Giselly Encinas Zanetti

**Determinação de mutações somáticas e germinativas em pacientes
jovens com câncer de mama**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida
Azevedo Koike Folgueira

São Paulo

2015

Giselly Encinas Zanetti

**Determinação de mutações somáticas e germinativas em pacientes
jovens com câncer de mama**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida
Azevedo Koike Folgueira

São Paulo

2015

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida:

Ao meu esposo e amigo, Anderson Zanetti, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos conhecimentos;

Ao Lucas Zanetti, fruto do amor mais forte e verdadeiro, minha metade.

Sem vocês nada valeria a pena.

Agradecimentos

Inúmeras pessoas foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Desta forma, expresso meus sinceros votos de agradecimento a todos.

A minha querida orientadora *Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira*, expresso o meu profundo sentimento de admiração e agradeço por toda orientação e apoio incondicionais que muito contribuíram para elevar os meus conhecimentos científicos. Agradeço de forma especial a todo carinho e confiança a mim dedicados ao longo desses anos;

A *Dra. Maria Mitzi Brentani* por todos os ensinamentos valiosos e essenciais que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e que levarei para toda a minha vida;

Ao *Prof. Dr. Roger Chammas* pela oportunidade de fazer parte deste grupo de pesquisa e pela transmissão de seu conhecimento;

Aos meus queridos e amados *Anderson* e *Lucas*, esposo e filho, por, simplesmente, serem a razão de tudo que faço. Agradeço a Deus todos os dias por tê-los em minha vida. Amo muito vocês;

A toda minha família pela união e por me propiciarem momentos de descontração. Em especial agradeço minha avó *Ana Ignez*, minha mãe *Madalena Bulzico* e meus irmãos *Wellington Encinas* e *Armando Oliveira*. Agradeço também a família do meu esposo, que há muitos anos passou a ser minha família também;

As pesquisadoras e amigas *Fatima Solange Pasini*, *Maria Lucia Hirata Katayama*, *Simone Maistro*, *Rosimeire Roela* e *Tatiane Furuya*, por estarem ao meu lado nos momentos difíceis e contribuírem para meu aprendizado e pela amizade que cultivamos ao longo destes anos;

A *Veronica Sabelnykova* e *Dr. Paul Boutros* pelo auxílio prestado nas análises do sequenciamento do exoma e por toda discussão que tanto enriqueceu este material;

Ao *Dr. Eduardo Lyra* por abrir as portas do IBCC e por toda a atenção despendida, sempre de forma muito carinhosa;

A *Dra. Maria Del Pilar* e *Dra. Ana Carolina Chaves* pelo auxílio na avaliação de pacientes do ICESP, por todas as discussões construtivas realizadas no grupo Hereditário e pelo carinho demonstrado em todos os momentos;

Aos amigos do LIM 24: *Fabyane Garcia, Simone Crestoni, Simone Vieira, Paulo Del Vale, Victor Celso, Elen Bastos, Tauana Nagy, Larissa Cabral, Liliane Santos, Daniela Saccaro, Vivian Marinelli* por todas as discussões, momentos de alegria e cumplicidade;

A todos os colegas e docentes da pós-graduação em Oncologia pelo convívio e aprendizado;

A *Maria José Benevides* e *Cristina Grandal* por toda ajuda com burocracias e com a melhora das imagens, todo carinho e amizade;

Aos Departamentos de Pediatria e Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em especial agradeço a *Fernanda Bertonha, Leandro Ferreira, Maria Cecília Mendonça Coelho* e *Suellen Serafini* por toda assistência e amparo com os reagentes e aparelhos necessários para o desenvolvimento deste trabalho;

Aos patologistas *Dr. Ricardo Basso* e *Dr. Felipe Geyer* pela revisão das lâminas;

A *Dra. Roberta Lelis Dutra* pela ajuda com as reações e análises de MLPA;

A todas adoráveis pacientes que, além de doarem material biológico, doaram seu tempo, suas experiências e uma parte de suas vidas, para contribuírem de forma excepcional com a execução deste trabalho;

A FAPESP pelo apoio financeiro (Bolsa Regular de Doutorado – processo nº 2011/09572-1 e Auxílio à Pesquisa – processo nº 2012/12306-4)

Sumário

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE GENES

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	11
2.1. Objetivo Geral.....	11
2.2. Objetivos Específicos.....	11
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	12
3.1. Casuística.....	12
3.2. Questionário de Antecedentes Pessoais e Hábitos.....	13
3.3. Análise de Mutação Germinativa nos Genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	14
3.4. Análise de Mutação Somática.....	21
3.5. Seleção de Genes para Construção de Painel para Pesquisa de Mutação Somática em Pacientes Jovens com Câncer de Mama.....	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Características das Pacientes e da Doença.....	37
4.2. Questionário.....	39
4.3. Análise de Mutação Germinativa nos Genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	42
4.4. Análise de Mutação Somática.....	54
4.5. Seleção de Genes para Construção de Painel para Pesquisa de Mutação Somática em Pacientes Jovens com Câncer de Mama.....	74
5. DISCUSSÃO.....	79
6. CONCLUSÕES.....	91
7. ANEXOS.....	93
8. REFERÊNCIAS.....	233

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Index utilizados para formação dos <i>pools</i>	24
Figura 2 -	Método de busca dos artigos da meta análise.....	30
Figura 3 -	Alterações com potencial <i>Driver</i> detectadas nos oito tumores luminais.....	59
Figura 4 -	Eletroferograma da alteração c.3140A>T (p.His1047Leu) no gene <i>PIK3CA</i>	62
Figura 5 -	Eletroferograma da alteração c.659A>G (p.Tyr220Cys) no gene <i>TP53</i>	63
Figura 6 -	Frequência de mutação somática nos genes <i>PIK3CA</i> e <i>TP53</i> de acordo com os grupos etários.....	66
Figura 7 -	Frequência de ER e HER2 (expressão positiva ou negativa) de acordo com os grupos etários.....	67
Figura 8 -	Frequência de mutação somática nos genes <i>PIK3CA</i> e <i>TP53</i> com expressão tumoral de ER ou HER2 (expressão positiva ou negativa) de acordo com os grupos etários.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fatores de risco de câncer de mama.....	04
Tabela 2 -	Genes com maior frequência de mutações somáticas em câncer de mama de acordo com marcadores de ER, PR e HER2.....	07
Tabela 3 -	Frequência de mutação germinativa nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> em pacientes jovens de acordo com a população.....	08
Tabela 4 -	Critérios sugestivos de Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário.....	14
Tabela 5 -	Classificação das alterações segundo os bancos de dados.....	19
Tabela 6 -	Artigos selecionados na meta análise.....	32
Tabela 7 -	Dados Clínico-Patológicos das pacientes jovens.....	38
Tabela 8 -	Dados do questionário das pacientes jovens.....	40
Tabela 9 -	História familiar das pacientes jovens.....	41
Tabela 10 -	Cálculo de risco (BOADICEA) e detecção de mutação deletéria nos gene <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	42
Tabela 11 -	Mutações deletérias nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	45
Tabela 12 -	Alterações encontradas no gene <i>BRCA1</i>	46
Tabela 13 -	Alterações encontradas no gene <i>BRCA2</i>	49
Tabela 14 -	Análise in sílico do potencial patogênico das alterações missense classificadas como VUS.....	54
Tabela 15 -	Análise das deleções <i>in frame</i> presentes no gene <i>BRCA1</i> com significado clínico desconhecido.....	54
Tabela 16 -	Características das pacientes para o sequenciamento do exoma.....	55
Tabela 17 -	<i>Sequencing depths</i> por tumor e tecido normal.....	56
Tabela 18 -	Alterações de único nucleotídeo observadas no sequenciamento do exoma.....	56
Tabela 19 -	Alterações somáticas encontradas em câncer de mama de pacientes jovens.....	60
Tabela 20 -	Análise das principais alterações detectadas no sequenciamento do exoma pelo método de Sanger.....	62
Tabela 21 -	Características das pacientes com câncer de mama da meta análise...	64

Tabela 22 -	Frequência de mutação somática nas pacientes jovens vs pacientes mais velhas.....	65
Tabela 23 -	Variáveis associadas com pacientes jovens.....	65
Tabela 24 -	Associação entre ER e HER2 (expressão positiva e negativa) com mutação somática.....	66
Tabela 25 -	Alterações nos exons 9 e 20 do gene <i>PIK3CA</i> e análise in sílico do potencial patogênico nas pacientes jovens.....	70
Tabela 26 -	Características clínico-patológicas de acordo com mutação no gene <i>PIK3CA</i> em pacientes jovens.....	71
Tabela 27 -	Dados clínico-patológicos das pacientes pós menopausadas.....	72
Tabela 28 -	Alterações nos exons 9 e 20 do gene <i>PIK3CA</i> e análise in sílico do potencial patogênico nas pacientes mais idosas.....	73
Tabela 29 -	Alterações observadas no gene <i>PIK3CA</i> em pacientes jovens e mais idosas.....	73
Tabela 30 -	Genes mutados em amostras de pacientes jovens de outros estudos e do presente estudo.....	75
Tabela 31 -	Frequência de genes mutados em câncer de mama segundo o banco de dados COSMIC.....	77
Tabela 32 -	Genes selecionados para o painel.....	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Número de substituições e troca de bases das 310 alterações de um único nucleotídeo observadas no tumor.....	57
Gráfico 2 -	Trinucleotídeo.....	57

LISTA DE GENES

<i>ABCB11</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11
<i>AGTR2</i>	angiotensin II receptor, type 2
<i>AK8</i>	adenylate kinase 8
<i>AKAP9</i>	A kinase (PRKA) anchor protein 9
<i>AKT1</i>	v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
<i>ANKRD5</i>	ankyrin repeat domain 5
<i>ANLN</i>	anillin, actin binding protein
<i>ARHGAP12</i>	Rho GTPase activating protein 12
<i>ARID1A</i>	AT rich interactive domain 1A (SWI-like)
<i>ATM</i>	ATM serine/threonine kinase
<i>AZI2</i>	5-azacytidine induced 2
<i>BRAF</i>	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
<i>BRCA1</i>	breast cancer 1, early onset
<i>BRCA2</i>	breast cancer 2, early onset
<i>BRIP1</i>	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
<i>C2orf57</i>	chromosome 2 open reading frame 57
<i>CACNA1E</i>	calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit
<i>CALB2</i>	calbindin 2
<i>CASP8</i>	caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
<i>CBFB</i>	core-binding factor, beta subunit
<i>CDH1</i>	cadherin 1, type 1
<i>CDKN1B</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
<i>CDKN2A</i>	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<i>CHEK2</i>	checkpoint kinase 2
<i>CHGB</i>	chromogranin B
<i>CHRNA3</i>	cholinergic receptor, nicotinic, beta 3 (neuronal)
<i>CHRNA4</i>	cholinergic receptor, nicotinic, beta 4 (neuronal)
<i>CIITA</i>	class II, major histocompatibility complex, transactivator
<i>CILP2</i>	cartilage intermediate layer protein 2
<i>CNTN6</i>	contactin 6
<i>CYP2A7</i>	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 7
<i>DHX57</i>	DEAH (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 57
<i>DLG2</i>	discs, large homolog 2 (Drosophila)
<i>ELMO3</i>	engulfment and cell motility 3
<i>EML5</i>	echinoderm microtubule associated protein like 5
<i>ENC1</i>	ectodermal-neural cortex 1 (with BTB domain)
<i>EPHB3</i>	EPH receptor B3
<i>EPPK1</i>	epiplakin 1
<i>ERBB2</i>	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
<i>ESR1</i>	estrogen receptor 1

<i>FAM65B</i>	family with sequence similarity 65, member B
<i>FAM96A</i>	family with sequence similarity 96, member A
<i>FBXW7</i>	F-box and WD repeat domain containing 7, E3 ubiquitin protein ligase
<i>FGFR2</i>	fibroblast growth factor receptor 2
<i>FLG</i>	Filaggrin
<i>FNBP1L</i>	formin binding protein 1-like
<i>GATA3</i>	GATA binding protein 3
<i>GLI3</i>	GLI family zinc finger 3
<i>GRHL2</i>	grainyhead-like 2 (Drosophila)
<i>GRIN1</i>	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1
<i>HAUS3</i>	HAUS augmin-like complex, subunit 3
<i>HECW2</i>	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2
<i>HK1</i>	hexokinase 1
<i>IL22</i>	interleukin 22
<i>KMT2C</i>	lysine (K)-specific methyltransferase 2C
<i>KMT2C/MLL3</i>	lysine (K)-specific methyltransferase 2C
<i>KRBA1</i>	KRAB-A domain containing 1
<i>LDLRAP1</i>	low density lipoprotein receptor adaptor protein 1
<i>LONRF3</i>	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 3
<i>LRRC66</i>	leucine rich repeat containing 66
<i>MAMLD1</i>	mastermind-like domain containing 1
<i>MAP2K4</i>	mitogen-activated protein kinase kinase 4
<i>MAP3K1</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, E3 ubiquitin protein ligase
<i>MAP3K8</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8
<i>MED12</i>	mediator complex subunit 12
<i>MTAP</i>	methylthioadenosine phosphorylase
<i>MTHFD2</i>	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase
<i>MYC</i>	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
<i>MYCBP2</i>	MYC binding protein 2, E3 ubiquitin protein ligase
<i>MYH9</i>	myosin, heavy chain 9, non-muscle
<i>MYO1H</i>	myosin IH
<i>NCOA3</i>	nuclear receptor coactivator 3
<i>NDST4</i>	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 4
<i>NES</i>	Nestin
<i>NOL9</i>	nucleolar protein 9
<i>NOTCH1</i>	notch 1
<i>NRK</i>	Nik related kinase
<i>NUDT10</i>	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 10
<i>NUDT11</i>	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 11)
<i>ODC1</i>	ornithine decarboxylase 1
<i>OSR2</i>	odd-skipped related transcription factor 2
<i>PALB2</i>	partner and localizer of BRCA2

