adicionados 2 µl de RNase A (100 mg/µl), homogeneizados por vórtex por 15 segundos e incubado por 2 minutos. Então, são adicionados 200 µl de *Buffer AL* (que assegura as condições ideais para ligação do DNA à membrana de sílica) e 200 µl de etanol (96-100%) e agitado em vórtex por 15 segundos. As amostras são brevemente centrifugadas e cuidadosamente transferidas para colunas. As colunas são centrifugadas a 6000 g por 1 minuto e o precipitado é descartado. São adicionados 500 µl de *Buffer AW1*, centrifugadas a 6.000 g por 1 minuto e o precipitado foi descartado. Foram adicionados 500 µl de *Buffer AW2* e centrifugadas a 6.000 g por 1 minuto, onde novamente o precipitado foi descartado. As duas etapas de lavagem com *buffers* contendo etanol servem para retirar possíveis contaminantes como proteínas e sais. Para remoção de todos os resíduos, as colunas são centrifugadas a 20.000 g por 3 minutos. Por fim, as colunas são transferidas para microtubos de 1,5 ml, onde, são adicionados 30 µl de *Buffer ATE*, incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 20.000 g por 1 minuto.

Após a extração foi realizada a quantificação em espectrofotômetro (*NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1*, Labtrade), conforme item anterior.

3.3.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sequenciamento do gene *PRKD1* pelo método de Sanger

Para realização de PCR e de sequenciamento para a região de interesse do gene *PRKD1* primeiramente foi realizada uma pesquisa na literatura sobre a ativação da função quinase da proteína. Na revisão realizada por Steinberg (2012) são destacados dois pontos de fosforilação: o loop de fosforilação entre Ser⁷³⁸ e Ser⁷⁴² e a autofosforilação da Ser⁹¹⁰. Há evidências de que a fosforilação da Ser⁷⁴² depende da fosforilação da Ser⁹¹⁰, contudo, a ativação de Ser⁷⁴² não teria um papel tão importante nos substratos alvo (como a Snail) como a fosforilação da

Ser⁷³⁸. Assim, estes foram os sítios escolhidos para análise de mutações somáticas.

O desenho dos primers foi realizado usando a sequência do transcrito NM_002742.2, disponível no banco de dados *Ensembl*, verificando a localização dos nucleotídeos que codificam as Ser⁷³⁸, Ser⁷⁴² (Exon 16) e Ser⁹¹⁰ (Exon 18). Foi determinado que o produto de PCR com a utilização dos primers não ultrapassasse de 250 pares de base, visto que a PCR será realizada em DNA extraído de tecido parafinado, no qual o DNA geralmente se encontra fragmentado devido ao processo de parafinização. Para determinar a sequência de nucleotídeos dos primers foi utilizado o software *Primer3* e em seguida foi usado o software *BLAST* para conferência do alinhamento das sequências com o gene de interesse.

A reação de PCR e o sequenciamento foram realizados conforme explanado no item 3.2.2 .

3.3.3 Análise de *PRKD1* em bancos de dados

Foi realizada pesquisa do gene no banco de dados (Catalogue of Somatic Mutations; Forbes et al., 2017) e sua distribuição em pacientes com câncer de mama. Este banco de dados fornece informações de grande relevância: 1) se o gene está catalogado no *Cancer Gene Census*, plataforma para genes que contêm mutações causalmente implicadas no câncer; 2) a frequência em que o gene aparece mutado e se há algum domínio importante sendo afetado e 3) análise pelo preditor FATHMM, capaz de predizer dos efeitos funcionais das mutações *missense* através do alinhamento de seqüências homólogas e domínios protéicos conservados, com "pesos de patogenicidade", representando a tolerância geral da proteína/domínio às mutações .

Foi analisada a influência prognóstica da expressão gênica na sobrevida de pacientes com câncer luminal, através da construção de gráficos de Kaplan-Meier utilizando a ferramenta online *KM Plotter* (Gyorffy et al., 2010;

<http://kmplot.com/analysis/index.php?p=service&cancer=breast> que permite avaliar o efeito de 54.675 genes na sobrevivência usando 10.461 amostras de câncer. Estes incluem 5.143 pacientes com câncer de mama, 1.816 paciente com câncer de ovário, 2.437 pacientes com câncer de pulmão e 1.065 pacientes com câncer gástrico.

4. RESULTADOS

4.1 Características Clínico-Patológicas

Foram incluídas 49 pacientes com idade mediana de 64 anos variando de 56 a 87 anos e que tiveram diagnóstico de câncer de mama com idade mediana de 62 anos variando de 55 a 80 anos. A maioria das pacientes (31/ 63,27%) apresentavam tumores com grau histológico (Nottingham) II. A maioria dos tumores é do subtipo luminal B (26/53,06%), seguido pelo subtipo Luminal A (13/26,53%). Além disso, observamos que cinco (10,2%) tumores são do subtipo molecular HER2 e cinco (10,2%) são triplo negativo. Avaliamos também o estadió clínico, o que nos revelou que 36 pacientes (74%) apresentaram estadió clínico I e II, caracterizando doença localizada, e 12 (24%) apresentaram estadió clínico III, indicando doença localmente avançada. Em relação à história familiar característica de síndrome de câncer de mama e ovário hereditário, observamos grande parcela das pacientes (32/ 65,3%) possui um parente de primeiro grau afetado por câncer de mama e/ou ovário (Tabela 3) .

Tabela 3 . Características Clínico-Patológicas

Características	Pacientes
Idade ao diagnóstico, mediana (variação), anos	62 (55-80)
Idade à inclusão, mediana (variação),anos	64 (56-87)
Grau histológico, n (%)	
I	11 (22,45)
II	31 (63,27)
III	7 (14,29)
Estadió clínico , n (%)	

I	16 (33)
II	20 (41)
III	12 (24)
Sem informação	1 (2)
Subtipo Molecular	
Luminal A	13 (26,53)
Luminal B	26 (53,06)
HER2 ⁺	5 (10,2)
Triplo negativo	5 (10,2)
Parentes afetados n(%)	
Primeiro Grau	32(65)
Segundo Grau	9(19)
Terceiro Grau	8(16)

4.2 Sequenciamento dos genes *BRCA1* e *BRCA2* – Plataforma *Ion Torrent*TM(*ThermoFisher Scientific*) e Método de Sanger

Até o presente momento, onze pacientes tiveram análise parcial de *BRCA1/BRCA2* pela técnica de sequenciamento capilar (método de Sanger) sendo detectada variante patogênica em apenas uma e 38 pacientes tiveram *BRCA1/BRCA2* sequenciado de forma completa pela plataforma *Ion Torrent*TM e, destas, 3 pacientes tiveram variantes patogênicas identificadas (Tabela 5 e Tabela 6). Os amplicons com cobertura menor do que 20x no *Ion Torrent*TM estão sendo reanalisados por método tradicional de sequenciamento juntamente com a realização das reações restantes para as amostras que estão sendo analisadas apenas pelo método de Sanger (ANEXO B).

O sequenciamento de *BRCA1* e *BRCA2* realizado utilizando-se a plataforma *Ion Torrent*TM(*ThermoFisher Scientific*) para 37 pacientes, gerou uma média de 302,346 *reads* por paciente, sendo que 96,14% dessas regiões foram mapeadas nas regiões de *BRCA1* e *BRCA2*. A cobertura média foi de 293X.

Tabela 5 - Alterações encontradas no gen e *BRCA1*.