<i>PCMI</i>	pericentriolar material 1
<i>PCNT</i>	Pericentrin
<i>PIK3AP1</i>	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1
<i>PIK3CA</i>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
<i>PKHD1</i>	polycystic kidney and hepatic disease 1 (autosomal recessive))
<i>PLA2G4D</i>	phospholipase A2, group IVD (cytosolic)
<i>POC5</i>	POC5 centriolar protein
<i>POLD1</i>	polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit
<i>PPP2R2A</i>	protein phosphatase 2, regulatory subunit B, alpha)
<i>PRICKLE2</i>	prickle homolog 2 (Drosophila)
<i>PRKAR1A</i>	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha
<i>PRKD1</i>	protein kinase D1
<i>PTEN</i>	phosphatase and tensin homolog)
<i>PTK6</i>	protein tyrosine kinase 6
<i>PTPRJ</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, J
<i>RB1</i>	retinoblastoma 1
<i>RCBTB2</i>	regulator of chromosome condensation (RCC1) and BTB (POZ) domain containing protein 2
<i>RIMBP2</i>	RIMS binding protein 2
<i>RNF149</i>	ring finger protein 149
<i>RNF213</i>	ring finger protein 213
<i>RSBN1</i>	round spermatid basic protein 1
<i>RUNX1</i>	runt-related transcription factor 1
<i>RYR2</i>	ryanodine receptor 2 (cardiac)
<i>SEMA6D</i>	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D
<i>SF3B1</i>	splicing factor 3b, subunit 1, 155kDa
<i>SLC13A1</i>	solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporter), member 1
<i>SLC24A4</i>	solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 4
<i>SMURF2</i>	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2
<i>SNX4</i>	sorting nexin 4
<i>SRC</i>	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
<i>STAB1</i>	stabilin 1
<i>STMN2</i>	stathmin 2
<i>SYNE1</i>	spectrin repeat containing, nuclear envelope 1
<i>TCIRG1</i>	T-cell, immune regulator 1, ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A3
<i>TENM4/ODZ4</i>	teneurin transmembrane protein 4
<i>TGFB1</i>	transforming growth factor, beta 1
<i>TOP2A</i>	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
<i>TP53</i>	tumor protein p53
<i>TTC21B</i>	tetratricopeptide repeat domain 21B
<i>TTN</i>	Titin
<i>UBR5</i>	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 5

<i>USH2A</i>	Usher syndrome 2A (autosomal recessive, mild)
<i>WWTR1</i>	WW domain containing transcription regulator 1
<i>ZCCHC24</i>	zinc finger, CCHC domain containing 24
<i>ZFHX4</i>	zinc finger homeobox 4
<i>ZNF33A</i>	zinc finger protein 33A
<i>ZNF462</i>	zinc finger protein 462

RESUMO

Zanetti GE. *Determinação de mutações somáticas e germinativas em pacientes jovens com câncer de mama* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

Aproximadamente 4% das pacientes com câncer de mama têm o diagnóstico abaixo dos 36 anos. Mutação germinativa nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* pode ser um dos fatores de predisposição e a identificação de pacientes carreadoras pode permitir o direcionamento do tratamento e o aconselhamento familiar para medidas de prevenção e detecção precoce. Entretanto, a maioria das pacientes apresenta câncer esporádico e fatores predisponentes são menos evidentes. Para estas pacientes, a identificação de mutações somáticas pode permitir a melhor compreensão da biologia da doença e o desenvolvimento de tratamentos dirigidos a alvos moleculares. Assim, nossos objetivos foram avaliar em pacientes jovens com câncer de mama: história familiar, hábitos de vida, mutação germinativa nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e mutações somáticas no tumor. Oitenta e três pacientes diagnosticadas com câncer de mama entre 18-35 anos foram entrevistadas usando um questionário. O DNA foi extraído do sangue periférico e toda região codificadora dos genes *BRCA1/2* foi sequenciada pelo método de sequenciamento de Sanger e a pesquisa de grandes deleções e inserções foi realizada por Amplificação Dependente da Ligação de Múltiplas Sondas (MLPA). Os resultados foram analisados utilizando-se os programas *Mutation Surveyor v.3.20* e *Chromas version 2.13* e as mutações foram caracterizadas utilizando-se os bancos de dados BIC, LOVD, LOVD-IARC, UMD e ClinVar. O sequenciamento completo do exoma foi realizado em amostras de sangue e tumor fresco congelado de oito pacientes (receptor hormonal positivo, HER2 negativo e *BRCA1/2* tipo selvagem) usando *Nextera Rapid Capture Enrichment* e sequenciadas no Illumina HiSeq 1000. Para detecção de alterações somáticas provenientes do sequenciamento completo do exoma, foi utilizado o programa SomaticSniper (v1.0.2). Foi também analisada a presença de mutação somática no gene *PIK3CA* em amostras tumorais em blocos de parafina de pacientes jovens e pacientes mais idosas com câncer de mama. Além disso, foi realizada uma meta análise para avaliar se mutação somática nos cinco genes mais frequentemente mutados em câncer de mama estão associados à idade precoce. A idade mediana das 83

pacientes ao diagnóstico foi 32 anos (22-35 anos); idade mediana da menarca foi 13 anos (8-19 anos); 71,1% já passaram por pelo menos uma gestação a termo com idade mediana de 22 anos (14-34 anos); 80,7% nunca fumaram; 74,7% não ingerem bebida alcoólica regularmente; a média para índice de massa corpórea foi 25,26 (10,78-41,57). A maioria das pacientes teve diagnóstico de carcinoma ductal invasivo (89,3%), grau histológico III (49,4%), subtipo luminal (65,9%) e com expressão de Ki67 >14% (89,2%). Aproximadamente 52% das pacientes relataram história familiar para câncer de mama, ovário ou próstata. Mutações deletérias nos genes *BRCA1/2* foram detectadas em 13 pacientes (*BRCA1*, n= 4 e *BRCA2*, n= 9). Uma mutação nova, que gera um códon de terminação (c.483T>A; p.Cys161Ter), foi detectada no exon 6 do gene *BRCA2*. O sequenciamento do exoma foi realizado em amostras de oito pacientes carreadoras de *BRCA1/2* tipo selvagem e tumor subtipo luminal e revelou uma média de 39 alterações somáticas por tumor (variando entre 19-74). Foram observadas alterações com potencial *driver* em 53 genes, como *PIK3CA*, *PRKD1*, *PRKARIA* e *PIK3API*, que codificam proteínas tirosina quinase ou proteínas envolvidas na regulação de proteínas quinases; e no gene *POLD1*, que codifica a subunidade catalítica da polimerase delta, com papel na replicação e reparo do DNA. Em uma meta análise observamos que a mutação somática no gene *PIK3CA* é relativamente frequente em pacientes jovens e idosas. Concluindo, mais de 15% das pacientes jovens são carreadoras de mutação deletéria nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*. Em pacientes com câncer esporádico foram encontradas mutações somáticas em genes que codificam proteínas tirosina quinase ou proteínas envolvidas em reparo de DNA. Em consonância com o observado em tumores de pacientes mais idosas, mutação somática no gene *PIK3CA* é relativamente frequente em tumores de pacientes jovens.

Descritores: Neoplasia da mama; Adulto jovem; Mutação em linhagem germinativa; Sequenciamento de nova geração; Exoma; Tecido; Estilo de vida

SUMMARY

Zanetti GE. *Somatic and Germline Mutations in Young Patients with Breast Cancer* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

Approximately 4% of the breast cancer patients have their diagnosis under the age of 36 years and germline mutations in *BRCA1* or *BRCA2* genes is one of the predisposing factors. Identification of patients who are mutation carriers may contribute for the adoption of targeted therapies and for genetic counseling of their family members for early detection or preventive measures. However, most patients present with sporadic cancer where predisposing factors are less understood. In the latter group of patients, the identification of somatic mutations may contribute to a better understanding of the biology of the disease and to the development of molecular targeted therapies. Therefore, our goals were to characterize early onset breast cancer patients for family history, lifestyle, germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes and somatic mutations. Eighty-three breast cancer patients aged 18-35 years were interviewed using a questionnaire. DNA was extracted from peripheral blood and all coding regions of *BRCA1/2* genes were screened by Sanger sequencing and large deletions and insertions were examined by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA). Results were analyzed through Mutation Surveyor v.3.20 and Chromas version 2.13 and searched in BIC Database, LOVD, LOVD-IARC, UMD and ClinVar. Whole exome sequencing was performed in blood and fresh-frozen tumor samples from eight patients (hormone receptor positive, HER2 negative and *BRCA1/2* wild type) using Nextera Rapid Capture Enrichment in an Illumina HiSeq 1000. To detect somatic SNVs from whole exome sequencing data, SomaticSniper (v1.0.2) was used. Somatic mutation in *PIK3CA* gene was then searched in Formaldehyde Fixed-Paraffin Embedded samples from another group of young and older breast cancer patients. In addition, a meta-analysis was performed to evaluate whether somatic mutations in the five genes most frequently mutated in breast cancer patients were associated with an early age onset. Median age of 83 patients at diagnosis was 32 years (22-35y), median age of menarche was 13 years (8-19y); 71.1% patients had at least one born child, median age of first pregnancy was 22 years (14-34y); 80.7% were never smokers; 74.7% reported no regular alcoholic drinking; median body mass index was 25.26 (10.78-41.57). Most

patients presented with invasive ductal carcinoma (89.3%), histological grade III (49.4%), luminal subtype (65.9%) and Ki67 expression >14% (89.2). Approximately 52% of the patients reported a positive family history for breast, ovarian or prostate cancer. Deleterious mutations in *BRCA1/2* genes were detected in 13 patients (*BRCA1*, n= 4 and *BRCA2*, n= 9). One novel mutation was detected in *BRCA1* gene: a stop codon in exon 6 (c.483T>A; p.Cys161Ter). Exome sequencing was evaluated in eight luminal tumors from *BRCA1/2* wild type patients and a median of 39 somatic alterations/tumor was detected, varying from 17 to 74. Potential driver alterations were detected in 53 genes, such as *PIK3CA*, *PRKD1*, *PRKAR1A* and *PIK3AP1*, that encode tyrosine kinase proteins or proteins involved in tyrosine kinases regulation; and *POLD1* gene, that encodes the catalytic subunit of DNA polymerase delta which plays a critical role in DNA replication and repair. A Meta-analysis showed that somatic mutation in *PIK3CA* gene was frequently detected in both young and older patients. In conclusion, more than 15% of the young breast cancer patients are *BRCA1* or *BRCA2* mutation carriers. In patients with sporadic cancer somatic mutations were found in genes that encode tyrosine kinase proteins or are involved in the DNA repair. In agreement with what was observed in tumors from older patients, somatic mutation in *PIK3CA* gene is relatively frequent in tumors from young patients.

Descriptors: Breast neoplasm; Young adult; Germline mutation; High-Throughput Nucleotide Sequencing; Exome; Tissue; Lifestyle

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama, assim como a maioria dos cânceres, faz parte de um grupo de doenças conhecidas como multifatoriais, nas quais múltiplos fatores etiológicos (genéticos e ambientais) interagem de formas variadas e ainda não totalmente conhecidas. Esta neoplasia maligna representa um dos principais problemas de saúde mundialmente (Parkin et al., 2010) e embora acometa milhares de mulheres todos os anos, estimativa de novos casos e as taxas de mortalidade estão diminuindo gradativamente (Jemal et al., 2010; Siegel et al., 2011, 2012 e 2015).

No Brasil, o câncer de mama também apresenta alta incidência entre as mulheres. Estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2014 foram de 57.120 novos casos, sendo o segundo tipo de câncer mais frequente e o primeiro entre as mulheres, com um risco estimado de 57 casos a cada 100 mil habitantes (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR>). Dados provenientes do Banco de Dados do Registro Hospitalar de Câncer (RHC), no qual reúne dados de 75 instituições no Estado de São Paulo, no ano de 2012, foram diagnosticados 6.124 novos casos, contudo, quando comparado o número de casos anualmente, não se observa grandes variações (<http://www.fosp.saude.sp.gov.br/html/tabnet.html>).

Baseado em imuno-histoquímica de três biomarcadores: receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) e receptor de fator de crescimento epidermal (HER2), o câncer de mama pode ser classificado em subtipos. Um sistema de classificação amplamente aceito é baseado em perfis de expressão gênica proposto por Perou e colaboradores (2000), o qual classifica o câncer de mama em cinco subtipos, agrupados de acordo com suas características clínicas e assinatura gênica (genes diferencialmente expressos) e que apresentam evolução clínica e implicações diferenciadas em seu tratamento (Sorlie et al., 2001). Os subtipos luminais A e B são caracterizados por serem receptores hormonais positivos (ER e/ou PR). Os tumores HER2 positivos apresentam super expressão ou amplificação de HER2 (ER-, PR- e HER2+), já o subtipo *normal-like*, assemelham-se molecularmente ao tecido epitelial normal e os tumores *basal-like* apresentam baixos níveis ou nenhuma expressão de ER,

baixos níveis de genes relacionados às células basais epiteliais do tecido mamário, incluindo expressão de citoqueratinas 5 (CK5) e 17 (CK17) e de laminina (revisado por Carvalho et al., 2010). Já o subtipo triplo negativo, caracterizado pela falta de expressão de ambos os receptores hormonais bem como a falta da expressão ou amplificação de HER2 (Dawood et al., 2010b), está associado ao pior prognóstico e representa cerca de 10-15% dos carcinomas da mama, sendo constituinte de aproximadamente 80% de todos os tumores basal-like (revisado por Dawood et al., 2010a).

Nos últimos anos, os estudos de expressão gênica levaram ao desenvolvimento de diversas plataformas de expressão gênica. As mais discutidas são o *Oncotype DX® recurrence score*, o MammaPrint® e o painel PAM50 (Paik et al., 2004; Habel et al., 2006; Buyse et al., 2006; Parker et al., 2009; Nielsen et al., 2010; Bastien et al., 2012). Essas diferentes plataformas identificam padrões de expressão de ER, HER2 e genes associados à proliferação. Elas vêm sendo utilizadas para estimar o risco de recorrência e para guiar a indicação de quimioterapia adjuvante. O *Oncotype DX® recurrence score* avaliou pacientes operados com tumores ER positivos e sem comprometimento na axila e prediz o risco de recorrência em dez anos, identificando um subgrupo de baixo risco que pode prescindir da quimioterapia. O MammaPrint® incluiu pacientes com menos de 61 anos com tumores T1-T2 e sem comprometimento na axila e estratifica as pacientes em bom ou mau prognóstico. O PAM50, que incluiu pacientes em estágio I a III, classifica os subtipos intrínsecos predizendo a sobrevida livre de recorrência em 10 anos em pacientes com tumores ER positivos tratados com tamoxifeno, identificando pacientes que podem se beneficiar de terapia endócrina neoadjuvante (Ellis e Perou, 2013).