Exon	NT	Codon	Designação BIC	HGVs cDNA	HGVs Proteína	Tipo	Frequência Alélica ExAC	Global MAF dbSNP	Global MAF 1000 genomas	GO-ESP	Localização (GRCh37)	NCBI 1000 Genomas Browser	PolyPhen	SIFT	Align GVGD (Pufferfish)	HSF	BIC	LOVD	BRCA Share™	ClinVar	Geral	n
1	101-115	-	IVS1-115T>C	c.-19-115T>C	-	5'UTR	ND	G=0.3536	0.35360 (G)	ND	17:41276247	rs3765640	-	-	-	ND	Importância Clínica Desconhecida	ND	ND	Benigna	Benigna	9
2	200-14	-	IVS2-14C>T	c.81-14C>T	-	IVS	0.0005403	ND	ND	0.00069 (A)	17:41267810	rs80358006	-	-	-	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Importância Clínica Desconhecida	probably does not affect function	1-Neutro	Interpretações conflitantes	Provavelmente Benigna	1
3	134+111	-	IVS3+111C>T	c.134+111C>T	-	IVS	ND	A=0.0038	0.00380 (A)	ND	17: 41267632	rs8176100	-	-	-	Creation of an intronic ESE site. Probably no impact on splicing.	ND	ND	1-Neutro	Benigna	Benigna	1
6	301+44A	-	IVS6+44A>G	c.301+44A>G	-	IVS	ND	ND	ND	ND	17:41256913	ND	-	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	UV	1
7	441+36	-	IVS7+36C>T	c.441+36C>T	-	IVS	5,41E-02	ND	ND	ND	17: 41256103	rs45569832	-	-	-	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Importância Clínica Desconhecida	ND	3- UV	Uncertain significance	UV	2
7	441+36	-	IVS7+41C>T	c.441+41C>T	-	IVS	0.0002362	ND	ND	ND	17: 41256098	rs45489593	-	-	-	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Importância Clínica Desconhecida	ND	1-Neutro	Uncertain significance	Benigna	1
7	441+36	-	IVS7+36del14	c.441+36del14	-	IVS	ND	ND	ND	ND	17:41256090_41256103	rs373413425	-	-	-	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	ND	ND	1-Neutro	Benigna	Benigna	11
7	442-34	-	IVS7-34C>T	c.442-34C>T	-	IVS	0.1738	A=0.0986/494	0.09860 (A)	0.17569 (A)	17:41251931	rs799923	-	-	-	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	ND	effect unknown	1-Neutro	Benigna	Benigna	16
9	710	197	710C>T	c.591C>T	p.Cys197=	Syn	0.001469	A=0.0004/2	ND	0.00123 (A)	17:41249263	rs1799965	ND	Tolerado (1.00)	ND	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.	Sem importância clínica	effect unknown	1-Neutro	Benigna/Provavelmente Benigna	Benigna	1
11	1186	356	Q356R	c.1067A>G	p.Gln356Arg	M	0.04407	C=0.0218/109	0.02 (C)	0.04590 (C)	17:41246481	rs1799950	Provavelmente Danoso (0.998)	Danoso (0.014)	Class C0	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.	Importância Clínica Desconhecida	effect unknown	1-Neutro	Benigna	Provavelmente Benigna	6
11	2196	693	D693N	c.2077G>A	p.Asp693Asn	M	0.05681	T=0.0335/168	0.03 (T)	0.05429 (T)	17:41245471	rs4986850	Benigno (0.00)	Danoso (0.012)	Class C0	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.	Sem importância clínica	effect unknown	1-Neutro	Benigna	Benigna	8
11	2201	694	2201C>T	c.2082C>T	p.Ser694=	Syn	0.3483	A=0.3365/1685	0.34 (A)	0.29568 (A)	17:41245466	rs1799949	ND	Tolerado (1.00)	ND	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.	Não patogênico	effect unknown	1-Neutro	Benigna	Benigna	19
11	2430	771	L771L	c.2311T>C	p.Leu771=	Syn	0.342	G=0.3353/1679	0.34 (G)	0.27764 (G)	17:41245237	rs16940	ND	Tolerado (1.00)	ND	Creation of an exonic ESE site. Probably no impact on splicing.	Sem importância clínica	effect unknown	1-Neutro	Benigna	Benigna	19
11	2715	886	R866C	c.2596C>T	p.Arg866Cys	M	9.89e-05	ND	ND	ND	17: 41244952	rs41286300	Provavelmente Danoso (1.00)	Danoso (0.00)	Class C65	Creation of an exonic ESE site. Probably no impact on splicing.	Sem importância clínica	variant affects function	1-Neutro	Benigna	Benigna	1
11	2731	871	P871L	c.2612C>T	p.Pro871Leu	M	0.41	G=0.4561/2284	0.46 (G)	0.49316 (A)	17:41244936	rs799917	Benigno (0.00)	Tolerado (1.00)	Class C0	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.	Não patogênico	effect unknown	1-Neutro	Benigna	Benigna	24
11	3232	1038	E1038G	c.3113A>G	p.Glu1038Gly	M	0.3429	C=0.3357/1681	0.34 (C)	0.27903 (C)	17:41244435	rs16941	possivelmente Danoso (0.936)	Danoso (0.028)	Class C0	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.	Sem importância clínica	variant affects function	1-Neutro	Benigna	Benigna	19
11	3238	1040	S1040N	c.3119G>A	p.Ser1040Asn	M	0.01317	T=0.0098/49	0.01 (T)	0.01653 (T)	17:41244429	rs4986852	Provavelmente Danoso (0.974)	Tolerado (0.084)	Class C0	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Importância Clínica Desconhecida	ND	1-Neutro	Benigna	Provavelmente Benigna	4
11	3424	1102	N1102S	c.3305A>G	p.Asn1102Ser	M	1.65e-05	ND	ND	0.00008 (C)	17: 41244243	rs80356900	Benigno (0.360)	Tolerado (0.075)	Class C0	Creation of an exonic ESS site. Probably no impact on splicing.	Importância Clínica Desconhecida	ND	3-UV	UV	UV	1
11	3667	1183	K1183R	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	M	0.349	C=0.3526/1766	0.35 (C)	0.29525 (C)	17:41244000	rs16942	Benigno (0.00)	Tolerado (1.00)	Class C0	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing. Alteration of an exonic ESE site.Potential alteration of splicing.	Sem importância clínica	effect unknown/does not affect function	1-Não patogênico	Benigna	Benigna	19

Tabela 5 - Alterações encontradas no gene *BRCA1*. (conclusão

11	4158	1347	R1347G	c.4039A>G	p.Arg1347Gly	M	0.00398	C=0.0006/3	0.00060 (C)	0.00484 (C)	17: 41243509	rs28897689	Benigno (0.255)	Tolerado (0.175)	Class C0	Creation of an exonic ESS site. Probably no impact on splicing.	Importância Clínica Desconhecida	does not affect function	1-Não patogênico	Benigna	Provavelmente Benigna	1
13	4427	1436	4427T>C	c.4308T>C	p.Ser1436=	Syn	0.3431	G=0.3363/1684	0.34 (G)	0.27956 (G)	17:41234470	rs1060915	ND	Tolerado (1.00)	ND	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Sem importância clínica	effect unknown	1-Neutro	Benigna	Benigna	18
15	4604-63	-	IVS14-63A>G	c.4485-63C>G	-	IVS	ND	C=0.3534	0.35340 (C)	ND	17: 41226601	rs273900734	-	-	-	-	Importância Clínica Desconhecida	effect unknown	ND	Benigna	Benigna	1
16	4956	1613	S1613G	c.4837A>G	p.Ser1613Gly	M	0.3496	C=0.3558/1782	0.36 (C)	0.29817 (C)	17:41223094	rs1799966	Benigno (0.225)	Danoso (0.032)	Class C0	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.	Sem importância clínica	effect unknown	1-Neutro	Benigna	Benigna	19
17	5193+2	-	IVS17+2T>C	c.5074+2T>C	-	S	ND	ND	ND	ND	17: 41219623	rs80358089	-	-	-	ND	ND	ND	ND	Patogénico	Provavelmente Patogénica	1
17	5194-53	-	IVS17-53C>T	c.5075-53C>T	-	IVS	ND	A=0.0110/55	0.01 (A)	0.01708 (A)	17:41216021	rs8176258	-	-	-	ND	Não patogénico	ND	1-Neutro	Benigna	Benigna	2
18	5242	1708	A1708E	c.5123C>A	p.Ala1708Glu	M	0.00002487	ND	ND	0.00023 (T)	17: 41215920	rs28897696	Provavelmente Danoso (1.00)	Danoso (0.000)	Class C65	ND	Clinicamente importante	variant affects function	5-Causal	Patogénico	Patogénica	1
18	5271+66	-	IVS18+66G>A	c.5152+66G>A	-	IVS	ND	T=0.3425	0.34250 (T)	ND	17: 41215825	rs3092994	-	-	-	ND	Não patogénico	effect unknown	1- Neutro	Benigna	Benigna	1
21	5423	1768	C1769C	c.5304C>T	p.Cys1768=	M	0,00002486	A=0.0006/3	0.00060 (A)	0.00015 (A)	17: 41203108	rs138493864	ND	Tolerado (1.00)	ND	ND	ND	ND	3-UV	Benigna/Provavelmente Benigna	UV	1

NT, nucleotídeo; HGVS, Human Genome Variation Society; Tipo: Syn, Sinônimia; F, Frameshift; IVS, Variante Intrônica ; M, Missense; S, variante com efeito no splicing;MAF, frequência do alelo menor; SIFT: Variante Tolerada (benigna) or Danosa; Align GVGD: Class C0 (menos provável de interferir com a função da proteína), C15, C25, C35, C45, C55, C65 (mais provável de interferir na função da proteína); BIC, Breast Cancer Information Core; LOVD, Leiden Open Variation Database (a variante afeta a função da proteína, conforme conclusão do curador); LOVD-IARC, Leiden Open Variation Database - International Agency for Research on Cancer; BRCA Share™, Mutation Database Universal; UV, variante não classificada; n, número de pacientes com a variante; ND, informação não disponível;

Tabela 6 - Alterações encontradas no gene *BRCA2*.

Exon	NT	Codon	Designação BIC	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Tipo	Frequência Alélica ExAC	Global MAF dbSNP	Global MAF 1000 genomas	GO-ESP	Localização	NCBI 1000 Genomas Browser	PolyPhen	SIFT	Align GVG D (Pufferfish)	HSF	BIC	LOVD	BRCA Share™	ClinVar	Geral	n
2	218	-	218C>T	c.-11C>T	-	5'UTR	0.001625	T=0.0044/22	< 0.01 (T)	0.00584 (T)	13:32890587	rs76874770	-	-	-	ND	Não patogênico	effect unknown	ND	Benigna	Benigna	2
2	214	-	214A>C	c.-15A<C	-	5'UTR	0.000218	C=0.0008/4	0.00080 (C)	0.00038 (C)	13:32890583	rs138705202	-	-	-	ND	Desconhecido	ND	ND	Interpretações conflitantes	UV	1
2	203	-	203G>A	c.-26G>A	-	5'UTR	0.2465	A=0.2093/1048	0.21 (A)	0.20883 (A)	13:32890572	rs1799943	-	-	-	ND	Não patogênico	effect unknown	ND	Benigna	Benigna	13
2	230	1	M1R	c.2T<G	p.Met1Arg	M	0,008339	ND	ND	ND	13:32890599	rs80358547	Provavelmente Danoso (0.998)	Danoso (0.00)	Class C65	ND	Clinicamente importante	ND	5 - Causal	Patogênico	Patogênica	1
3	353	42	Y42C	c.125A>G	p.Tyr42Cys	M	0.001696	G=0.0008/4	< 0.01 (G)	0.00246 (G)	13:32893271	rs4987046	Benigno (0.090)	Tolerado (0.113)	Class C0	Activation of an exonic cryptic donor site. Potential alteration of splicing.	Importância Clínica Desconhecida	effect unknown	1-Neutro	Benigna	Provavelmente Benigna	1
4	653+33	-	IVS4+33A>C	c.425+33A>G	-	IVS	0.0005233	ND	ND	0.00031 (C)	13:32899354	rs200065709	-	-	-	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	ND	ND	2 - Provavelmente Neutro	ND	Provavelmente Benigna	2
4	653+67	-	IVS4+67A>C	c.425+67A>C	-	IVS	ND	C=0.0743/372	0.07430 (C)	ND	13:32899388	rs11571610	-	-	-	Alteration of an intronic ESS site. Probably no impact on splicing.	Não patogênico	ND	1 - Neutro	Benigna	Benigna	6
6	745-19	-	IVS6-19C>T	c.517-19C>T	-	IVS	0.002192	T=0.0082/41	0.00820 (T)	0.00738 (T)	13:32900617	rs11571623	-	-	-	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Importância Clínica Desconhecida	ND	1 - Neutro	Benigna	Provavelmente Benigna	1
8	909+56	-	IVS8+56C>T	c.681+56C>T	-	IVS	ND	T=0.1859/931	0.19 (T)	ND	13:32903685	rs2126042	-	-	-	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	ND	effect unknown	1-Neutro	Benigna	Benigna	15
10	1093	289	N289H	c.865A>C	p.Asn289His	M	0.05178	C=0.0737/369	0.07 (C)	0.03117 (C)	13:32906480	rs766173	Benigno (0.278)	Danoso (0.002)	Class C0	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing	Sem importância clínica	effect unknown	1-Neutro	Benigna	Benigna	6
10	1342	372	H372N	c.1114A>C	p.His372Asn	M	0.2779	C=0.2494/1249	0.25 (C)	0.23321 (C)	13:32906729	rs144848	Benigno (0.00)	Tolerado (0.139)	Class C0	ND	Não patogênico	ND	1-Neutro	Benigna	Benigna	14
10	1593	455	1593A>G	c.1365A>G	p.Ser455=	Syn	0.05178	G=0.0737/369	0.07 (G)	0.03101 (G)	13:32906980	rs1801439	ND	Tolerado (0.911)	ND	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing	Não patogênico	effect unknown	1-Neutro	Benigna	Benigna	6
10	1742	505	I505T	c.1514T>C	p.Ile505Thr	M	0.0007249	C=0.0004/2	0.00040 (C)	0.00077 (C)	13:32907129	rs28897708	Possivelmente Danoso (0.651)	Danoso (0.003)	Class C0	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Sem importância clínica	effect unknown	1-Neutro	Benigna/Provavelmente Benigna	Benigna	1
10	2138-51	-	IVS10-51G>T	c.1910-51G>T	-	IVS	0.04934	T=0.0735/368	0.07350 (T)	0.00305 (A)	13:32910351	rs11571651	-	-	-	Alteration of an intronic ESS site. Probably no impact on splicing.	Não patogênico	ND	1 - Neutro	Benigna	Benigna	6
10	2138-74	-	IVS10-74T>C	c.1910-74T>C	-	IVS	ND	C=0.1745/874	0.17450 (C)	ND	13:32910328	rs2320236	-	-	-	Creation of an intronic ESE site. Probably no impact on splicing.	Não patogênico	ND	1 - Neutro	Benigna	Benigna	13
11	2457	743	2457T>C	c.2229T>C	p.His743=	Syn	0.05158	C=0.0735/368	0.07 (C)	0.03129 (C)	13:32910721	rs1801499	ND	Tolerado (1.00)	ND	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Não patogênico	ND	1-Neutro	Benigna	Benigna	6
11	2578	784	M784V	c.2350A>G	p.Met784Val	M	0.0003142	G=0.0036/18	0.00360 (G)	ND	13:32910842	rs11571653	Benigno (0.00)	Tolerado (1.00)	Class C0	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.	Importância Clínica Desconhecida	ND	3 - UV	Benigna	UV	1
11	3199	991	N991D	c.2971A>G	p.Asn991Asp	M	0.05341	G=0.0801/401	0.08 (G)	0.03725 (G)	13:32911463	rs1799944	Benigno (0.00)	Tolerado (1.00)	Class C0	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing	Não patogênico	ND	1-Neutro	Benigna	Benigna	6
11	3599	1124	Q1124R	c.3371A>G	p.Gln1124Arg	M	ND	ND	ND	ND	13:32911863	ND	Provavelmente Danoso (score 1.000)	Danoso (0.00)	Class C35	Activation of an exonic cryptic donor site. Potential alteration of splicing.	ND	ND	ND	Uncertain significance	UV	1
11	3624	1132	3624A>G	c.3396A>G	p.Lys1132=	Syn	0.2945	G=0.2658/1336	0.27 (G)	0.27984 (G)	13:32911888	rs1801406	ND	Tolerado (1.00)	ND	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.	Não patogênico	ND	1-Neutro	Benigna	Benigna	13
11	4035	1269	4035T>C	c.3807T>C	p.Val1269=	Syn	0.1898	C=0.1681/842	0.16810 (C)	0.19111 (C)	13:32912299	rs543304	ND	Tolerado (1.00)	ND	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Não patogênico	ND	1-Neutro	Benigna	Benigna	15

Tabela 6 - Alterações encontradas no gene *BRCA2*. (Continuação)