Alguns fatores de predisposição conhecidos já foram associados ao desenvolvimento do câncer de mama, tais como história familiar de câncer de mama e exposição prolongada de estrogênio (menarca precoce e menopausa tardia). Contudo, outros fatores estão menos associados, como dieta e índice de massa corpórea (IMC), outros ainda podem ser fatores protetores como amamentação prolongada, idade precoce ao primeiro filho e maior número de gestações (Tabela 1) (Madigan et al., 1995; Althuis et al., 2003; revisado por Okasha et al., 2003; Bleyer et al., 2006; Rebora et al., 2008; Hulka e Moorman, 2001 e 2008; Dolle et al., 2009).

Acredita-se que 5-10% dos casos de câncer de mama estejam associados ao fator hereditário (Bilimoria e Morrow 1995), dos quais cerca de 25% sejam em consequência de mutação germinativa nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (Stadler et al., 2010). Estes genes são de alta penetrância, pouco frequentes na população e a herança é autossômica dominante (Simon e Zhang, 2008; Stadler et al., 2010).

Outros genes, tais como *TP53* e *PTEN* (alta penetrância), bem como *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *BRIP1* e *CASP8* (média penetrância), são responsáveis por 5% dos casos associados ao fator hereditário (Stadler et al., 2010). Estes genes desempenham importantes funções e estão relacionados com outros tipos de cânceres, tais como colorretal, próstata, ovário, tireóide e rim (Seppälä et al., 2003; Cybulski et al., 2004; Brennan et al., 2007; Lamkanfi e Kanneganti, 2010).

Estudos de associação ampla do genoma (do inglês *Genome-Wide Association Study* - GWAS) identificaram polimorfismos em vários genes como *FGFR2*, *NUDT10*, *NUDT11*, *CHRNA3*, *CHRNA4* e locus 8q24, que podem conferir uma elevação muito discreta no risco de desenvolvimento do câncer de mama (Bonifaci et al., 2010; Stadler et al., 2010). Estes polimorfismos apresentam uma baixa penetrância e são responsáveis por aproximadamente 10% dos tumores atribuídos a fatores hereditários. Embora alguns fatores hereditários para o desenvolvimento do câncer de mama sejam conhecidos, aproximadamente 60% permanecem obscuros (Stadler et al., 2010).

A grande maioria dos casos de câncer de mama, isto é, cerca de 90%, são esporádicos, ou seja, sem associação com o fator hereditário, (Bilimoria e Morrow 1995). Nestes casos, o desenvolvimento do tumor pode ter sido decorrente de diversas mutações somáticas no tecido mamário, principalmente mutações em oncogênese e genes supressores de tumor (Vogelstein e Kinzler, 2004; Stratton et al., 2009). Atualmente, um dos desafios das pesquisas em câncer consiste em identificar genes somaticamente mutados que estão envolvidos na carcinogênese e progressão tumoral.

Tabela 1 - Fatores de risco de câncer de mama

Indicador	Grupo de risco		Risco relativo	Referências
	Baixo	Alto		
Sexo	Homem	Mulher	150.0	Hulka e Moorman, 2001 e 2008.
Idade	30-34	70-74	17.0	Madigan et al., 1995
Idade da menarca	≥ 14	≤ 12	1.5	Hulka e Moorman, 2001 e 2008.
Uso de contraceptivo oral	Nunca	usa/já usou	1.07-1.2	Hulka e Moorman, 2001 e 2008; Ursin et al., 1999.
Idade ao nascimento do primeiro filho	≤ 20	≥ 30	1.9-3.5	Hulka e Moorman, 2001 e 2008, Madigan et al., 1995.
Amamentação (meses)	≥ 30	0	1.37	Enger et al., 1997
Paridade	≥ 5	0	1.4	Hulka e Moorman, 2001 e 2008, Madigan et al., 1995.
Idade da Ooforectomia	≤ 35	#	3.0	Hulka e Moorman, 2001 e 2008.
Idade da menopausa	≤ 45	≥ 55	2.0	Hulka e Moorman, 2001 e 2008.
Terapia com estrógeno	Nunca	Usa	1.2-1.4	Hulka e Moorman, 2001 e 2008, Grodstein et al., 1997.
Terapia com estrógeno+progesterona	Nunca	Usa	1.4	Grodstein et al., 1997.
IMC pós menopausa	≤ 22.9	≥ 30.7	1.6	Hulka e Moorman, 2001 e 2008.
História familiar de câncer de mama	Não	Sim	2.6	Madigan et al., 1995.
Concentração sérica de estradiol	Baixa	Alta	1.8-5.0	Toniolo et al., 1994.
Densidade mamária pela mamografia (%)	0	≥ 75	6.0	Boyd et al., 1992.
Densidade óssea	Baixa	Alta	2.7-3.5	Cauley et al., 2007.

Não há associação entre o risco de câncer de mama com ooforectomia realizada aos 35 anos ou mais velhas.

Estudos de sequenciamento do genoma tumoral em larga escala têm possibilitado a identificação de genes candidatos, bem como a identificação de novas mutações que possam contribuir para a carcinogênese (Futreal et al., 2004; Bonifaci et al., 2010). Um dos primeiros estudos publicados nesta linha consiste no sequenciamento de um carcinoma lobular positivo para receptor de estrógeno. Neste trabalho foram observadas cinco mutações somáticas, nos genes *ABCB11*, *HAUS3*, *SLC24A4*, *SNX4* e *PALB2* presentes tanto no tumor primário quanto na metástase (derrame pleural). Observou-se também amplificação e mutação no domínio tirosina quinase de HER2 apenas na metástase, mas não no sítio primário. Como validação, foram analisados outros 112 carcinoma lobulares e em dois deles foi observada uma mutação no gene *HAUS3*, originando proteína truncada. Em outros dois tumores, mutação no domínio tirosina quinase de HER2 foi detectado. É interessante observar em casos de carcinoma lobular, tumores hormônio-responsivos, o envolvimento do gene *HAUS3*, um gene que

atua na estabilidade do genoma. Além disso, estes achados indicam que ativação da via de HER2 pode estar implicada na progressão do carcinoma lobular, mas não na carcinogênese (Shah et al., 2009).

Outro estudo, avaliando o sequenciamento completo do genoma foi realizado para detectar mutações somáticas no subtipo basalóide, comparando amostra do tumor primário, sangue periférico, metástase cerebral e xenoenxerto (originário de tumor primário). O espectro de alterações de sequência do DNA mostrou que 55% das mutações pontuais representam transições CG>TA, mas o significado deste achado ainda não está claro. Foram encontradas 50 mutações somáticas, destas, 48 foram detectadas nos três tumores (tumor primário, metástase e xenoenxerto). Alta frequência de alelos mutantes para os genes *TGFB1* e *MYCBP2* foi encontrado principalmente no sítio primário, enquanto que alterações nos genes *NRK*, *PTPRJ*, *CHGB* e *MAP3K8* foram observados com maior frequência na metástase e xenoenxerto, indicando que tais mutações podem estar associadas ao potencial metastático. Estes achados indicam novas vias que podem estar alteradas em tumores basalóides (Ding et al., 2010).

Um grande estudo analisando o genoma e o transcriptoma tumoral foi realizado na tentativa de determinar alteração do número de cópias e expressão gênica. Estes dados foram comparados ao obtido de amostra normal de tecido adjacente para detectar alterações somáticas e germinativas. Inicialmente foram analisadas amostras de 997 pacientes com câncer de mama e posteriormente os dados foram validados em amostras de outras 995 pacientes com câncer de mama. Demonstrou-se que o perfil de deleções inclui locus que contêm diversos genes, incluindo: *PTEN*, *PPP2R2A*, *MTAP* e *MAP2K4*. Observou-se também novas estratificações moleculares para o câncer de mama baseadas nas alterações no número de cópias somáticas (Curtis et al., 2012).

Diferenças significativas entre os subtipos do câncer de mama foram observadas em outro estudo de sequenciamento do genoma tumoral em larga escala. Notou-se que em carcinomas mamários subtipo luminal A, a incidência de translocações cromossômicas é baixa. Por outro lado, em carcinomas com mutação no gene *BRCA1* do subtipo basalóide, a incidência de translocações tanto inter como intracromossômica são bastante frequentes, indicando que estes tumores têm grande instabilidade genômica (Stephens et al., 2009). De acordo com este estudo, Walker e colaboradores (2012) demonstraram poucas variações no número de cópias no genoma tumoral de amostras

subtipo luminal A em relação a outros subtipos intrínsecos. Além disso, mostraram que alteração no número de cópias em linhagem germinativa é pouco frequente e não está relacionado ao número de alterações somáticas no tumor.

O sequenciamento completo do genoma e exoma de 77 tumores de mama subtipo luminal de pacientes submetidas a tratamento neoadjuvante com inibidores de aromatase, demonstrou inúmeras alterações somáticas e grande heterogeneidade genômica. As mutações somáticas mais relevantes foram observadas tanto em genes previamente identificados como mutados no câncer de mama, tais como *PIK3CA*, *TP53*, *GATA3*, *CDH1*, *RBI*, *MAP3K1* e *CDKN1B*, bem como em genes não frequentemente observados, *RUNX1*, *LDLRAP1*, *MYH9*, *AGTR2*, *STMN2*, *SF3B1* e *CBFB*. Além disso, pode-se observar que tumores carreadores de mutação no gene *MAP3K1* são mais frequentemente de subtipo luminal A, apresentam baixo grau histológico e baixa proliferação e respondem favoravelmente a tratamento com inibidores de aromatase. Já tumores com mutação no gene *TP53* são de subtipo luminal B, apresentam alto grau histológico, alta proliferação e são pouco responsivos a este tratamento. Além disso, tumores com mutação no gene *GATA3* correlacionam-se com a supressão da proliferação após tratamento com inibidores de aromatase (Ellis et al., 2012). Este estudo demonstra a grande importância de estudos de sequenciamento do genoma e exoma como ferramenta de determinação de melhores estratégias terapêuticas, bem como para a descoberta de novas alterações relacionadas à doença.

Foram também realizados estudos mais direcionados, isto é, estudos dedicados a avaliar a ocorrência de mutações em painéis de genes previamente identificados como relacionados ao câncer. De acordo com o trabalho de Ellis e colaboradores (2012) foram encontradas mutações no gene *PIK3CA* principalmente em tumores ER positivos e HER2 positivo enquanto mutações no gene *FBXW7* foram mais frequentes em tumores triplo negativos. Estes achados demonstram que os diferentes subtipos apresentam diferentes mutações, além disso, diferentes vias de sinalização podem ser usadas como alvos de drogas terapêuticas (Santarpia et al., 2012).

De acordo com o *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC - <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/COSMIC/> - Forbes et al., 2015) dentre as 38.192 amostras de câncer de mama depositadas neste banco de dados, 7.016 apresentaram alguma mutação somática, sendo principalmente nos genes: *PIK3CA*,

TP53, *CDH1*, *KMT2C*, *ESR1*, *GATA3* e *MED12*. Da mesma forma como visto anteriormente, a frequência dos genes mutados varia de acordo com os subtipos de câncer de mama (Tabela 2).

Nosso conhecimento sobre mutações germinativas e somáticas associadas ao câncer de mama vem se ampliando rapidamente nos últimos tempos. Mutações em vários genes foram identificadas, mas ainda não explicam a incidência do tumor na maioria das pacientes (Sjöblom et al., 2006; Greenman et al., 2007). Ainda assim, melhor caracterização e estudos funcionais dessas mutações são necessários para melhor compreensão das suas implicações no câncer de mama. Este problema é ainda mais complexo em pacientes jovens com câncer de mama devido à baixa incidência da doença neste grupo de pacientes. Grande parte dos estudos em câncer, como um todo, foi realizado em pacientes idosas, que representam o maior contingente atingido pela doença.

Tabela 2 - Genes com maior frequência de mutações somáticas em câncer de mama de acordo com marcadores de ER, PR e HER2

Subtipo	Genes (%)						
Todos	<i>PIK3CA</i> (26%)	<i>TP53</i> (23%)	<i>CDH1</i> (11%)	<i>KMT2C</i> (8%)	<i>ESR1</i> (7%)	<i>GATA3</i> (7%)	<i>MED12</i> (6%)
ER e/ou PR	<i>PIK3CA</i> (28%)	<i>KMT2C</i> (30%)	<i>TP53</i> (22%)	<i>GATA3</i> (18%)	<i>ESR1</i> (6%)	<i>CDH1</i> (6%)	<i>AKT1</i> (6%)
HER2	<i>TP53</i> (37%)	<i>PIK3CA</i> (21%)	<i>NOTCH1</i> (6%)	<i>ERBB2</i> (5%)	<i>AKAP9</i> (5%)	<i>PCM1</i> (5%)	<i>PTEN</i> (2%)
Tripla Negativo	<i>TP53</i> (54%)	<i>PIK3CA</i> (15%)	<i>RB1</i> (9%)	<i>PTEN</i> (6%)	<i>CDKN2A</i> (6%)	<i>WWTR1</i> (6%)	<i>BRAF</i> (3%)

FONTE: *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (COSMIC). Busca em 16/07/2015.

O câncer de mama em pacientes jovens, no qual é caracterizado em pacientes com diagnóstico ≤ 35 anos (Cancello et al., 2013), é observado em aproximadamente 2-10% das pacientes com a doença (Gonzalez-Angulo et al., 2005; Brennan et al., 2005; revisado por Ries et al., 2007; Peng et al., 2011). No Estado de São Paulo aproximadamente 4% das pacientes com diagnóstico de câncer de mama tem ≤ 35 anos (<http://www.fosp.saude.sp.gov.br/html/tabnet.html>). Embora seja incomum em mulheres jovens, esta neoplasia maligna é a mais frequente entre as mulheres com menos de 40 anos, correspondendo 30-40% de todos os casos de câncer (Marrett et al., 2002; Siegel et al., 2015).

Mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* poderiam explicar parcialmente o surgimento do câncer de mama em idade precoce (Colleoni et al., 2002). A frequência de mutação nesses varia dependendo da população estudada, e é maior em pacientes jovens, variando de 14 a 23% (Tabela 3). De acordo com Carraro e colaboradores (2013), na população brasileira, 20,5% das pacientes jovens apresentaram mutações deletérias nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e 18,5% são portadoras de variantes com significado clínico desconhecido. Além disso, 71,4% das pacientes com mutação no gene *BRCA1* foram diagnosticadas com tumores triplo negativo e todas as pacientes com mutação no gene *BRCA2* tinham tumores ER e/ou PR positivo (luminal).

Tabela 3 - Frequência de mutação germinativa nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes jovens de acordo com a população

População	<i>BRCA1</i> (%)	<i>BRCA2</i> (%)	<i>BRCA1/2</i> (%)	n	Referência
Grega	7,6	15,4	23	26	Loizidou et al., 2007
Brasileira	13	7,5	20,5	54	Carraro et al., 2013
Britânica	10	8	18	100	Lalloo et al., 2006
Caucasiana	13	4	17	166	Haffty et al., 2009
Coreana	8	6	14	101	Haffty et al., 2009
Afro-Americana	5	9	14	66	Haffty et al., 2009

n, número de pacientes no estudo.

Alguns estudos demonstram diferentes aspectos tumorais entre pacientes jovens e pacientes idosas (Colleoni et al., 2002; Sidoni et al., 2003; Azim et al., 2012). Mulheres diagnosticadas em torno dos 20-35 anos parecem ter um pior prognóstico (Klauber-DeMore, 2005), isto é, maior chance de desenvolvimento de metástases e maior chance relativa de morte, mesmo quando apresentam doença de baixo risco, ou seja, sem comprometimento linfodonal (Kroman et al., 2000) e tumor hormônio responsivo (Paik et al., 2006). Uma das explicações para este padrão observado é a agressividade do câncer de mama em mulheres mais jovens, no qual, pode em parte ser atribuída à maior frequência de tumores pouco diferenciados, baixa prevalência de positividade para receptores hormonais, maior incidência de tumores triplo negativo e superexpressão de HER2, alto grau tumoral, invasão linfovascular e alta fração proliferativa (Holli e Isola, 1997; Kollias et al., 1997; Colleoni et al., 2002; El Saghir et al., 2006; Anders et al., 2008; Bharat et al., 2009; Keegan et al., 2012; Azim et al., 2012; Couch et al., 2015).

Outra possível explicação para o tumor apresentar-se de maneira mais agressiva em mulheres jovens seria a detecção da doença em estágio mais avançado (Ravert e Huffaker, 2010). Apesar de todos os avanços que vêm ocorrendo no diagnóstico cada vez mais precoce nos casos de câncer de mama, há diversos desafios em diagnosticar a doença em mulheres jovens (Afzelius et al., 1994). O exame clínico das mamas, bem como a mamografia são menos sensíveis em razão da alta densidade da glândula mamária observada nesta faixa etária (Kroman et al., 2000). Além disso, pelo câncer de mama ser considerado pouco frequente nesta idade o diagnóstico precoce é prejudicado, diminuindo as chances de controle e até mesmo de cura da doença (Brennan et al., 2005).

Em estudos de expressão gênica foram observadas diferenças significativas em algumas vias quando comparadas pacientes jovens e idosas. Em pacientes jovens foi observado uma baixa probabilidade na desregulação em Src e E2F e alta probabilidade na desregulação em PI3K, Myc e β -catenina, conferindo um pior prognóstico. Contudo, uma alta probabilidade na desregulação de Src e E2F e baixa probabilidade na desregulação em PI3K, Myc e β -catenina foi associado ao pior prognóstico em pacientes mais velhas (Anders et al., 2008a). Entretanto, em estudo posterior com maior casuística, estes autores não encontraram diferenças significativas entre tumores de pacientes jovens e idosas e este fator foi atribuído a possíveis diferenças nas variações de porcentagens de subtipos intrínsecos, ou seja, maior frequência do subtipo basal em pacientes jovens e maior frequência do subtipo luminal em pacientes idosas (Anders et al., 2008b).

Entretanto, é preciso considerar que o câncer de mama é decorrente do acúmulo de inúmeras mutações somáticas no tecido mamário ao longo da vida da paciente. Em consequência disto, paciente mais velha tem uma maior chance de desenvolver a doença quando comparado as pacientes mais jovens. Este fator ainda intrigam os pesquisadores, pois ainda não se sabe quais fatores são necessários para o estabelecimento da doença em idades precoces. Acredita-se que específicas mutações somáticas estejam associadas ao desenvolvimento do câncer de mama em pacientes jovens, entretanto, este fator não estão totalmente esclarecidos.

Uma das formas de detectar novas mutações é por meio do sequenciamento completo do exoma (Sjöblom et al., 2006; Wood et al., 2007; Leary et al., 2008). Esse

sequenciamento de nova geração proporciona analisar de forma global e simultânea somente as regiões codificantes de todos os genes, no qual representa 1% de todo o genoma. Em consequência disso, este sequenciamento torna-se mais barato e rentável quando comparado ao sequenciamento completo do genoma ou sequenciamento de um único gene (Meyerson et al., 2010). Além disso, o sequenciamento do exoma no tumor e em tecido normal (na grande maioria das vezes o sangue periférico), da mesma paciente, tem um grande potencial em identificar alterações específicas somente no tumor (Stratton et al., 2009), podendo desta forma, identificar mutações envolvidas com a carcinogênese. A identificação destas mutações pode contribuir para o desenvolvimento de tratamentos direcionados, específico para cada paciente.

Além disso, alguns fatores de risco, tais como: exposição intrauterina a carcinógenos; dieta; atividade física; índice de massa corpórea; contraceptivo oral; paridade; amamentação e fatores genéticos, já foram apontados como desencadeadores do desenvolvimento do câncer de mama em idade precoce. Contudo, muitos estudos já foram realizados na tentativa de associar tais fatores ao câncer de mama, o que muitas vezes se tornam prejudicado devido o número restrito de amostras. Desta forma, o conhecimento de fatores de risco associados ao câncer de mama é pouco elucidado (revisado por Narod, 2012).

Devido o câncer de mama em pacientes jovens ser pouco compreendido, a identificação de características moleculares neste grupo de pacientes é de extrema importância para a compreensão da doença nesta faixa etária, bem como para posteriormente ser utilizado como ferramentas para o diagnóstico e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Em suma, uma pequena porcentagem das mulheres com câncer de mama são jovens. Um dos fatores de predisposição é mutação germinativa nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*. Outra hipótese para o surgimento do câncer de mama seria mutação somente nas células mamárias, no entanto, mutações somáticas neste grupo de pacientes não estão totalmente esclarecidas. Identificamos mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e mutações somáticas em pacientes jovens com câncer de mama. Além disso, analisamos as características clínicas, histórico familiar de câncer e hábitos de vida.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar em pacientes jovens com câncer de mama: história familiar, mutação germinativa nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e mutações somáticas no tumor.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar características clínicas, hábitos de vida e histórico familiar por meio de questionário.
- Determinar a presença de mutação de linhagem germinativa nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.
- Detectar a presença de mutações somáticas em tumores luminais de pacientes não carreadoras de mutação nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* por meio do sequenciamento completo do exoma.
- Avaliar se determinadas mutações somáticas estão relacionadas à idade do diagnóstico de câncer de mama por meio de uma meta análise.
- Avaliar a presença de mutações somáticas no gene *PIK3CA* em pacientes jovens e em pacientes mais idosas com câncer de mama.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1. Casuística

As pacientes foram selecionadas em dois centros de tratamento de câncer do Estado de São Paulo, Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) de ambas as instituições (Anexo A– IBCC e Anexo B – FMUSP/ICESP).

Critérios de inclusão das pacientes jovens:

- Sexo feminino
- Diagnóstico de câncer de mama entre os 18-35 anos (pacientes jovens)
- Estadiamento: não especificado (I-IV)
- Antecedente pessoal de câncer: não especificado
- Paciente responder o questionário de antecedentes pessoais e hábitos
- Disponibilidade de um fragmento de amostra tumoral fresco ou emblocada em parafina
- Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Para o sequenciamento completo do exoma, foram selecionadas pacientes sem tratamento prévio (neoadjuvante). O tumor foi coletado durante a biópsia ou cirurgia no IBCC e colocados imediatamente em nitrogênio líquido, onde ficaram armazenadas até o momento do seu processamento. Já para a seleção das pacientes, no qual foram analisados algumas alterações somáticas em tumores emblocados em parafina, fizemos um levantamento de todas as pacientes que tiveram o diagnóstico de câncer de mama e que foram atendidas entre os períodos 2008-2014 no ICESSP.

Além disso, incluímos pacientes mais idosas, que tiveram o diagnóstico de câncer de mama aos ≥ 55 anos, com história familiar de câncer de mama e/ou ovário segundo os critérios sugestivos do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN versão 2.2014 - http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_screening.pdf) para

Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário (Tabela 4) e com disponibilidade de um fragmento de amostra emblocada em parafina.

3.2. Questionário de Antecedentes Pessoais e Hábitos

As pacientes foram contatadas via telefone e convidadas a participar da pesquisa. Para aquelas que aceitaram participar, foi agendada uma consulta com data e horário marcado. Após explicação dos objetivos do estudo assinaram o TCLE e logo em seguida foi aplicado o questionário de Antecedentes Pessoais e Hábitos (Anexo C). O questionário abordou questões referentes à história familiar de câncer, história menstrual e obstétrica, hábitos como uso de tabaco e álcool, IMC, cor da pele e ancestralidade.

Os dados obtidos no questionário foram analisados no programa *Statistical Package for the Social Sciences* 18.0 (SPSS). Para determinar quais pacientes têm ou não histórico familiar de câncer de mama e/ou ovário, nos baseamos nos critérios do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN versão 2.2014) para Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário (Tabela 4). Consideramos a paciente como história familiar limitada aquelas com <2 parentes de primeiro e/ou segundo grau do sexo feminino em cada lado da família ou somente mulheres com <45 anos. Além disso, utilizamos o *software Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation Algorithm* (BOADICEA - BWA v3) para calcular o risco de a paciente ser portadora de mutação deletéria nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (Lee et al., 2014).

Tabela 4 - Critérios sugestivos de Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário*

Critérios <i>National Comprehensive Cancer Network (NCCN)</i>
1. Indivíduo de família portadora de mutação deletéria conhecida nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>
2. História pessoal de câncer de mama + uma ou mais características abaixo: <ul style="list-style-type: none"> • diagnóstico com ≤ 45 anos • diagnóstico com ≤ 50 anos com: <ul style="list-style-type: none"> ❖ adicional tumor primário ❖ ≥ 1 parente com câncer de mama diagnosticado em qualquer idade ❖ história familiar desconhecida ou limitada • diagnóstico com ≤ 60 anos com: <ul style="list-style-type: none"> ❖ tumor de mama triplo negativo • diagnóstico em qualquer idade com: <ul style="list-style-type: none"> ❖ ≥ 1 parente com câncer de mama diagnosticado ≤ 50 anos ❖ ≥ 2 parente com câncer de mama diagnosticado em qualquer idade ❖ ≥ 1 parente com câncer epitelial de ovário ❖ ≥ 2 parente com câncer de pâncreas e/ou próstata (Gleason score 7) diagnosticado em qualquer idade ❖ parente masculino com câncer de mama ❖ etnia associada com alta frequência de mutação (ex. Judeus Ashkenazi)
3. História pessoal de câncer de ovário epitelial
4. História pessoal de câncer de mama masculino
5. História pessoal de câncer de pâncreas ou próstata (Gleason score ≥ 7) em qualquer idade com ≥ 2 parentes com câncer de mama e/ou ovário e/ou pâncreas ou próstata (Gleason score ≥ 7) em qualquer idade

Considerar parentes de primeiro, segundo e terceiro grau. História familiar limitada: < 2 mulheres de primeiro ou segundo grau com ≤ 45 anos de cada lado da família. *Traduzido de NCCN: *Genetic/Familial high-risk assessment: breast and ovarian version 2.2014*.

3.3. Análise de Mutação Germinativa nos Genes *BRCA1* e *BRCA2*

• Coleta de Sangue Periférico

Para as pacientes jovens, foi coletado por meio de punção da veia do antebraço 8 mL de sangue por punção venosa no antebraço em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). As amostras foram transportadas em caixa de isopor com gelo e posteriormente processada no laboratório.

• Extração de DNA das Células Mononucleares do Sangue Periférico

O DNA das células mononucleares do sangue periférico foi extraído por meio do *Illustra Blood GenomicPreo Mini Spin Kit* (GE Healthcare Life Sciences - 28904265). Para a lise das células sanguíneas, as amostras foram transferidas para tubos de 15 mL e

adicionados *RBC Lysis Buffer* (10 mM KHCO₃; 155 mM NH₄Cl e 0.1 mM EDTA, pH 8) em uma proporção de 3x o volume da amostra de sangue inicial. Após homogeneização por inversão o material foi incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 500 g por 2 minutos e o sobrenadante descartado. Para ressuspender as células brancas, foram adicionados 100-150 µl de *Phosphate Buffered Saline* (PBS: 137 mmol/L NaCl; 2.7 mmol/L KCl; 10 mmol/L Na₂HPO₄ e 1.8 mmol/L KH₂PO₄) e agitados em vortéx por 1 minuto. As amostras foram transferidas para microtubos de 2 mL e foram adicionados 20 µl de Proteinase K e 400 µl de *Lysis Buffer Type 10*, seguida de vigorosa agitação com vortéx por 15 segundos. Por fim, as amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Para a ligação do DNA genômico na membrana da coluna, as amostras foram aplicadas na coluna, centrifugadas a 11.000 g por 1 minuto e o filtrado foi descartado. Para lavagem das amostras, foram adicionados 500 µl de *Lysis Buffer Type 10* na coluna, centrifugado a 11.000 g por 1 minuto e o filtrado foi descartado. Para lavagem e secagem das amostras, foram adicionados 500 µl de *Wash Buffer Type 6* na coluna, centrifugado a 11.000 g por 3 minutos e novamente o filtrado foi descartado. Para a eluição do DNA, as colunas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL *DNase-free*, foram adicionados 70 µl de *UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water* (Invitrogen - 10977-023) no centro da coluna, incubado a temperatura ambiente por 1 minuto e centrifugado a 11.000 g por 1 minuto. As colunas foram removidas e as amostras armazenadas a -20°C.