11	4318	1364	I1364L	c.4090A>C	p.Ile1364Leu	M	0.001721	C=0.0044/22	0.00440 (C)	0.00631 (C)	13: 32912582	rs56248502	Benigno (0.001)	Tolerado (1.00)	Class C0	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Não patogênico	ND	1 - Neutro	Benigna	Provavelmente Benigna	2
11	4791	1521	4791G>A	c.4563A>G	p.Leu1521=	Syn	0.9931	A=0.0260/130	0.02600 (A)	0.02423 (C)	13: 32913055	rs206075	ND	Tolerado (1.00)	ND	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.	Não patogênico	ND	1-Neutro	Benigna	Benigna	36
11	5868	1880	N1880K	c.5640T>G	p.Asn1880Lys	M	0.0007629	G=0.0022/11	0.00220 (G)	0.00315 (G)	13: 32914132	rs11571657	Benigno (0.167)	Danoso (0.007)	Class C0	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.	Importância Clínica Desconhecida	ND	2 - Provavelmente Neutro	Interpretações conflitantes	Provavelmente Benigna	1
11	5873	1882	S1882X	c.5645C>A	p.Ser1882Ter	N	0.00003			ND	13: 32914137	rs80358785	-	-	-	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.	Patogênico	ND	5- Causal	Patogênico	Patogênica	1
11	5972	1915	T1915M	c.5744C>T	p.Thr1915Met	M	0.0179	T=0.0086/43	0.00860 (T)	0.02114 (T)	13: 32914236	rs4987117	Benigno (0.000)	Tolerado (1.00)	Class C0	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.	Não patogênico	ND	1-Neutro	Benigna	Provavelmente Benigna	1
11	5996	1923	D1923A	c.5768A>C	p.Asp1923Ala	M	0.0002809	C=0.0002/1	0.00020 (C)	0.00100 (C)	13: 32914260	rs45491005	Benigno (0.144)	Danoso (0.025)	Class C0	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.	Importância Clínica Desconhecida	ND	2 - Provavelmente Neutro	Interpretações conflitantes	Provavelmente Benigna	1
11	6741	2171	6741C>G	c.6513G>C	p.Val2171=	Syn	0.993	G=0.0260/130	0.02600 (G)	0.02453 (G)	13: 32915005	rs206076	ND	Tolerado (1.00)	ND	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.	Não patogênico	ND	1-Neutro	Benigna	Bengina	37
11	7069+53	-	IVS11+53delTATTCA GTAG	c.6841+53delTATTCA GTAG	-	IVS	ND	ND	ND	ND	13:32915413-32915423	ND	-	-	-	Alteration of an intronic ESS site. Probably no impact on splicing.	ND	ND	ND	ND	UV	1
11	7069+80	-	IVS11+80delTTAA	c.6841+80_6841+83delTTAA	-	IVS	ND	ND	ND	ND	13: 32915413 - 32915416	rs11571661	-	-	-	Creation of an intronic ESE site. Probably no impact on splicing.	Importância Clínica Desconhecida	ND	1-Neutro	ND	Benigna	6
14	7470	2414	7470A>G	c.7242A>G	p.Ser2414=	Syn	0.2244	G=0.2326/1165	0.23 (G)	0.21136 (G)	13:32929232	rs1799955	ND	Tolerado (1.00)	ND	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Não patogênico	ND	1-Neutro	Benigna	Benigna	14
14	7625	2466	A2466V	c.7397T>C	p.Ala2466Val	M	0.9937	T=0.0242/121	0.02420 (T)	0.0223 (G)	13: 32929387	rs169547	Possivelmente Danoso (0.793)	Tolerado (1.00)	Class C0	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Não patogênico	ND	1-Neutro	Benigna	Benigna	37
15	7697	2490	I2490T	c.7469T>C	p.Ile2490Thr	M	0.01436	C=0.0160/80	0.02 (C)	0.00161 (C)	13:32930598	rs11571707	Benigno (0.010)	Tolerado (0.105)	Class C45	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Não patogênico	ND	1-Neutro	Interpretações conflitantes	Benigna	1
17	8034-14	-	IVS16-14T>C	c.7806-14T>C	-	IVS	0.5208	T=0.4685/2346	0.47 (T)	0.52015 (C)	13:32936646	rs9534262	-	-	-	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Sem importância clínica	ND	1-Neutro	Benigna	Benigna	26
19	8688	2820	8688A>C	c.8460A>C	p.Val2820=	Syn	0.003677	C=0.0144/72	0.01440 (C)	0.01299 (C)	13: 32944667	rs9590940	ND	Tolerado (1.00)	ND	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Não patogênico	ND	1 - Neutro	Benigna	Benigna	1
19	8715+47	-	IVS19+47C>T	c.8487+47C>T	-	IVS	0.004352	T=0.0162/81	0.02 (T)	0.01523 (T)	13:32944741	rs11571744	-	-	-	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Não patogênico	ND	1-Neutro	Benigna	Benigna	3
21	8983-66	-	IVS21-66T>C	c.8755-66T>C	-	IVS	ND	C=0.4884/2446	0.49 (T)	ND	13:32953388	rs4942486	-	-	-	Alteration of an intronic ESS site. Probably no impact on splicing. Creation of an intronic ESE site. Probably no impact on splicing.	Não patogênico	ND	1-Neutro	Benigna	Benigna	28
22	9079	2951	A2951T	c.8851G>A	p.Ala2951Thr	M	0.007853	A=0.0100/50	0.01 (A)	0.00044 (T)	13:32953550	rs11571769	Provavelmente Danoso (1.00)	Danoso (0.00)	Class C55	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Sem importância clínica	ND	1-Neutro	Benigna	Benigna	1
24	9485-16	-	IVS24-16T>C	c.9257-16T>C	-	IVS	0.007647	C=0.0044/22	0.00440 (C)	0.00592 (C)	13: 32968810	rs11571818	-	-	-	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.	Não patogênico	ND	1 - Neutro	Benigna	Benigna	1
24	9485-83	-	IVS24-83G>A	c.9257-83G>A	-	IVS	ND	A=0.0505/253	0.05050 (A)	ND	13:32968743	rs9595456	-	-	-	Creation of an intronic ESE site.	Não patogênico	effect unknown (4); not affect function (1); effect not classified (1)	1-Neutra	Benigna	Benigna	

Tabela 6 - Alterações encontradas no gene *BRCA2*. (Conclusão)

27	10204	3326	K3326X	c.9976A>T	p.Lys3326Ter	N	0.007017	T=0.0044/22	0.00440 (T)	0.00646 (T)	13: 32972626	rs11571833	ND	ND	ND	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing. Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.	Sem importância clínica	ND	1 - Neutro	Benigna	Benigna	1
27	10338	3370	R3370R	c.10110G>A	p.Arg3370=	Syn	0.001469	A=0.0008/4	0.00080 (A)	0.00215 (A)	13:32972760	rs28897762	ND	Tolerado (1.00)	ND	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.	Importância Clínica Desconhecida	ND	1-Neutro	Interpretações conflitantes	Benigna	1
27	10462	3412	I3412V	c.10234A>G	p.Ile3412Val	M	0.02266	G=0.0449/225	0.04 (G)	0.03729 (G)	13:32972884	rs1801426	Benigno (0.002)	Tolerado (0.923)	Class C0	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.	Sem importância clínica	ND	1-Neutro	Benigna	Provavelmente Benigna	1

NT, nucleotídeo; HGVS, Human Genome Variation Society; Tipo: Syn, Sinônimia; F, Frameshift; IVS, Variante Intrônica ; M, Missense; S, variante com efeito no splicing;MAF, frequência do alelo menor; SIFT: Variante Tolerada (benigna) or Danosa; Align GVGD: Class C0 (menos provavel de interferir com a função da proteína), C15, C25, C35, C45, C55, C65 (mais provável de interfereir na função da proteína); BIC, Breast Cancer Information Core; LOVD, Leiden Open Variation Database (a variante afeta a função da proteína, conforme conclusão do curador); LOVD-IARC, Leiden Open Variation Database - International Agency for Research on Cancer; BRCA Share™, Mutation Database Universal; UV, variante não classificada; n, número de pacientes com a variante; ND, informação não

4.3 MLPA

O método de MLPA foi utilizado para identificar grandes rearranjos genômicos em *BRCA1/BRCA2*. O teste foi realizado nas pacientes nas pacientes em que não foi encontrada mutação deletéria no sequenciamento feito através da plataforma Ion Torrent e em todas as pacientes do método de Sanger, totalizando 46 pacientes. O resultado pode ser avaliado em 30 e 15 pacientes em relação a *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente e todos foram negativos. Para ambos os genes, nas demais pacientes não foi possível avaliar os resultados por conta de falha na ligação das sondas às amostras ou por falha no processo de desnaturação do DNA ou por baixa concentração da amostra no momento da realização da reação.

4.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Sequenciamento do gene *PRKD1* pelo método de Sanger

Para analisar as duas regiões de fosforilação do domínio quinase do gene *PRKD1*, foram desenhados 4 conjuntos de primers. (Tabela 4). A adequação do conjunto de primers para análise da região de interesse foi testada por PCR e para verificar se era possível a visualização da sequência inteira da região de interesse foi realizado também sequenciamento. Os conjuntos que apresentaram os melhores resultados foram o C2 para as Ser⁷³⁸/Ser⁷⁴² e D2 para a Ser⁹¹⁰.

Tabela 4 - Desenho de primers - *PRKD1*

Conjuntos de <i>primers</i>	Temperatura de <i>melting</i> (T m)	GC%	Sequência	Tamanho do produto (bp)
⁷³⁸ Ser /Ser ⁷⁴² PRKD1_C1 Forward PRKD1_C1 Reverse	59.48	39.13	tggtgtatctggtgaatctgaa	207
PRKD1_C2 Forward PRKD1_C2 Reverse	59.98	55.00	GAGAGCGATTGTAGCCCTTG	
PRKD1_C2 Forward PRKD1_C2 Reverse	60.67	40.91	tgtgaacggagtatttctgcaa	259
PRKD1_D1 Forward	59.13	45.00	GCATTCTGAATTTGGTCGTG	
PRKD1_D1 Forward	60.05	55.00	GATGACCTGAGGTGGGAGAA	229
PRKD1_D1 Forward	58.93	45.00	CAGTTCTGCAAGGCAAATGT	

PRKD1_D1 Reverse

Tabela 4 . Desenhos dos *primers* *PRKD1* (Conclusão)

Conjuntos de <i>primers</i>	Temperatura de <i>melting</i> (T m)	GC%	Sequência	Tamanho do produto (bp)
PRKD1_D2 Forward	62.00	50.00	ACCTGAGGTGGGAGAAGTAT	225
PRKD1_D2 Reverse	62.00	40.09	CAGTTCTGCAAGGCAAATGTT A	
PRKD1_D3 Forward	59.84	47.62	ACCCATGAAAGTGATGACCTG	
PRKD1_D3 Reverse	60.49	40.61	AAATAATGGCAGTTCTGCAAG G	250

Figura – Foto de eletroforese em gel realizada para confirmar o funcionamento dos *primers* desenhados para *PRKD1*.