Uma alíquota de cada amostra foi utilizada para quantificar e avaliar a integridade do DNA genômico. Foi avaliada qualitativamente por eletroforese em gel de agarose diluída a 0,8% em Tris-Borato-EDTA 1X (TBE: 89 mM Tris; 89 mM ácido bórico e 2 mM EDTA) e corado com GelRed (*Uniscience* - 41003) e quantitativamente utilizando *Nanodrop 1000 Spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific Inc*), também utilizado para avaliar a pureza da amostra em relação às proteínas (a relação 260/280 nm deve estar em torno de 1,8) e contaminação com outros compostos, como sais, por exemplo (a relação 260/230 nm deve estar entre 1,8 e 2,2).

• Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para sequenciamento de todos os 22 exons do gene *BRCA1* e os 26 exons do gene *BRCA2*, foi necessário inicialmente realização da PCR. Foram utilizados os reagentes: tampão para *AmpliTaq Gold* 1X; cloreto de magnésio para *AmpliTaq Gold*[®], concentração variando de 1,5 mM a 3 mM, de acordo com o fragmento amplificado; enzima *AmpliTaq Gold* 250U a 0,4U/μl (todos contidos no *AmpliTaq Gold*[®] *DNA Polymerase with Gold Buffer and MgCl₂* - *Applied Biosystems* - 4311814); deoxinucleotídeos (dNTPs) a 0,16 mM (*Invitrogen* - AM8200); oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso a 0,4 μM cada (*Invitrogen*) e DNA. O volume da reação foi completado com água ultrapura livre de RNAses/DNAses para o volume final de 10 μl.

A reação foi realizada em aparelho termociclador *Applied Biosystems*[®] *GeneAmp*[®] *PCR System 9700* (*Applied Biosystems*) e submetida à variação de temperatura. As reações foram submetidas a: 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 oligonucleotídeos iniciadores – 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 da PCR (4 μl) foi avaliada qualitativamente por eletroforese em gel de agarose diluída a 1,5% em Tris-Borato-EDTA 1X (TBE) e corado com GelRed (*Uniscience* - 41003). Após a visualização da banda única e sem rastros (reação específica), o produto da PCR foi purificado utilizando *illustra*[™] *ExoStar*[™] *1-Step* (*GE Healthcare Life Sciences* - 35079049), no qual foram adicionados 2 μl de *ExoStar* em cada produto de PCR e colocado em termociclador *Applied Biosystems*[®] *GeneAmp*[®] *PCR System 9700* (*Applied Biosystems*) 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.

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores dos fragmentos dos genes *BRCA1* e *BRCA2* estão localizados a uma distância de 50 a 100 pares de bases de cada exon. Isto

permite que toda a área de interesse seja rastreada, inclusive regiões intrônicas próximas aos exons, onde eventuais alterações podem ser importantes por estarem localizadas em sítios de *splicing*. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para *BRCA1* foram retiradas do trabalho de Arnold e colaboradores (1999) e Friedman e colaboradores (1994) (Anexo D), e as sequências referentes ao gene *BRCA2* de Wagner e colaboradores (1999) (Anexo E).

• Sequenciamento pelo Método de Sanger dos Genes *BRCA1* e *BRCA2*

Uma nova PCR da amostra de DNA amplificado foi preparada. Nesta etapa utilizamos um oligonucleotídeo (senso ou anti-senso) para cada reação. Foram utilizados os reagentes: *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems - 4337456); *BigDye® Terminator v1.1 & v3.1 5X Sequencing Buffer* (Applied Biosystems - 4336697); oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso a 10 mM (Invitrogen) e 1 µl do produto da PCR. O volume da reação foi completado com água ultrapura livre de RNAses/DNAses para o volume final de 10 µl em placa de 96 wells. A reação foi levada ao termociclador *Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems) e submetida a: 96°C por 1 minuto (desnaturação), 35 ciclos com variação de temperatura: 96°C por 15 segundos (desnaturação), 50°C por 15 segundos (anelamento) 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 sequenciamento. Para tal, foi utilizado o *BigDye XTerminator® Purification Kit* (Applied Biosystems - 4376487), onde foram adicionados a cada produto do sequenciamento 45 µl de *SAM Solution* e 10 µl *Exterminator Solution*, em seguida, a placa foi agitada a 1.500 rpm por 30 minutos (aparelho MS3 digital - IKA - 0003319000). O produto dessa reação foi analisado no aparelho de sequenciamento automático *Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems - Hitachi) do Laboratório de Genômica Pediátrica, LIM 36, Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

• Análise dos Dados do Sequenciamento e Classificação das Alterações

Os picos de fluorescência adquiridos no sequenciamento foram analisados por meio do programa *Chromas version 2.13* (www.technelysium.com.au/chromas.html).

As sequências obtidas foram analisadas pelos programas *Mutation Surveyor version 3.20* (SoftGenetics LLC) e comparadas com a sequência normal do gene descrita no *GenBank* (*BRCA1* NM_007294 e *BRCA2* NM_000059).

Caracterizamos as alterações em dezembro de 2014 e revisamos em julho de 2015, utilizando cinco bancos de dados: *Breast Cancer Information Core* (BIC) (Szabo et al., 2000), *Leiden Open Variation Database* (LOVD) (Fokkema et al., 2011), *Leiden Open Variation Database - International Agency for Research on Cancer* (LOVD-IARC) e *Mutation Database Universal* (UMD) (Bérout et al., 2000; Caputo et al., 2012) e ClinVar (Landrum et al., 2014). Todas as alterações foram nomeadas de acordo com a nomenclatura *Human Genome Variation Society* (HGVS – <http://www.hgvs.org>) e classificadas conforme adaptado do artigo de Vail e colaboradores (2014) (Tabela 5). Em seguida, os dados dos cinco bancos foram compilados e as alterações foram classificadas em uma única classificação geral conforme descritas abaixo:

- ✓ Benigna – classificada como benigna ou provavelmente benigna em ≥ 2 banco de dados;
- ✓ Provavelmente benigna – classificada como benigna ou provavelmente benigna em um banco de dados e comprovada co-ocorrência com mutação deletéria (apenas para o gene *BRCA1*);
- ✓ VUS – classificada em apenas um banco de dados como benigna ou descrita como desconhecida ou não descrita em nenhum dos bancos de dados;
- ✓ Patogênica – alterações que geram *stop* códon prematuro (nonsense) e *Frameshift*, mesmo quando não descritas em nenhum dos bancos de dados ou para aquelas classificadas em pelo menos um banco de dados como patogênica.

Tabela 5 - Classificação das alterações segundo os bancos de dados

Classificação	Banco de Dados				
	BIC	LOVD	LOVD-IARC	UMD	ClinVar
Patogênica	"Clinicamente importante - Sim"	"+/?" "+?/?"	"5 - Definitivamente patogênica" "4 - Provavelmente patogênica"	"5 - Causal" "4 - Provavelmente causal"	"Patogênica" "Provavelmente patogênica"
Incerta (VUS)	"Clinicamente importante - Desconhecida"	"?/?"	"3 - Incerto"	"3 - UV"	"Incerto"
Benigna	"Clinicamente importante - Não"	"-/?" "-?/?"	"1 - Não patogênica" "2 - Provavelmente não patogênica"	"1 - Neutra" "2 - Provavelmente neutra" "Polimorfismo"	Benigna
Outras	Nenhuma	Nenhuma	Nenhuma	" - "	"Não providenciado"

BIC, *Breast Cancer Information Core*; LOVD, *Leiden Open Variation Database*; LOVD-IARC, *Leiden Open Variation Database - International Agency for Research on Cancer*; UMD, *Mutation Database Universal*; VUS, *variant of uncertain significance*. A classificação do LOVD: "+" significa patogênica, "+?" provavelmente patogênica, "?" desconhecida, "-" nenhuma patogenicidade conhecida e "-?" não há patogenicidade.

Para análise, *in silico*, das alterações missense classificadas como VUS, utilizamos os *softwares Polymorphism Phenotyping v2* (PolyPhen-2) (Adzhubei et al., 2010), *Sorting Intolerant From Tolerant* (SIFT) (Ng e Henikoff, 2001) e *Align GVGD* (Tavtigian et al., 2005; Mathe et al., 2006), os quais baseiam-se na análise do impacto causado pela substituição do aminoácido na função e estabilidade de proteínas e hipótese que sequências de aminoácidos importantes da proteína são preservadas na evolução das espécies. Além disso, utilizamos o *software Protein Variation Effect Analyzer* (Provean) (Choi et al., 2012) para analisar as deleções *in frame* e seu impacto na estrutura e função da proteína.

Todas as pacientes portadoras de mutação deletéria foram orientadas pelo grupo de Câncer Hereditário do ICESP e foi solicitada uma nova amostra de sangue para a confirmação da mutação.

- **Amplificação Dependente da Ligação de Múltiplas Sondas (MLPA)**

Para as pacientes sem mutação deletéria no sequenciamento pelo método de Sanger, analisamos, por MLPA, grandes inserções ou deleções nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e a deleção c.1100delC no gene *CHEK2*. Para isso, utilizamos os kits: *SALSA® MLPA® P002 BRCA1 probemix* (P002 - 100R) e *SALSA® MLPA® P045 BRCA2/CHEK2 probemix* (P045 - 100R), ambos da *MRC-Holland*. Os kits consistem na utilização de

sondas compostas de dois oligonucleotídeos (A e B) localizados muito próximos e complementares a uma sequência alvo no gene. Além desta região de hibridização, as sondas possuem regiões complementares a um par de oligonucleotídeos iniciadores 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) e uma sequência *stuffer*, que é diferente para cada sonda e diferencia os fragmentos amplificados por tamanho. Quando as sequências alvo estão presentes na amostra, os oligonucleotídeos A e B se hibridizam para posteriormente serem conectados pela enzima Ligase-65. Somente as sondas já ligadas são amplificadas por PCR, cada uma gerando um produto de tamanho único (130 a 490 pb). Diferenças nos valores relativos referentes à amplificação são expressos em tamanhos ou áreas diferentes entre amostras de pacientes e de controles negativos (amostras de sangue de mulheres sem câncer de mama).

Além dos controles externos, cada kit 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.

Desnaturação do DNA e hibridização das sondas - em tubos de 0,2 µl, foram adicionados 50 ng de DNA em um volume de 2,5 µl completados com água ultra pura. Em seguida, as amostras foram colocadas em termociclador *Applied Biosystems® GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems)* a 98°C por 10 minutos, para desnaturação do DNA, e depois resfriadas a 25°C antes de abrir o termociclador. Foram adicionados 0,75 µl de sonda MLPA e 0,75 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).

Ligação da sonda - a temperatura foi reduzida para 54°C antes de abrir o termociclador. Em cada amostra foram adicionados 16 µl de “Mix Ligase” (1,5 µl de

ligase *buffer* A; 1,5 µl de ligase *buffer* B; 0,5 µl de Ligase-65 e 12,5 µl de água estéril). Em seguida as amostras com o mix foram incubadas a 54°C por 15 minutos, 98°C por 5 minutos e resfriadas a 20°C.

Reação de PCR - em um novo tudo de 0,2 µl foi preparado o “Mix Polimerase” (1 µl de Salsa PCR primers; 0,25 µl de Salsa polimerase e 3,75 µl de água estéril), adicionados 5 µl em cada amostra e incubada a 95°C por 1 minuto. Em seguida, esta reação foi submetida à variação de temperatura a: 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. Em seguida, foram armazenadas a 4°C ao abrigo da luz.

Leitura das amostras e análise dos dados - inicialmente o produto da PCR foi diluído em uma proporção de 1:10, ou seja, 1 µl de produto em 9 µl de água. Em seguida, foi preparado um mix: 9 µl *Hi-Di™ Formamide (Applied Biosystems - 4440753)* e 0,075 µl de *GeneScan™ 600 LIZ® dye Size Standard v2.0 (Applied Biosystems - 4408399)* e adicionado 1 µl de produto da PCR diluído. Esta reação foi incubada a 80°C por dois minutos. A placa com as amostras foi analisada no aparelho de sequenciamento automático *Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems - Hitachi)*. A análise dos resultados foi realizada utilizando o *software Coffalyser.NET*, específico para reações de MLPA e disponível gratuitamente pela empresa MRC-Holland.

3.4. Análise de Mutação Somática

- **Coleta de Tumor Fresco**

Para o sequenciamento completo do exoma, coletamos um fragmento de aproximadamente 1,5 cm no procedimento de biópsia ou cirurgia para a retirada do tumor. O material foi imediatamente colocado em nitrogênio líquido para transporte e posteriormente armazenado em containers em nitrogênio líquido até o processamento. Uma lâmina de cada tumor foi preparada utilizando criostato (*Leica Biosystems, Alemanha*), corada com hematoxilina-eosina (HE) e analisada pelo médico-patologista, sendo demarcadas as áreas contendo pelo menos 70% de células tumorais.

- **Extração de DNA do Tumor Fresco**

A região de interesse foi pulverizada com *Biopulverizer* (Bio-pulverizer™ BioSpec Products Inc., Oklahoma, EUA). Para a extração do DNA foi utilizado o *QIAamp® DNA Mini Kit* (Qiagen - 51304). O tecido pulverizado foi adicionado em microtubo de 1,5 mL contendo 180 µl de *Buffer ATL*. Em seguida, foram adicionados 20 µl do tampão de digestão contendo proteinase K, seguida de homogeneização por vórtex durante 15 segundos. As amostras foram incubadas a 56°C por 3 horas, agitando ocasionalmente. Foram adicionados 5 µl de RNase, homogeneizado por vortex por 15 segundos e incubado por 2 minutos. Foram adicionados 200 µl de *Buffer AL* e incubadas a 70°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 µl de etanol (96-100%), agitado em vórtex por 15 segundos. As amostras foram centrifugadas brevemente para remover as gotas no interior da tampa e cuidadosamente transferidas para colunas. As colunas foram centrifugadas 6.000 g por 1 minuto e o filtrado foi descartado. Foram adicionados 500 µl de *Buffer AW1* e centrifugadas a 6.000 g por 1 minuto, onde novamente o filtrado foi descartado. Foram adicionados 500 µl de *Buffer AW2* e centrifugadas a 20.000 g por 3 minutos. As colunas foram transferidas para microtubos de 2 mL e em seguida centrifugadas a 20.000 g por 1 minuto. Por fim, as colunas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, onde, foram adicionados 50 µl de *Buffer AE*, incubadas por 4 minutos e centrifugadas 6.000 g por 1 minuto. As colunas foram removidas e as amostras armazenadas a -20°C.

Uma alíquota de cada amostra foi avaliada qualitativamente por eletroforese em gel de agarose diluída a 0,8% em Tris-Borato-EDTA 1X (TBE) e corado com GelRed (*Uniscience* - 41003) e quantitativamente utilizando *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen) e *Nanodrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc). Este mesmo controle foi utilizado nas amostras de DNA de sangue destas pacientes.

- **Sequenciamento do Exoma**

Participamos dos procedimentos de preparo das amostras para o sequenciamento completo do exoma durante os dias 22 e 23 de outubro de 2013 que foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Animal, Departamento de Zootecnia, da Universidade de São Paulo (USP) em Piracicaba.

Para esta reação, utilizamos o *Nextera Rapid Capture Expanded Exome* (24 Samples) (Illumina - FC-140-1004) que nos permite sequenciar todos os exons, regiões 5' e 3' UTR e microRNAs. Utilizamos amostras pareadas de DNA provenientes de células mononucleares do sangue (tecido normal) e do tumor fresco de mama de oito pacientes.

Fragmentação do DNA genômico - a primeira etapa desta reação consiste na fragmentação do DNA e a ligação de adaptadores nas extremidades dos fragmentos. Para isso, foram utilizados 10 µl de DNA genômico a 5 ng/µl de cada amostra e colocado uma placa de 96 wells. Foram adicionados 25 µl de *Tagment DNA Buffer* e 15 µl *Tagment DNA Enzyme 1* em cada amostra. A placa foi colocada no agitador a 1200 g por um minuto, centrifugada a 280g por um minuto e incubada a 58°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 15 µl de *Stop Tagment Buffer*. A placa foi colocada no agitador a 1200 g por um minuto, centrifugada a 280g por um minuto e incubada a temperatura ambiente por 4 minutos.

Clean Up da fragmentação do DNA genômico - foram adicionados 65 µl de *Sample Purification Beads*, a placa foi colocada no agitador a 1200 g por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 8 minutos, centrifugada a 280 g por um minuto e colocada na estante magnética por 2 minutos. Cuidadosamente 130 µl do sobrenadante foram descartados e em seguida foram adicionados 200 µl de etanol 80%, no qual foi removido após 2 minutos. Novamente foram adicionados 200 µl de etanol 80% e removido após 2 minutos. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, retirada da estante magnética. Foram adicionados 22,5 µl de *Resuspension Buffer*, a placa foi colocada no agitador a 1200 g por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugada a 280 g por um minuto. A placa foi colocada novamente na estante magnética e foram transferidos 20 µl do sobrenadante para outra placa.

Primeira amplificação - esta etapa consiste na amplificação dos fragmentos de DNA purificados. Antes disso, são utilizados index 1 (i7) e index 2 (i5), para possibilitar a formação de *pools*, e adaptadores (P5 e P7) necessários para a geração de clusters e sequenciamento. Inicialmente foram adicionados 5 µl de *Index primer 1* (A) e 5 µl de *Index primer 2* (B) em cada amostra (Figura 1). O kit utilizado é composto de 12 *Index*

primer 1 (tampa laranja) e 2 *Index primer 2* (tampa branca), desta forma, é possível fazer 24 diferentes combinações.

Figura 1 - Index utilizados para formação dos pools. (A) *Index primer 1*; (B) *Index primer 2*; (C) estante especial *Truseq index plate fixture*

Foram adicionados 20 μ l de *Nextera Library Amplification Mix*, a placa foi colocada no agitador a 800 g por um minuto, centrifugada a 280 g por um minuto e levada ao termociclador e submetida a: 72°C por 3 minutos; 98°C por 30 segundos, 10 ciclos com variação de temperatura: 98°C por 10 segundos; 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando em 72°C por 5 minutos e a 10°C por tempo indeterminado.

Clean Up da primeira PCR - a placa foi centrifugada a 280 g por um minuto e, em seguida, 50 μ l do sobrenadante foram transferidos para outra placa. Foram adicionados 90 μ l de *Sample Purification Beads*, a placa foi colocada no agitador a 1200 g por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugada a 280 g por um minuto e colocada na estante magnética por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado cuidadosamente e em seguida foram adicionados 200 μ l de etanol 80%, no qual foi removido após 30 segundos. Novamente foram adicionados 200 μ l de etanol 80% e removido após 30 segundos. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, retirada da estante magnética. Foram adicionados 27 μ l de *Resuspension Buffer*, a placa foi colocada no agitador a 1200 g por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugada a 280 g por um minuto. A placa foi colocada novamente na estante magnética e foram transferidos 25 μ l do sobrenadante para outra placa. Após esta etapa, todas as amostras foram quantificadas no *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen).

Primeira hibridização - nesta etapa ocorre à formação dos *pools* de amostras e a utilização de sondas, desenhadas nas regiões de interesse. Foram formados dois *pools* com oito amostras cada. Inicialmente todas as amostras foram diluídas para 500 ng, dos quais 5 µl de cada amostra foram utilizadas. Foram adicionados em cada *pool* 40 µl de *DNA library sample or library pool from NLS plate*, 50 µl de *Enrichment Hybridization Buffer* e 10 µl de *Expanded Exome Oligos*. A placa foi colocada no agitador a 800 g por um minuto, centrifugada a 280 g por um minuto e levada ao termociclador e submetida a: 95°C por 10 minutos; 18 ciclos de 1 minuto, começando a 94°C e diminuindo 2°C por ciclo; 58°C de 90 minutos a 24 horas.

Primeira captura - Este processo utiliza estreptavidina para capturar as sondas hibridizadas com as regiões de interesse. Esta etapa consiste em períodos de ligação, lavagem e eluição. Na primeira ligação a placa foi centrifugada a 280 g por um minuto e, em seguida, 100 µl do sobrenadante foram transferidos para outra placa. Foram adicionados 250 µl de *Streptavidin Magnetic Beads*, a placa foi colocada no agitador a 800 g por 5 minutos, incubada a temperatura ambiente por 25 minutos, centrifugada a 280 g por um minuto, colocada na estante magnética por 2 minutos, cuidadosamente foi descartado o sobrenadante e em seguida a placa foi retirada da estante magnética.

Na primeira lavagem foram adicionados 200 µl de *Enrichment Wash Buffer*, a placa foi colocada no agitador a 1200 g por 4 minutos e os *pools* foram ressuspensos com o auxílio da pipeta. Em seguida foram incubados a 50°C por 30 minutos, e imediatamente colocados na estante magnética por 2 minutos, cuidadosamente todo o sobrenadante foi descartado. A placa foi removida da estante magnética e todo este processo foi repetido.

Na primeira eluição foram adicionados em tubos de 1,7 mL 28,5 µl de *Enrichment Elution Buffer 1* e 1,5 µl de 2N NaOH, no qual foram vortexados e utilizados 23 µl para ser adicionado em cada *pool*. A placa foi colocada no agitador a 1200 g por 2 minutos, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugada a 280 g por um minuto, colocada na estante magnética por 2 minutos e foram transferidos 21 µl do sobrenadante para outra placa. Foram adicionados 4 µl de *Elute Target Buffer*, a placa foi colocada no agitador a 800 g por um minuto e centrifugada a 280 g por um minuto.

Segunda hibridização - esta etapa é necessária para assegurar elevada especificidade das regiões capturadas. Para isso, foram adicionados 15 µl de *Resuspension Buffer*, 50 µl de *Enrichment Hybridization Buffer* e 10 µl de *Expanded Exome Oligos*. A placa foi colocada no agitador a 800 g por um minuto, centrifugada a 280 g por um minuto e incubada a 58°C de 14.5 a 24 horas.

Segunda captura - conforme a primeira captura, este processo também utiliza estreptavidina e consiste em etapas de ligação, lavagem e eluição.

Na segunda ligação a placa foi centrifugada a 280 g por um minuto e, em seguida, 100 µl do sobrenadante foram transferidos para outra placa. Foram adicionados 250 µl de *Streptavidin Magnetic Beads*, a placa foi colocada no agitador a 800 g por 5 minutos, incubada a temperatura ambiente por 25 minutos, centrifugada a 280 g por um minuto, colocada na estante magnética por 2 minutos, cuidadosamente foi descartado o sobrenadante e em seguida a placa foi retirada da estante magnética.

Na segunda lavagem foram adicionados 200 µl de *Enrichment Wash Buffer*, a placa foi colocada no agitador a 1200 g por 4 minutos e os *pools* foram ressuspensos utilizando a pipeta. Em seguida foram incubados a 50°C por 30 minutos, imediatamente colocados na estante magnética por 2 minutos e cuidadosamente foi descartado todo sobrenadante. A placa foi removida da estante magnética e todo este processo foi repetido novamente.

Na segunda eluição foram adicionados em tubos de 1,7 mL 28,5 µl de *Enrichment Elution Buffer 1* e 1,5 µl de 2N NaOH, no qual foram vortexados e utilizados 23 µl para ser adicionado em cada *pool*. A placa foi colocada no agitador a 1200 g por 2 minutos, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugada a 280 g por um minuto, colocada na estante magnética por 2 minutos e foram transferidos 21 µl do sobrenadante para outra placa. Foram adicionados 4 µl de *Elute Targuet Buffer*, a placa foi colocada no agitador a 800 g por um minuto e centrifugada a 280 g por um minuto.

Clean Up captura - esta etapa envolve a purificação das etapas de capturas. Foram adicionados 45 µl *Purification Beads* em cada *pool*, a placa foi colocada no agitador a 1200 g por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugada a 280 g por um minuto e colocada na estante magnética por 2 minutos,

cuidadosamente foi descartado o sobrenadante e em seguida foram adicionados 200 µl de etanol 80%, no qual foi removido após 30 segundos. Novamente foram adicionados 200 µl de etanol 80% e removido após 30 segundos. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida, retirada da estante magnética. Foram adicionados 27,5 µl de *Ressuspension Buffer*, a placa foi colocada no agitador a 1200 g por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugada a 280 g por um minuto. A placa foi colocada novamente na estante magnética e foram transferidos 25 µl do sobrenadante para outra placa.

Segunda PCR amplificação - esta etapa amplifica toda etapa anterior. Foram adicionados 5 µl de *PCR Primer Cocktail* e 20 µl de *Nextera Enrichment Amplification Mix* em cada *pool*, a placa foi colocada no agitador a 800 g por um minuto, centrifugada a 280 g por um minuto e levada ao termociclador e submetida a: 98°C por 30 segundos; 10 ciclos com variação de temperatura: 98°C por 10 segundos; 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando em 72°C por 5 minutos e a 10°C por tempo indeterminado.

Clean Up da segunda PCR - este processo utiliza *beads* para purificar a biblioteca, removendo produtos não utilizados. A placa foi centrifugada a 280 g por um minuto e, em seguida, 50 µl do sobrenadante foram transferidos para outra placa. Foram adicionados 90 µl de *Sample Purification Beads*, a placa foi colocada no agitador a 1200 g por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugada a 280 g por um minuto e colocada na estante magnética por 2 minutos. Cuidadosamente foi descartado o sobrenadante e em seguida foram adicionados 200 µl de etanol 80%, no qual foi removido após 30 segundos. Novamente foram adicionados 200 µl de etanol 80% e removido após 30 segundos. A placa foi incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida, retirada da estante magnética. Foram adicionados 32 µl de *Ressuspension Buffer*, a placa foi colocada no agitador a 1200 g por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugada a 280 g por um minuto. A placa foi colocada novamente na estante magnética e foram transferidos 30 µl do sobrenadante para outra placa. As amostras foram armazenadas em tubos de 0,2 µl, identificadas e armazenadas a -20°C.

Os produtos dessa reação foi sequenciado no aparelho *HiSeqTM 1000* (Illumina) do Laboratório de Biotecnologia Animal, Departamento de Zootecnia, da Universidade de São Paulo (USP) em Piracicaba, sob coordenação do Dr. Luiz Coutinho.

Análise dos dados de bioinformática do sequenciamento completo do exoma - foi realizada em colaboração com Dr. Paul Boutros e Veronica Sabelnykova do Departamento de Informática e Bioinformática do *Ontario Institute for Cancer Research* (OICR), Toronto – Canadá.