Após a realização do sequenciamento da região da Ser⁹¹⁰ de 14 pacientes, em 8 delas não foi encontrada nenhuma mutação e nas demais,

não foi possível identificar mutações pois a qualidade do ensaio foi prejudicada.

4.5 Análise de *PRKD1* em bancos de dados

As mutações somáticas *PRKD1* em amostras de câncer de mama foram pesquisadas no banco de dados *COSMIC*. Em 2773 amostras, em 15 (0,54%) mutações em *PRKD1* foram identificadas. A idade média das mulheres foi de 56,5 anos e em 70% (7/10) o tumor foi classificado como subtipos molecular luminal. Nove variantes (9/15, 60%) encontradas no *COSMIC* foram classificadas como patogênicas pela análise *in silico* por pelo menos 3 preditores. Foi possível obter informações sobre o domínio em que a mutação estava localizada em quatro destas variantes, sendo que três ocorrem no domínio da quinase.

Tabela 7 – Dados de *PRKD1* extraídos do banco de dados *COSMIC* e análises realizadas *in silico*.

ID Amostra	Idade	Subtipo Molecular	cDNA	Proteína	Tipo de mutação	Domínio	FAMTHH	SIFT	Polyphen	Align GVGD	Human Splicing Finder
DN120F F	54	Luminal B	c.300G> T	p.K100N	Missense	No Pfam annotations found	Patogênico (score 0.84)	Danoso (0.008)	Possivelmente Danoso (0.78)	Class C65	Alteration of an exonic ESE site. Potential alteration of splicing.
MBC_43	ND	Luminal	c.385A> T	p.I129F	Missense	No Pfam annotations found	Patogênico (score 0.71)	Danoso (0.002)	Benigno (0.007)	Class C15	No significant splicing motif alteration detected. This mutation has probably no impact on splicing.
PD4120a	60	Luminal	c.523C> G	p.L175V	Missense	C1_1: Phorbol esters/diacylglycerol binding domain (C1 domain) (150 - 197)	Patogênico (score 0.99)	Tolerado (0.067)	Provavelmente Danoso (0.996)	Class C25	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.
TCGA-GM-A2DB-01	62	ND	c.742A> G	p.N248D	Missense	No Pfam annotations found	Patogênico (score 0.86)	Tolerado (0.410)	Benigno (0.001)	Class C15	ND
TCGA-B6-A0I2-01	45	ND	c.967G> T	p.E323*	Nonsense	No Pfam annotations found	Patogênico (score 0.93)	ND	ND	ND	ND
PD22355a	44	Triplo Negativo	c.969A> G	p.E323E	Sinônima	No Pfam annotations found	Patogênico (score 0.85)	Tolerado (1.000)	ND	ND	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of

splicing.

Tabela 7 – Dados de *PRKD1* extraídos do banco de dados *COSMIC* e análises realizadas *in silico*. (Continuação)

ID Amostra	Idade	Subtipo Molecular	cDNA	Proteína	Tipo de mutação	Domínio	FAMTHH	SIFT	Polyphen	Align GVGD	Human Splicing Finder
TCGA-AR-A1AI-01	47	ND	c.1756G>C	p.D586H	Missense	No Pfam annotations found	Patogênico (score 0.99)	Danoso (0.001)	Provavelmente Danoso (0.965)	Class C65	ND
S0004	53	ND	c.1828G>A	p.A610T	Missense	Pkinase: Protein kinase domain (587-839)	Patogênico (score 0.98)	Danoso (0.001)	Provavelmente Danoso (1.000)	Class C55	ND
MTC19	64	Triplo Negativo	c.2065C>A	p.Q689K	Missense	Pkinase: Protein kinase domain (587-839)	Patogênico (score 0.99)	Danoso (0.000)	Provavelmente Danoso (0.995)	Class C45	Creation of an exonic ESS site. Potential alteration of splicing.
PD14437a	≥80	Luminal	c.2113T>G	p.C705G	Missense	Pkinase: Protein kinase domain (587-839)	Patogênico (score 0.99)	Danoso (0.000)	Possivelmente Danoso (0.758)	Class C65	ND
MBC_207	ND	Luminal	c.2571G>A	p.E857E	coding silent	No Pfam annotations found	ND	Tolerado (1.000)	ND	ND	ND
BRC49/16589	56	Luminal A	c.2584C>T	p.H862Y	Missense	No Pfam annotations found	Patogênico (score 0.99)	Danoso (0.001)	Provavelmente Danoso (0.999))	Class C65	ND

Tabela 7 - Dados de *PRKD1* extraídos do banco de dados *COSMIC* e análises realizadas *in silico*. (Conclusão)

ID Amostra	Idade	Subtipo Molecular	cDNA	Proteína	Tipo de mutação	Domínio	FAMTHH	SIFT	Polyphen	Align GVGD	Human Splicing Finder
TCGA-A8-A0A6-01	64	ND	c.2592T>G	p.S864R	Missense	No Pfam annotations found	Neutro (score 0.19)	Danoso (0.001)	Provavelmente Danoso com score de 0.996 (sensitivity: 0.55; specificity: 0.98)	Class C65	ND
DN15007	46	HER2 ⁺	c.2621G>A	p.G874D	Missense	No Pfam annotations found	Neutro (score 0.39)	Tolerado (0.622)	Benigno com score de 0.000 (sensitivity: 1.00; specificity: 0.00)	Class C65	ND
PD4953a	67	Luminal	c.1725+5 G>C	p.?	Intronic	ND	Patogênico (score 0.99)	record not found	ND	ND	ND

Foram construídas, com o uso da ferramenta *online* KM Plotter, curvas de sobrevida geral, sobrevida livre de recidiva e sobrevida livre de metástase distantes, levando em consideração a expressão de *PRKD1*. A expressão elevada de *PRKD1* está relacionada com melhor prognóstico, avaliado por maior sobrevida (Figura11).

Figura 11 – Curvas de Kaplan Meier, relativas a expressão de *PRKD1* em pacientes de câncer de mama, construídos na ferramenta *KM Plotter*.

5. DISCUSSÃO

Os dados clinicopatológicos das pacientes incluídas neste estudo apontam um grupo onde a maioria possui subtipo molecular luminal e doença localizada. Há de se destacar o fato da maioria das pacientes serem classificadas no subtipo Luminal B. O subtipo molecular Luminal B, comparado com o subtipo Luminal A, tem expressão maior de genes ligados a proliferação e ciclo celular (*MKI67*, *CCNB1* e *MYBL2*, respectivamente) (Ades et al, 2014). Possui um comportamento clínico mais agressivo do que Luminal A, como uma inferior sobrevida livre de recidiva à distância após cinco e dez anos, independente de terapia adjuvante sistêmica, e uma resposta inferior ao tratamento com terapia endócrina, além das curvas de sobrevida serem parecidas com as do subtipo *basal-like* por volta de dez anos de acompanhamento (Prat et al., 2015). Dessa forma é necessário que essas particularidades sejam observadas ao lidar com pacientes em que tumor seja categorizado nesse subtipo, mesmo que sejam idosas e a doença tenda a se apresentar de maneira mais branda do que nas mais jovens.

Quanto ao sequenciamento de *BRCA1* e *BRCA2* das 49 pacientes, até o momento, quatro apresentaram variantes patogênicas. Analisando outros estudos realizados no Brasil, ocorre uma variação grande na frequência de variantes patogênicas encontradas: 0% a 22,5% (Lourenço et al., 2004; Dufloth et al., 2005; Gomes et al., 2007; Esteves et al., 2009; Ewald et al., 2011; Dillenburg et al., 2012; Carraro et al., 2013; Felix et al., 2014; Silva et al., 2014; Schayek et al., 2016; Alemar et al., 2016; Fernandes et al., 2016; Maistro et al., 2016; Alemar et al., 2017). Essa discrepância pode ser devido à metodologia diferente e aos critérios de seleção escolhidos para realizar cada estudo.

Levando em consideração apenas os estudos com critérios de inclusão e metodologia semelhante ao proposto para este trabalho (Carraro et al, 2013; Silva et al, 2014 e Fernandes et al, 2016), podemos observar que mesmo sem usar uma restrição de idade na inclusão critérios, a idade mediana das pacientes de outros estudos (41 anos) foi muito inferior à que obtivemos de nossos pacientes (62 anos). Essa diferença pode ser explicada pelo próprio critério de inclusão, em que

cada paciente jovem (<35 anos) é candidato a testes genéticos. Para pacientes com mais de 50 anos é necessário observar critérios mais detalhados, o que pode levar a uma maior dificuldade em incluir esses pacientes. Além disso, nestes estudos, a detecção de variantes patogênicas foi maior em *BRCA1* do que em *BRCA2*. Uma vez que nossa coorte é menor do que os outros estudos, isso pode não ter causado diferença na frequência de variantes patogênicas encontradas entre os dois genes.

Trinta e dois (65%) dos pacientes relataram parentes de primeiro grau com câncer de mama / ovário / próstata, uma vez que ter uma história familiar positiva foi um critério de inclusão e, portanto, esse fato não reflete necessariamente a realidade da maioria dos pacientes com câncer de mama. No entanto, todos os pacientes em quem a variante patogênica foi identificada tiveram parentes de primeiro grau também afetados. Nos demais trabalhos realizados no Brasil, observou-se o mesmo. Silva et al. (2014) observaram que, em 120 pacientes, a maioria dos portadores de mutação (45%) preenchia o critério de ter câncer de mama diagnosticado ≤ 45 anos e história familiar positiva para câncer de mama e que em pacientes mais jovens sem história familiar não foi identificada nenhuma variante patogênica. Esses dados estão em linha com os achados de Metcalfe et al (2010): o risco de desenvolver câncer de mama é ainda maior em portadores de mutação *BRCA1/2* que têm parentes de primeiro grau afetados. Essas evidências indicam que a história familiar é de grande importância na determinação do risco de câncer de mama, independentemente da identificação de uma variante patogênica em *BRCA1 / 2*.

As variantes patogênicas encontradas, até o momento atual, foram: c. 5074+2T>C (*BRCA1*), c.5123C>A (*BRCA1*), c. 2T>G (*BRCA2*), c. c.5645C>A (*BRCA2*). Foram identificadas também variantes que não estão descritas em nenhum dos bancos de dados, nem na literatura: a) c.301+44A>G (*BRCA1*), b) c.3371A>G (*BRCA2*) que é classificada como deletéria por três preditores diferente, entretanto, não parece estar localizado em nenhum domínio importante; e c.6841+53delTATTCAGTAG (*BRCA2*).

A variante c. 5074+2T>C no gene *BRCA1* está localizada na sequência consenso da região 5' da junção exon/intron, que possui um alta conservação entre espécies. A troca de nucleotídeos nesta posição não permite que o RNA spliceossomal U1 se acople, impedindo que se forme o spliceossomo, responsável pela retirada dos introns (Ast, 2004). A paciente na qual esta variante foi encontrada relatou que possui a mãe com câncer de mama aos 68 anos e uma prima que teve câncer de mama aos 46 anos (Figura 12). Também foi identificada por Lourenço et al. (2004) e Maistro et al. (2016).

Figura 12. Heredograma da paciente portadora da variante c. 5074+2T>C (*BRCA1*).

No caso da variante c.5123C>A, é classificada como uma variante *missense*, ou seja, a troca do nucleotídeo muda o aminoácido que será codificado, porém, em primeiro momento, não há como avaliar se esta troca pode levar a formação de uma proteína defeituosa. A troca de aminoácidos que ocorre na formação da proteína é de alanina por glutamina, na região onde é codificado o domínio BRCT cuja função é facilitar a integração de *brca1* com as demais proteínas envolvidas no reparo de DNA de dupla fita (Karami e Mehdipour, 2013). Também foi observado que a variante causa *skipping* do exon 18 por causar o aumento da ligação de repressores de *splicing* (Sanz et al., 2010). Há evidências de que seja mutação fundadora na região da Espanha (Diez et al, 2003). Está

presente numa paciente que relatou que suas duas irmãs foram diagnosticadas com câncer de mama (33 e 40 anos), assim como uma tia do lado paterno (40 anos) (Figura 13). Também foi identificada em paciente brasileira por Silva et al (2014).

Figura 13. Heredograma da paciente portadora da variante c. 5123C>A (*BRCA1*).

Ao avaliarmos a variante c. 2 T>G, observamos que resulta na troca do aminoácido metionina pelo aminoácido arginina em um códon de iniciação, causando, assim, a perda desta informação no momento da tradução do RNA mensageiro em proteína. O exon 4 possui códon para metionina, o que poderia levar a produção da proteína, no entanto, sem os domínios de transativação e fosforilação, presentes nos exons 2 e 3 e importantes para que a proteína *brca2* exerça sua função (Santos et al, 2014). A paciente na qual a mutação foi encontrada relatou que uma das irmãs teve câncer de mama aos 55 anos e uma sobrinha com câncer de mama aos 41 anos (Figura 14). Fernandes et al (2016) identificou essa variante em duas pacientes e Alemar et al. (2017) identificou em uma paciente.

Figura 14. Heredograma da paciente portadora da variante c. 2T>G (*BRCA2*).

A variante c.5645C>A (*BRCA2*) é do tipo *nonsense*, no qual a troca de nucleotídeos faz com que se forme um códon de parada em uma posição indevida, acarretando na formação de uma proteína truncada. Essa variante foi identificada em estudos realizados na população do Japão e em mulheres que tiveram câncer de ovário (Sugano et al, 2008; Hirotsu et al., 2015; Sakamoto et al, 2016). Este perfil é similar ao da paciente do nosso estudo em que a mutação foi identificada, que também tem um irmão com câncer de próstata aos 80 anos e uma filha com câncer de mama aos 49 anos (Figura 15)

Figura 15. Heredograma da paciente portadora da variante c. 2T>G (*BRCA2*).

Analisando as informações contidas no *COSMIC* observa-se que as mutações no gene parecem não serem frequentes no câncer de mama e que as amostras provêm de mulheres com perfil semelhante ao das nossas pacientes. Esses dados corroboram o fato de que não encontramos nenhuma variante em nossos pacientes, uma vez que a população estudada foi similar, mas a deste estudo é muito menor e nos concentramos em regiões muito específicas do gene. Ainda segundo dados do *COSMIC*, *PRKD1* apresenta maiores frequência de mutação em câncer de intestino grosso (4,22%) e pele (4,02%) e podem ocorrer ao longo do gene inteiro, com predomínio da região do domínio quinase. Nenhum estudo prévio, de que tenhamos conhecimento, estudou mutações somáticas em câncer de mama em *PRKD1*.

Entretanto, as curvas de sobrevida construídas no KM Plotter demonstram a alta expressão do gene parece ter impacto positivo na sobrevida das pacientes, podendo atuar como um marcador de prognóstico. Uma das explicações possíveis para esta relação seria o fato de que *PRKD1* participa da manutenção das características epiteliais dos tecidos em que é expresso, evitando o início do processo de metástase, através de: 1) estabilização da adesão focal entre as células e a matriz celular ao fosforilar a enzima PIP5Kly (fosfatidilinositol-4-fosfato 5-quinase tipo-I gama) na Ser⁴⁴⁸ próxima ao domínio quinase, levando a diminuição da sua capacidade de fosforilar PI4,5P2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) e impedindo o *turnover* da adesão focal (Durand et al, 2016) e 2) inibição da capacidade de migração das células, através da fosforilação de *SSH1L* na Ser⁹⁷⁸, o que facilita a ligação da proteína 14-3-3, causando diminuição da capacidade de *SSH1L* de desfosforilar e ativar *cofilin*, responsável por romper e despolimerizar os filamentos de actina para criação de novos filamentos e, conseqüentemente, da formação da protusões celulares (Eiseler et al., 2009b). Assim sendo, a alta expressão de *PRKD1* mantém o perfil epitelial das células do tecido mamário, impedindo a ocorrência de metástase e aumentando a sobrevida das pacientes, o que sugere que *PRKD1* atue como gene supressor de tumor em câncer de mama.

Apesar dessas evidências, não há muitas informações de como *PRKD1* atua, *in vivo* para o câncer de mama, seja em estudos com animais (com modificações genéticas ou não) ou avaliando-o em pacientes, que poderiam tornar ainda mais claro o papel de *PRKD1*. Em trabalho publicado recentemente, Fontelles et al (2016) observaram que ratas descendentes de ratos que tiveram uma alimentação baseada em banha de porco, após a indução através do carcinogênico DMBA, tinham uma alta incidência de tumores nas mamas e maior número de células proliferativas, se comparadas com ratas da prole de ratos que foram alimentados com a dieta controle ou alimentação a base de óleo de milho. Foi realizada uma comparação do perfil de expressão de miRNA entre os espermatozoides dos ratos e as glândulas mamárias das descendentes, que apontou que os miR-1897-5p, miR-219-1-3p e miR-376a# estavam com baixa expressão tanto nos espermatozoides quanto nas glândulas mamárias das descendentes dos ratos alimentados a base de óleo de milho. Dentre os alvos desses miRNA está a *protein kinase D1* (Pkd1) que apresentou níveis diferentes em comparação dos três grupos. A proteína Pkd1 tinha níveis mais elevados entre as ratas descendentes dos ratos que haviam recebido alimentação a base de óleo de milho.

6.CONCLUSÃO

As mutações somáticas *PRKD1* são de baixa frequência em mulheres com câncer de mama e seu papel na prevenção da metástase em câncer de mama pode estar relacionado a outros mecanismos como a metilação do DNA.

As variantes patogênicas *BRCA1* e *BRCA2* foram identificadas em 8% de pacientes com câncer de mama pós-menopausa até o momento. Estas pacientes relataram um parente de primeiro grau diagnosticado com câncer de mama / ovário / próstata, sugerindo que uma história familiar forte deva ser levada em consideração em mulheres pós-menopausa.