- ✓ **Alinhamento** - as 16 amostras, provenientes de oito pacientes (DNA das células mononucleares do sangue e tumor) foram alinhadas no BWA v0.5.7 usando o hg19 como referência do genoma humano. Todas as amostras foram processadas em conjunto usando o GATK v2.4.9 (realinhamento local e recalibração da base de qualidade). SAMtools v0.1.9 e Picard v1.107 foram usados para processar o *bam headers* e os *index* das amostras, respectivamente.
- ✓ **Deteção de Variantes Somáticas** - para detecção de variantes de um único nucleotídeo (do inglês *Single Nucleotide Variants* - SNVs), utilizamos o *software* SomaticSniper (v1.0.2). Parâmetros padrão foram utilizados para a chamada das SNVs, exceto opção *-q* (limite de qualidade de mapeamento), no qual foi definido como 1, como recomendado pelo fabricante. Para filtrar as variantes candidatas, um arquivo *pipleup indel* foi gerado para ambas as amostras (normal e tumoral) usando *SAMtools* (v0.1.6). O *SomaticSniper* fornece uma série de *Perl scripts* para filtrar possíveis falsos positivos. Primeiramente, a filtragem padrão e perda de heterozigose (LOH) foram realizadas utilizando os arquivos *pipleup InDel* e, em seguida, filtro *bam-readcount* também foi utilizado (*bam-readcount*, em 10 de janeiro de 2014), utilizando o filtro de qualidade mapeamento *-q 1*. Além disso, utilizamos o filtro de falso positivo. Por fim, o filtro de alta confiança foi utilizado com os parâmetros padrão. O arquivo VCF final, que contém variantes somáticas de alta confiança foi gerado e utilizado na análise posterior. (<http://gmt.genome.wustl.edu/somaticsniper/1.0.3/documentation.html>).
- ✓ **Deteção de SNVs Recorrentes** - uma chamada *in-house pipeline* recSNV foi utilizada para detecção de alterações recorrentes. Parâmetros para detecção de genes mutados, em pelo menos duas amostras foram utilizados. Primeiramente

um arquivo VCF das SNVs foram convertidos em arquivo BED utilizando o *Perl script* ([vcf2annovar.pl](#)). O *pipeline* usado lista polimorfismos de único nucleotídeo (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism* – SNPs) compilados a partir de vários estudos para filtrar as SNPs a partir das amostras, a menos que tenham “*PASS*” *flag*. Assim, todas as SNPs provenientes do COSMIC associadas ao câncer foram mantidas. Para cada chamada de SNVs foram aplicados os filtros: Fuentes, COSMIC v71 (região codificante e não codificante), dbSNP142, 1000 Genomes, AccuSNP blacklist, ENCODE (DAC e DUKE).

Assim, foi gerado um relatório contendo diversas informações: troca de bases das alterações; tipo de mutação; *heatmap seqsig* e gráfico de trinucleotídeo mostrando o número de SNPs em cada uma das 96 possíveis alterações.

Os dados do *heatmap seqsig* foi gerado considerando todas as variantes funcionais filtradas na [functional_variantMatrix_filtered.xls files](#). Para detectar variantes significativas, *SeqSig* assumiu: (a) somente regiões codificadoras podem causar câncer; (b) foram consideradas somente substituição de bases, excluindo as inserções, deleções ou outro tipo de alteração;

Normalmente, apenas os genes presentes em pelo menos duas amostras são representados no *heatmap*, no entanto, todas as variantes funcionais foram exibidas. O *SeqSig* representa o $-10^{*}(\text{fdr ajustado } p\text{-value})$ de particular gene. A hipótese nula é que o gene em questão não é *driver*, assim, um alto *score* indica que a hipótese nula foi rejeitada e o gene foi considerado *driver*.

Para as alterações missense, também calculamos a probabilidade de ser ou não patogênica pelos *softwares* PolyPhen e SIFT. Além disso, utilizamos o COSMIC para verificar a frequência de alterações nos genes.

• Meta Análise

Identificação dos artigos - primeiramente o banco de dados do COSMIC foi utilizado em outubro de 2013 para a identificação dos cinco genes mais frequentemente mutados em câncer de mama. Foi utilizada a estratégia de busca: tecido (mama), subtecido (todos) e histologia (todas). Os genes selecionados foram: *PIK3CA* (25%),

TP53 (23%), *CDH1* (11%), *GATA3* (7%) e *PTEN* (5%). As referências bibliográficas referentes aos genes selecionados foram revisadas. Em seguida, Utilizando as seguintes Palavras chaves no “*PubMed Advanced Search Builder*”: breast neoplasms[MeSH Terms] AND "somatic"[All Fields] AND ("2003/10/13"[PDat] : "2015/02/11"[PDat] AND "humans"[MeSH Terms]) e (breast neoplasm [MeSH Terms]) AND "somatic" AND "PIK3CA". Após, alteramos o gene *PIK3CA* para os genes: “TP53”; P53; CDH1; GATA3 e PTEN. Após a pesquisa no COSMIC e PubMed, 821 artigos foram identificados, contudo 26 artigos foram selecionados (Figura 2 e Tabela 6).

Figura 2 - Método de busca dos artigos da meta análise

Crítérios de inclusão e exclusão dos artigos - foram usados os critérios de seleção dos artigos: (a) dados individualizados das pacientes, como idade e mutação somática; (b) sequenciamento do genoma e/ou exoma e (c) análise de mutação nos cinco genes selecionados utilizando sequenciamento capilar. Os critérios de exclusão foram: (a) estudos sem dados individuais das pacientes; (b) mutação analisada por Perda de heterozigose (do inglês, *loss of heterozygosity* – LOH), Polimorfismo de conformação de filamento único (do inglês, *Single-Strand Conformation Polymorphism* – SSCP), Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, *Denaturing High Pressure Liquid Chromatography* – DHPLC) não confirmadas por sequenciamento capilar e (c) outras técnicas não relacionada com sequenciamento capilar.

As referências dos artigos selecionados, revisões e meta análises foram revisadas. Entramos em contato, via email, com todos os autores dos artigos onde não havia dados individuais das pacientes, contudo, apenas um nos enviou os dados (Miron et al., 2010). Cada resumo foi avaliado por dois pesquisadores de forma independente. Em caso de desacordo, o artigo foi discutido em grupo para uma conclusão. Todos os resumos publicados em outros idiomas, exceto inglês, foram revisados, porém, nenhum preencheu os critérios de inclusão.

Coleta dos dados - os títulos dos 821 artigos com seus respectivos critérios de inclusão ou exclusão foram organizados em uma planilha. Em seguida, separamos apenas os artigos selecionados relatando em cada linha a identificação da paciente, idade, histologia do tumor, grau histológico, estágio, ER, PR, HER2 e mutação (presença ou ausência). Não consideramos o tipo de mutação nem o número de mutações no mesmo gene. Em caso de dados da mesma amostra em diferentes trabalhos, apenas um foi levado em consideração.

Análise dos dados - separamos as pacientes em mais jovens (≤ 35 anos) e mais velhas (> 35 anos). Além disso, estratificamos em sete grupos etários: (1) < 30 anos, (2) 30-39 anos, (3) 40-49 anos, (4) 50-59 anos, (5) 60-69 anos, (6) 70-79 anos e (7) ≥ 80 anos. Quando reportado menos de 10 pacientes, o grupo etário foi excluído da análise.

Para análise dos dados utilizamos o *Statistical Package for the Social Sciences* 18.0 (SPSS). Qui-quadrado e Teste Exato de Fisher foram utilizados para avaliar a associação entre as variáveis. Odds ratio (OR) e 95% intervalo de confiança (95% CIs)

foi utilizado na análise de regressão logística. Correlação entre as variáveis foi avaliada usando Correlação de Pearson. Valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

Tabela 6 - Artigos selecionados na meta análise

Autor	Ptc (n)	Gene	Metodologia
Ding et al.	1	Todos	Sequenciamento do genoma e/ou exoma
Yost et al.	2	Todos	Sequenciamento do genoma e/ou exoma
Nik-Zainal et al.	21	Todos	Sequenciamento do genoma e/ou exoma
Banerji et al.	103	Todos	Sequenciamento do genoma e/ou exoma
Shah et al.	63	Todos	Sequenciamento do genoma e/ou exoma
Stephens et al.	100	Todos	Sequenciamento do genoma e/ou exoma
Ellis et al.	317	Todos	Sequenciamento do genoma e/ou exoma (77 pacientes), PIK3CA, TP53, CDH1 and GATA3 (240 pacientes)
Jiao et al.	15	Todos	Sequenciamento do genoma e/ou exoma
Craig et al.	14	Todos	Sequenciamento do genoma e/ou exoma
Benvenuti et al.	85	<i>PIK3CA</i>	Sequenciamento capilar
Miron et al.	80	<i>PIK3CA</i>	Sequenciamento capilar
Martins et al.	75	<i>PIK3CA</i>	Sequenciamento capilar
Hernandez et al.	13	<i>PIK3CA</i>	Sequenom MassArray - Sequenciamento capilar
Lima et al.	1	<i>PTEN</i>	Sequenciamento capilar
Jong et al.	89	<i>TP53</i>	DHPLC - Sequenciamento capilar
Lavarino et al.	31	<i>TP53</i>	SSCP- Sequenciamento capilar
Wistuba et al.	2	<i>TP53</i>	SSCP- Sequenciamento capilar
Masri et al.	19	<i>TP53</i>	Sequenciamento capilar
Lien et al.	14	<i>TP53</i>	Sequenciamento capilar
Eachkoti et al.	25	<i>TP53</i>	SSCP- Sequenciamento capilar
Vincent-Salomon et al.	48	<i>TP53</i>	Sequenciamento capilar
Aceto et al.	4	<i>TP53</i>	DHPLC - Sequenciamento capilar
Curtis et al.	820	<i>TP53</i>	Sequenciamento capilar
Ripamonti et al.	1	<i>TP53</i>	Sequenciamento capilar
Sjoblom et al.	36	<i>TP53/GATA3/CDH1</i>	Sequenciamento capilar
Ang et al.	1	<i>TP53/PIK3CA</i>	Sequenom MassArray - Sequenciamento capilar

Ptc, paciente; DHPLC, Denaturing High Pressure Liquid Chromatography; SSCP, Single-Strand Conformation Polymorphism

- **Análise pelo Método de Sanger de Algumas Alterações do Sequenciamento do Exoma e dos Exons 9 e 20 do Gene *PIK3CA* em Amostras Emblocadas em Parafina**

Para confirmação dos resultados do sequenciamento do exoma, selecionamos 14 alterações e fizemos o sequenciamento pelo método de Sanger das mesmas amostras de DNA no qual foi sequenciado o exoma.

Para determinarmos a frequência de mutação somática no gene *PIK3CA*, fizemos o sequenciamento, dos exons 9 e 20, do DNA proveniente do tecido tumoral emblocado em parafina de outras pacientes jovens e de um grupo de pacientes mais idosas (≥ 55 anos). Nas amostras positivas para a alteração no tumor, fizemos o sequenciamento pareado utilizando DNA das células mononucleares do sangue para confirmação da mutação somática.

- **Extração de DNA de Tecido Emblocado em Parafina**

Para cada amostra uma lâmina corada com HE foi analisada pelo médico-patologista e a região de interesse foi demarcada com uma média de 70% de células tumorais (variando de 30-100%). Com auxílio do Micrótomo (*Leica Biosystems* - RM2235), foram obtidos corte de 10 μ m e depositados sob laminas (o número de cortes variou dependendo do tamanho do material de cada paciente). Utilizando com guia a lâmina de HE previamente analisada, a região de interesse foi raspada e armazenada em tubos de 1,5 mL. Nos casos de biópsia, foram obtidos cinco corte de 20 μ m cada e armazenados em tubos de 1,5 mL.

O DNA foi extraído por meio do *QIAamp® DNA FFPE Tissue* (Qiagen - 56404). Para desparafinização do tecido tumoral, foi adicionando 1 mL de xilol 100% e agitado em vórtex por 10 segundos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 20.000 g por 2 minutos. Para a retirada de todo xilol, os tubos foram invertidos e adicionado 1 mL de etanol 100%, agitados em vórtex por 15 segundos e centrifugados a 20.000 g 2 minutos. Em seguida, os tubos foram 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. Para isso, foram adicionados 180 μ l de *Buffer ATL* e 20 μ l de Proteinase K, seguida de homogeneização por vórtex durante 15

segundos. As amostras foram incubadas a 56°C por 4 horas, agitando ocasionalmente, e a 90°C por 30 minutos. Para garantir remoção de RNA, foram adicionados 2 µl de RNase A (100 mg/µl), homogeneizados por vórtex por 15 segundos e incubado por 2 minutos. Foram adicionados 200 µl de *Buffer AL* e 200 µl de etanol (96-100%) e agitado em vórtex por 15 segundos. As amostras foram brevemente centrifugadas e cuidadosamente transferidas para colunas. As colunas foram centrifugadas a 6000 g por 1 minuto e o filtrado foi descartado. Foram adicionados 500 µl de *Buffer AW1*, centrifugadas a 6.000 g por 1 minuto e o filtrado foi descartado. Foram adicionados 500 µl de *Buffer AW2* e centrifugadas a 6.000 g por 1 minuto, onde novamente o filtrado foi descartado. Para remoção de qualquer resíduo, as colunas foram centrifugadas a 20.000 g por 3 minutos. Por fim, as colunas foram transferidas para microtubos de 1,5 mL, onde, foram adicionados 30 µl de *Buffer ATE*, incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente e centrifugadas a 20.000 g por 1 minuto. As colunas foram removidas e as amostras armazenadas a -20°C.

Uma alíquota de cada amostra foi avaliada quantitativamente utilizando *Nanodrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc)*, também utilizado para avaliar a pureza da amostra em relação às proteínas e reagentes utilizados no processo de extração do DNA.