7. ANEXOS

ANEXO A – Critérios para classificação de variantes segundo a ACMG e AMP

1. Critérios para classificação benigna

I) Evidência Única

Frequência alélica acima de 5% no Projeto Exome Sequencing, Projeto 1000 Genomas ou Consórcio Exome Aggregation (ExAC).

II) Evidência Forte

- a) Frequência é maior do que o esperado para a doença;
- b) Observada em um indivíduo saudável para uma doença recessiva (homozigoto), dominante (heterozigoto) ou ligada ao X (hemigose), compenetrância total esperada para determinada idade;
- c) Estudos *in vitro* ou *in vivo* bem estabelecidos mostrando nenhum efeito danoso na função da proteína ou no splicing
- d) Falta de segregação em membros afetados da família.

III) Evidência Suporte

- a) Variante *missense* em um gene no qual variantes truncadoras são conhecidas por causar a doença;
- b) Observada em trans com uma variante patogênica para gene/doença com penetrância completa ou observada em cis com uma variante patogênica de qualquer padrão de herança;
- c) Deleção/inserção in frame em uma região repetitiva com função desconhecida;
- d) Múltiplas evidências computacionais sugerem que não impacto no gene ou no produto gênico;
- e) Variante sinonímia (silenciosa) na qual os algoritmos preditores de splicing não predizem impacto nas sequências consenso nem a criação de um novo sítio de splicing e o nucleotídeo não é altamente conservado.

2. Critérios para classificação em variante patogênica

I) Evidência Muito Forte

- a) variante nula (nonsense, frameshift, sítio de splicing canônico ± 1 ou 2, códon de iniciação, deleção de um ou vários exons) em um gene onde a perda de função é um mecanismo conhecido de doença.

II) Evidência Forte

- a) Alteração do mesmo aminoácido como uma variante patogênica previamente estabelecida, independentemente da mudança de nucleotídeo
- b) Mutação de novo (confirmada por amostras parentais negativas) em um paciente com a doença e sem história familiar
- c) Estudos funcionais *in vitro* ou *in vivo* bem estabelecidos que evidenciam um efeito prejudicial sobre o gene ou produto genético
- d) A prevalência da variante em indivíduos afetados aumenta significativamente em comparação com a prevalência em controles

III) Evidência Moderada

- a) Localizado em um hot spot mutacional e / ou domínio funcional crítico e bem estabelecido (por exemplo, local ativo de uma enzima) sem variação benigna;
- b) Ausente aos controles (ou em uma frequência extremamente baixa se doença for recessiva) no Projeto Exome Sequencing, 1000 Genomes Project ou Consórcio

Exome Aggregation

- b) Para transtornos recessivos, detectados em trans com uma variante patogênica
- c) O comprimento das proteínas muda como resultado de exclusões / inserções in frame em uma região não repetitiva ou variantes stop-loss
- d) Nova variante missense em um resíduo de aminoácido onde uma outra variante missense foi determinada a ser patogênica anteriormente
- e) Mutação presumidamente de novo, mas sem informação sobre as amostras parentais

IV)Evidência Suporte

- a) Cosegregação com doença em múltiplos membros da família afetados em um gene que definitivamente é conhecido por causar a doença
- b) Variante missense em um gene que possui uma baixa taxa de variantes missense benignas e no qual as variantes missense são um mecanismo comum de doença
- c) Várias linhas de evidência computacional suportam um efeito deletério sobre o gene ou produto genético (conservação, evolução, impacto de empalme, etc.)
- d) O fenótipo do paciente ou história familiar é altamente específico para uma doença com uma única etiologia genética
- e) Fonte respeitável recentemente relata variante como patogênica, mas a evidência não está disponível para o laboratório para realizar uma avaliação independente

Combinações dos critérios para classificação das variantes

1. Patogênico

- I. 1 Evidência muito forte E $\geq$ 1 Evidência forte OU $\geq$ 2 Evidências moderadas OU 1 evidência moderada e 1 evidência suporte OU $\geq$ 2 evidências suporte
- II. $\geq$ 2 evidências fortes
- III. 1 evidência forte E $\geq$ 3 evidências moderadas OU 2 evidências moderadas E $\geq$ 2 Evidências suporte OU 1 evidência moderada E $\geq$ 4 evidência suporte

2. Provavelmente Patogênico

- I. 1 Evidência muito forte E 1 Evidência moderada
- II. 1 Evidência Forte E 1-2 Evidências moderadas
- III. 1 Evidência Forte E $\geq$ 2 Evidência suporte
- IV. $\geq$ 3 Evidência moderada
- V. 2 Evidência moderada E $\geq$ 2 evidências suporte
- VI. 1 Evidência moderada E $\geq$ 4 evidências suporte

3. Benigna

- I. Evidência única
- II. $\geq$ 2 Evidência forte

4. Provavelmente Benigna

- I. 1 Evidência forte e 1 evidência suporte
- II. $\geq$ 2 Evidências suporte

5. Significado Incerto

- I. Não se encaixa em nenhuma das combinações anteriores
- II. Os critérios para benigno e patogênico são contraditórios.

BRCA2

[illegible][illegible]

Cinza: A ser analisado; Branco: Concluído; F = *Primer Forward*; R= *Primer Reverse*

8. REFERÊNCIAS

Ades F, Zardavas D, Bozovic-Spasojevic I, Pugliano L, Fumagalli D, de Azambuja E et al. Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives. *J Clin Oncol*. 2014 Sep 1;32(25):2794-803.

Aleamar B, Herzog J, Brinckmann Oliveira Netto C, Artigalás O, Schwartz IVD, Matzenbacher Bittar C, Ashton-Prolla P, Weitzel JN2. Prevalence of Hispanic BRCA1 and BRCA2 mutations among hereditary breast and ovarian cancer patients from Brazil reveals differences among Latin American populations. *Cancer Genet*. 2016 Sep;209(9):417-422.

Aleamar B, Gregório C, Herzog J, Matzenbacher Bittar C, Brinckmann Oliveira Netto C, Artigalás O et al. BRCA1 and BRCA2 mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population? *PLoS One*. 2017 Nov 21;12(11):e0187630.

Ast G. How did alternative splicing evolve? *Nat Rev Genet*. 2004 Oct;5(10):773-82.

Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, Brown KK, Carter SL, Frederick AM et al. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature*. 2012 Jun 20;486(7403):405-409.

Bastea LI, Döppler H, Balogun B, Storz P. Protein kinase D1 maintains the epithelial phenotype by inducing a DNA-bound, inactive SNAI1 transcriptional repressor complex. *PLoS One*. 2012;7(1):e30459.

Bérout C, Collod-Bérout G, Boileau C, Soussi T, Junien C. UMD (Universal mutation database): a generic software to build and analyze locus-specific databases. *Hum Mutat*. 2000;15(1):86-94.

Borges S, Döppler H, Perez EA, Andorfer CA, Sun Z, Anastasiadis PZ et al. Pharmacologic reversion of epigenetic silencing of the PRKD1 promoter blocks

breast tumor cell invasion and metastasis. *Breast Cancer Res.* 2013 Aug 23;15(2):R66.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012 Oct 4;490(7418):61-70.

Carraro DM, Koike Folgueira MA, Garcia Lisboa BC, Ribeiro Olivieri EH, Vitorino Krepischi 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.* 2013;8(3):e57581.

Chaussade C, Cho K, Mawson C, Rewcastle GW, Shepherd PR: Functional differences between two classes of oncogenic mutation in the PIK3CA gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009, 381: 577-581.

Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009 May 20;101(10):736-50.

Cizkova M, Susini A, Vacher S, Cizeron-Clairac G, Andrieu C, Driouch K et al. PIK3CA mutation impact on survival in breast cancer patients and in ER α , PR and ERBB2-based subgroups. *Breast Cancer Res.* 2012 Feb 13;14(1):R28

Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol.* 2015 Aug;26(8):1533-46.

DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A., Breast cancer statistics 2013. *CA Cancer J Clin.* 2014; 64(1): 52-62.

Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 2009 May;37(9):e67

Diab SG, Elledge RM, Clark GM. Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Apr 5;92(7):550-6.

Díez O, Osorio A, Durán M, Martínez-Ferrandis JI, de la Hoya M, Salazar R et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Hum Mutat.* 2003 Oct;22(4):301-12.

Dillenburg CV, Bandeira IC, Turbino TV, Rossato LG, Dias ES, Bittelbrunn AC et al. Prevalence of 185delAG and 5382insC mutations in BRCA1, and 6174delT in BRCA2 in women of Ashkenazi Jewish origin in southern Brazil. *Genet Mol Biol.* 2012 Jul; 35(3):599-602

Du C, Zhang C, Hassan S, Biswas MH, Balaji KC. Protein kinase D1 suppresses epithelial-to-mesenchymal transition through phosphorylation of snail. *Cancer Res.* 2010 Oct 15;70(20):7810-9.

Dufloth RM, Carvalho S, Heinrich JK, Shinzato JY, dos Santos CC, Zeferino LC et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. *Sao Paulo Med J.* 2005 Jul 7;123(4):192-7.

Durand N, Borges S, Storz P. Functional and therapeutic significance of protein kinase D enzymes in invasive breast cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2015 Nov;72(22):4369-82

Durand N, Bastea LI, Long J, Doppler H, Ling K, Storz P. Protein Kinase D1 regulates focal adhesion dynamics and cell adhesion through Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type-I gamma. *Sci Rep.* 2016 Oct 24;6:35963

Eiseler T, Döppler H, Yan IK, Goodison S, Storz P. Protein kinase D1 regulates matrix metalloproteinase expression and inhibits breast cancer cell invasion. *Breast Cancer Res.* 2009a;11(1):R13.

Eiseler T, Döppler H, Yan IK, Kitatani K, Mizuno K, Storz P. Protein kinase D1 regulates cofilin-mediated F-actin reorganization and cell motility through slingshot. *Nat Cell Biol.* 2009b May;11(5):545-56.

Ellis MJ, Ding L, Shen D, Luo J, Suman VJ, Wallis JW et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature.* 2012 Jun 20;486(7403):353-360

Elomrani F, Zine M, Afif M. Management of early breast cancer in older women: from screening to treatment. *Breast Cancer (Dove Med Press).* 2015 Jul 7;7:165-71.

Encinas G. *Determinação de mutações somáticas e germinativas em pacientes jovens com câncer de mama.* São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Encinas G, Maistro S, Pasini FS, Katayama MLH, Brentani MM, de Bock GH, Folgueira MAAK. Somatic mutations in breast cancer and serous ovarian cancer young patients: a systematic review and meta-analysis. *Rev Assoc Med Bras* 2015

Engel C, Fischer C. Breast Cancer Risks and Risk Prediction Models. *Breast Care (Basel).* 2015 Feb;10(1):7-12

Esteves VF, Thuler LC, Amêndola LC, Koifman RJ, Koifman S, Frankel PP et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in families with medium and high risk of breast and ovarian cancer in Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2009 May;42(5):453-7.

Exome Aggregation Consortium. Disponível em: <http://exac.broadinstitute.org/>. Último acesso: Março, 2018

Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA. Disponível em: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>). Último acesso: Março, 2018

Ewald IP, Izetti P, Vargas FR, Moreira MA, Moreira AS, Moreira-Filho CA et al. Prevalence of the BRCA1 founder mutation c.5266dup in Brazilian individuals at-

risk for the hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *Hered Cancer Clin Pract.* 2011 Dec 20;9: 12.

Felix GE, Abe-Sandes C, Machado-Lopes TM, Bomfim TF, Guindalini RS, Santos VC et al. Germline mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population. *Hum Genome Var.* 2014 Oct 16;1:14012.

Fernandes GC, Michelli RA, Galvão HC, Paula AE, Pereira R, Andrade C et al. Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. *Oncotarget.* 2016 Dec 6;7(49):80465-80481.

Fontelles CC, Guido LN, Rosim MP, Andrade Fde O, Jin L, Inchauspe J. Paternal programming of breast cancer risk in daughters in a rat model: opposing effects of animal- and plant-based high-fat diets. *Breast Cancer Res.* 2016 Jul 26;18(1):7

Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, Bamford 2, Bindal N, Tate J, Cole CG et al. COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 4;45(D1):D777-D783

Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat.* 2011 May;32(5):557-63.

Gomes MC, Costa MM, Borojevic R, Monteiro AN, Vieira R, Koifman S et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil. *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Jul;103(3):349-53

Gyorffy B, Lanczky A, Eklund AC, Denkert C, Budczies J, Li Q, Szallasi Z. An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast

cancer prognosis using microarray data of 1809 patients, *Breast Cancer Res Treatment*, 2010 Oct;123(3):725-31

Hamel N, Feng BJ, Foretova L, Stoppa-Lyonnet D, Narod SA, Imyanitov E et al. On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations. *Eur J Hum Genet*. 2011 Mar;19(3):300-6.

Hirotsu Y, Nakagomi H, Sakamoto I, Amemiya K, Mochizuki H, Omata M Detection of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Japanese population using next-generation sequencing. *Mol Genet Genomic Med*. 2015 Mar;3(2):121-9.

Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, Samuels Y, Velculescu VE, Kinzler KW et al. The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. *Science*. 2007 Dec 14;318(5857):1744-8.

INCA. Estimativa 2016/2017. Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/index.asp> Acessado em: 12/09/2017.

Janavičius R. Founder BRCA1/2 mutations in the Europe: implications for hereditary breast-ovarian cancer prevention and control. *EPMA J*. 2010 Sep;1(3):397-412.

Karami F, Mehdipour P. A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in Breast Cancer. *BioMed Research International* 2013, ;2013:928562

Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, Gu B et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jan 4;46(D1):D1062-D1067

Lourenço JJ, Vargar FR, Bines J, Santos EM, Lasmar CAP, Costa CH et al. BRCA1 mutations in Brazilians patients. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 4, 500-504 (2004).

Maistro S, Teixeira N, Encinas G, Katayama ML, Niewiadonski VD, Cabral LG et al. Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in epithelial ovarian cancer patients in Brazil. *BMC Cancer*. 2016 Dec 3;16(1):934.

Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H et al. Pathology of breast and ovarian cancer among BRCA1 and BRCA2 mutations carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012 Jan;21(1):134-47.

Mersch J, Jackson MA, Park M, Nebgen D, Peterson SK, Singletary C et al. Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. *Cancer*. 2015 Jan 15;121(2):269-75.

Metcalfe K, Lubinski J, Lynch HT, Ghadirian P, Foulkes WD, Kim-Sing C et al. Family history of cancer and cancer risks in women with BRCA1 or BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst*. 2010 Dec 15;102(24):1874-8.

NCBI 1000 Genomes Browser: Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes>. Último acesso em: Março, 2018

NCBI dbSNP. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>. Último acesso: Março, 2018.

NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology - Genetic/Familial High Risk Assessment: Breast and Ovarian Cancer version 2.2014. Disponível em: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx#detection.

Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res*. 2001 May;11(5):863-74.

Nik-Zainal S, Davies H, Staaf J, Ramakrishna M, Glodzik D, Zou X et al. Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature*. 2016 Jun 2;534(7605):47-54.

Pereira B, Chin SF, Rueda OM, Vollan HK, Provenzano E, Bardwell HA et al. The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nat Commun*. 2016 May 10;7:11479.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.

Prat A, Pineda E, Adamo B, Galván P, Fernández A, Gaba L. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast*. 2015 Nov;24 Suppl 2:S26-35.

Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res*. 2002 Sep 1;30(17):3894-900.

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;17(5):405-24.

Rebbeck TR, Mitra N, Wan F, Sinilnikova OM, Healey S, McGuffog L et al. Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer. *JAMA*. 2015 Apr 7;313(13):1347-61

Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74.

Santos C, Peixoto A, Rocha P, Pinto P, Bizarro S, Pinheiro M. et al. Pathogenicity evaluation of BRCA1 and BRCA2 unclassified variants identified in Portuguese breast/ovarian cancer families. *J Mol Diagn*. 2014 May;16(3):324-34.

Sakamoto I, Hirotsu Y, Nakagomi H, Ouchi H, Ikegami A, Teramoto K et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in Japanese patients with ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. *Cancer*. 2016 Jan 1;122(1):84-90.

Sanz DJ, Acedo A, Infante M, Durán M, Pérez-Cabornero L, Esteban-Cardenosa E et al. A high proportion of DNA variants of BRCA1 and BRCA2 is associated with aberrant splicing in breast/ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2010 Mar 15;16(6):1957-67.

Schayek H, De Marco L, Starinsky-Elbaz S, Rossette M, Laitman Y, Bastos-Rodrigues L, da Silva Filho AL, Friedman E. The rate of recurrent BRCA1, BRCA2, and TP53 mutations in the general population, and unselected ovarian cancer cases, in Belo Horizonte, Brazil. *Cancer Genet*. 2016 Jan-Feb;209(1-2):50-2.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018 Jan;68(1):7-30.

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

Steinberg SF. Regulation of protein kinase D1 activity. *Mol Pharmacol*. 2012 Mar;81(3):284-91.

Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC et al. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*. 2012 Jun 20;486(7403):353-360

Sugano K, Nakamura S, Ando J, Takayama S, Kamata H, Sekiguchi I et al. Cross-sectional analysis of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in Japanese patients suspected to have hereditary breast/ovarian cancer. *Cancer Sci*. 2008 Oct;99(10):1967-76.

Stratton MR, Campbell PJ, Futreal A. The cancer genome. *Nature*. 2009 Apr 9; 458, 719-724.

Szabo C, Masiello A, Ryan JF, Brody LC. The breast cancer information core: database design, structure, and scope. *Hum Mutat*. 2000;16(2):123-31.

Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*. 2004 Aug; 10(8):789-799.

Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jun 5;348(23):2339-47.

Zardavas D, Phillips WA, Loi S. PIK3CA mutations in breast cancer: reconciling findings from preclinical and clinical data. *Breast Cancer Res*. 2014 Jan 23;16(1):201