• PCR e Sequenciamento

Inicialmente, os oligonucleotídeos foram desenhados flanqueando as alterações de interesse (Anexo F). Utilizamos a sequência referência de cada gene, depositada no GenBank do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), com o auxílio do programa *Primer3* (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Para análise de homologia com outras sequências utilizamos o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e *BLAST-like alignment tool* (BLAT - <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>). As regiões de interesse foram amplificadas pela PCR e sequenciadas conforme utilizado nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

- **Caracterização dos Subtipos Luminal A e Luminal B por Imuno-Histoquímica do Anticorpo Ki67 dos Tumores para o Sequenciamento Completo do Exoma**

Os tumores utilizados no sequenciamento do exoma foram caracterizados em luminais A ou B por meio da marcação do anticorpo Ki67. Para isso, cortes de 5 µm de espessura do tecido emblocado em parafina foram depositados sobre lâminas silanizadas, as quais foram deixadas por 24 horas em estufa a 60°C. A seguir realizou-se tratamento sequencial em xilol (60°C por 20 minutos e temperatura ambiente pelo mesmo tempo) e etanol (a 100%, 95%, 80% e 70%, por 30 segundos em cada concentração) e lavadas, primeiro em água corrente e depois em água destilada. Para recuperação dos antígenos, as laminas foram fervidas, sob pressurização (panela de pressão Rochedo, A La Carte), em *Antigen Retrieval Buffer 1* (100x) pH=6.0 (*Spring Bioscience* - PMB1 250) diluído em água destilada por 5 min. Esfriou-se a panela sob água corrente até a despressurização total, para depois lavar as lâminas em água corrente e destilada e proceder ao bloqueio da peroxidase endógena (*Spring Bioscience* - AHP125) por 20 minutos a temperatura ambiente. Após nova lavagem com água destilada, as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem *TBS with Tween 20* (20x) (*Spring Bioscience* - TBT999) por 05 minutos. Em seguida, foi aplicado o anticorpo primário anti-Ki67 (*Spring Bioscience* - cat#M3064), diluído 1:200 em solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubado por 16 a 18 horas a 4°C em câmara úmida. As lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e incubadas com polímero *N-Histofine® Stain* (CosmoBio CO - NIC-414251F - anti *rabbit*) por 30 minutos a temperatura ambiente. Novamente foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. Por fim, as lâminas foram incubadas em solução substrato cromógeno 100 mg de 3,3' *Diaminobenzidine Tetrahydrochloride* (DAB) (Sigma-Aldrich - D-5637, EUA); 1 mL Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL H₂O₂ 6%; 100 mL PBS; por 5 minutos a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Nova lavagem foi conduzida em água destilada. As laminas foram contra coradas com hematoxilina de Harris por 40 segundos, lavadas em água (corrente e destilada). A seguir realizou-se desidratação sequencial das lâminas em etanol (50%, 80% e 95% por 30 segundos em cada concentração e a 100%, 03 vezes, 30 segundos cada) e xilol (04 vezes, 30

segundos cada) e etanol (a 100%, 95%, 80% e 70%, por 30 segundos em cada concentração), sendo montadas com *Entellan* (Merck, 1.07961, Alemanha).

3.5. Seleção de Genes para Construção de Painel para Pesquisa de Mutação Somática em Pacientes Jovens com Câncer de Mama

Selecionamos alguns genes para a construção de um painel para analisar a frequência de mutações somáticas em pacientes jovens com câncer de mama. Utilizamos como critérios de seleção dos genes: a) dados do exoma das oito amostras de pacientes jovens, considerando a função do gene e análise no PolyPhen e SIFT; b) analisamos dados de pacientes jovens (≤ 35 anos) de trabalhos que utilizaram sequenciamento de nova geração (genoma ou exoma) e c) os onze genes mais frequentemente mutados em câncer de mama, segundo o banco de dados COSMIC (acesso em 04/03/2015).

4. RESULTADOS

4.1. Características das Pacientes e da Doença

Nosso primeiro objetivo foi analisar características clínicas, hábitos de vida e história familiar das pacientes jovens com câncer de mama. Para isso, foram incluídas 83 pacientes (Anexo G), que tiveram diagnóstico de câncer de mama entre 18-35 anos. A idade mediana ao diagnóstico foi de 32 anos, variando de 22 a 35 anos. A maioria das pacientes foi diagnosticada com carcinoma ductal invasivo (n=74: 89,3%), de alto grau histológico - Nottingham (n=39: 49,4%), alto índice proliferativo de acordo com a expressão de Ki67 (n=58: 89,2%) e subtipo luminal (n=54: 65,9%), com positividade para ER (n=51: 61,4%) e PR (n=52: 62,7%). Além disso, oito (9,8%) e 20 (24,4%) pacientes apresentaram tumores com amplificação de HER2 e tumores triplo negativo, respectivamente (Tabela 7).

A classificação quanto ao estágio clínico ao diagnóstico mostrou que 35 (48,6%) pacientes jovens apresentaram doença localizada (estádios I e II), 33 (45,8%) doença localmente avançada (estádio III) e quatro (5,6%) doença metastática (estádio IV) (Tabela 7), principalmente em osso e sistema nervoso central.

Tabela 7 - Dados Clínico-Patológicos das pacientes jovens

Característica Clínico-Patológica	Pacientes Jovens n (%)
Idade Mediana ao Diagnóstico	32 anos (22 a 35 anos)
Tipo Histológico	
CDI	74 (89,3)
CLI	3 (3,6)
Outros	6 (7,1)
Grau Histológico	
1	3 (3,8)
2	37 (46,8)
3	39 (49,4)
Ausente	4
Ki67	
≤14%	7 (10,8)
>14%	58 (89,2)
Ausente	18
Subtipo Molecular	
Luminal	54 (65,9)
HER2	8 (9,8)
Triplo Negativo	20 (24,4)
Ausente	1
Status ER	
Pos	51 (61,4)
Neg	32 (38,6)
Status PR	
Pos	52 (62,7)
Neg	31 (37,3)
Status HER2	
Pos	16 (19,5)
Neg	66 (80,5)
Ausente	1
Estadiamento	
I e II	35 (48,6)
III	33 (45,8)
IV	4 (5,6)
Ausente	11

CDI, carcinoma ductal invasivo; CLI, carcinoma lobular invasivo

4.2. Questionário

• História Menstrual e Obstétrica

Em relação à exposição hormonal, a idade mediana da menarca das pacientes jovens foi 13 anos, variando de oito a 19 anos; 67 (80,7%) pacientes já utilizaram contraceptivo oral em algum momento da vida, contudo, devido à doença, nenhuma utiliza este método atualmente; 59 (71,1%) já passaram por pelo menos uma gestação a termo com idade mediana de 22 anos, variando 14 a 34 anos, sendo que a maioria passou por pelo menos 1-2 gestações (n=47: 79,7%). A maioria delas (n=48: 81,4%) amamentaram seus filhos (Tabela 8), principalmente por um período de três meses a um ano.

• Hábitos de Vida

Observamos que 67 (80,7%) das pacientes jovens nunca fumaram e 62 (74,7%) não ingerem bebida alcoólica regularmente. Além disso, a maioria das pacientes (n=38: 45,7%) encontra-se com peso normal no momento da consulta, sendo a mediana para índice de massa corpórea (IMC) de 25,26, variando de 10,78 a 41,57 (Tabela 8). Além disso, a maioria das pacientes aos 18 anos (n=62: 74,7%) e 30 anos (n=31: 44,9) tinham peso normal.

• Cor da Pele e Ascendência

Baseado na Classificação de Fitzgerald para a definição de cores de pele, usando a escala de Von Luschan, a maioria das pacientes jovens declarou-se clara média (n=30: 36,1%), clara (n=25: 30,1%) e escura média (n=16: 19,3%). Além disso, 20 (24,1%) pacientes relataram ser de ascendência europeia (materna) e 14 (16,9%) europeia (paterna), entretanto, a maioria, tanto do lado materno (n=51: 61,4%) quanto paterno (n=57: 68,7%) não conhece sua ascendência, relatando que todos os membros conhecidos de sua família nasceram no Brasil (Tabela 8).

• História Familiar de Câncer

A história familiar das pacientes foi pesquisada com base nos critérios sugestivos de Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário da NCCN (versão 2 de 2014 Tabela 4). Nas pacientes jovens observou-se que 64 (77,1%) pacientes referiram história

familiar informativa e 19 (22,9%) referiram uma história familiar limitada (não informativa), principalmente pelo desconhecimento de familiares do lado paterno. Dentre as pacientes com história familiar informativa, 30 (46,9%) declararam história familiar positiva (Tabela 9), sendo que, dez (33,3%) relataram ter parente de primeiro grau (pais e irmãos) acometido com cânceres referente a esta síndrome, 22 (73,3%) em parentes de segundo grau (avôs e tios) e nove (30%) em parentes de terceiro grau (primos).

Tabela 8 - Dados do questionário das pacientes jovens

Dados do Questionário	Pacientes Jovens n (%)
Idade Mediana	
Menarca	13 anos (oito a 19 anos)
Primeira Gestação	22 anos (14 a 34 anos)
IMC atual	25,26 (10,78 a 41,57)
Método Contraceptivo	
Sim	67 (80,7)
Não	16 (19,3)
Gestação	
Sim	59 (71,1)
Não	24 (28,9)
Número de Gestações	
1-2 gestações	47 (79,7)
3-4 gestações	8 (13,6)
≥5 gestações	4 (6,8)
Amamentação	
Sim	48 (81,4)
Não	11 (18,6)
Uso de Cigarro	
Fumante	5 (6)
Ex fumante	11 (13,3)
Nunca fumou	67 (80,7)
Uso de Álcool	
Sim, ainda ingere	21 (25,3)
Não, nunca ingeriu	33 (39,8)
Não, só no passado	29 (34,9)
IMC atual	
Abaixo do peso	2 (2,4)
Peso normal	38 (45,8)
Acima do peso	25 (30,1)
Obesidade	18 (21,7)

continua

conclusão

Dados do Questionário	Pacientes Jovens n (%)
IMC aos 18 anos	
Abaixo do peso	2 (2,4)
Peso normal	62 (74,7)
Acima do peso	15 (18,1)
Obesidade	4 (4,8)
IMC aos 30 anos	
Peso normal	31 (44,9)
Acima do peso	26 (37,7)
Obesidade	12 (17,4)
Cor da Pele	
Muito clara	7 (8,4)
Clara	25 (30,1)
Clara média	30 (36,1)
Escura média	16 (19,3)
Escura, marrom ou parda	5 (6)
Muito escura ou negra	0
Ascendência Materna	
Africano	1 (1,2)
Europeu	20 (24,1)
Asiático	2 (2,4)
Indígena	9 (10,8)
Oriental	0
Desconhecida	51 (61,4)
Ascendência Paterna	
Africano	7 (8,4)
Europeu	14 (16,9)
Asiático	2 (2,4)
Indígena	3 (3,6)
Oriental	0
Desconhecida	57 (68,7)

IMC, Índice de Massa Corpórea

Tabela 9 - História familiar das pacientes jovens

História familiar	n (%)
Não informativa	19 (22,9)
Informativa	64 (77,1)
Sim	30 (46,9)
Não	34 (53,1)

Não informativa, <2 mulheres de primeiro ou segundo grau com ≤45 anos de cada lado da família

- **Cálculo de Risco**

O cálculo de risco por meio do *software* BOADICEA mostrou que a maioria das pacientes jovens apresentam risco <5% de serem portadoras de mutação deletéria, tanto no gene *BRCA1* (n=54: 68,4%) quanto no gene *BRCA2* (n=63: 79,7%), enquanto, onze (13,9%) e dez (12,7%) pacientes apresentam risco >10% de serem portadoras de mutação deletéria no gene *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente (Tabela 10).

4. 3. Análise de Mutação Germinativa nos Genes *BRCA1* e *BRCA2*

- **Sequenciamento Completo e MLPA dos Genes *BRCA1* e *BRCA2***

O segundo objetivo foi identificar a prevalência de mutação germinativa nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes jovens com câncer de mama. Para esta análise, setenta e nove pacientes foram incluídas. Quatro pacientes responderam o questionário, mas não realizaram o teste genético por opção própria.

Foram detectadas 13 (16,4%) pacientes com mutação deletéria, quatro (5,1%) no gene *BRCA1* e nove (11,3%) no gene *BRCA2*, todas confirmadas em uma segunda coleta de sangue. Dentre as quatro pacientes com mutação deletéria no gene *BRCA1*, diferentes porcentagens de risco de mutação pelo *software* BOADICEA foram observadas (<5%, 5-10%, 11-20% e >20%), enquanto que, dentre as nove pacientes com mutação no gene *BRCA2*, cinco apresentaram risco <5%, uma com risco 11-20% e três com risco >20% (Tabela 10).

Tabela 10 - Cálculo de risco (BOADICEA) e detecção de mutação deletéria nos gene *BRCA1* e *BRCA2*

Risco	<i>BRCA1</i>		<i>BRCA2</i>	
	BOADICEA n (%)	Mut (n)	BOADICEA n (%)	Mut (n)
<5%	54 (68,4)	1	63 (79,7)	5
5-10%	14 (17,7)	1	6 (7,6)	0
11-20%	5 (6,3)	1	6 (7,6)	1
>20%	6 (7,6)	1	4 (5,1)	3

Total de pacientes 79 (100%); Mut, mutação deletéria.

Das 30 pacientes com história familiar positiva, sete (23,3%) são carreadoras de mutação deletéria, entretanto, das 32 pacientes com história familiar negativa e das 17

com história familiar limitada, três (9,4%) e três (17,6%) pacientes são portadoras de mutação deletéria, respectivamente. Em contrapartida, das 13 pacientes carreadoras de mutação deletéria, sete (53,8%) relataram ter história familiar positiva, três (23,1%) história familiar negativa e três (23,1%) história familiar limitada (Anexo G).

Observamos que três (75%) pacientes carreadoras de mutação deletéria no gene *BRCA1* apresentam tumor triplo negativo e uma (25%) tumor luminal. Além disso, oito (88,9%) pacientes carreadoras de mutação deletéria no gene *BRCA2* apresentam tumores luminal e uma (11,1%) HER2 positivo. Em contrapartida, entre as 20 pacientes com tumor triplo negativo, três (15%) são carreadoras de mutação no gene *BRCA1*, já entre as 54 pacientes com tumores luminal, oito (14,9%) são carreadoras de mutação no gene *BRCA2* (Anexo G).

Detectamos 12 diferentes mutações. No gene *BRCA1*, três mutações são *Frameshift* e uma missense e no gene *BRCA2*, quatro são *Frameshift*, três nonsense e uma missense. O heredograma das pacientes e eletroferograma das mutações deletérias estão no Anexo H.

A mutação c.483T>A (C161X), foi classificada por nós como deletéria por gerar um *stop* códon no exon 6 do gene *BRCA2*, pois não foi descrita em nenhum dos banco de dados analisados. Apenas a mutação *Frameshift* c.2808_2811delACAA (3036delACAA), presente no gene *BRCA2* foi observada em duas pacientes (Tabela 11).

Além das mutações deletérias, detectamos no gene *BRCA1*, 29 alterações classificadas como benignas (11 missense, nove sinônimas, oito intrônicas e uma deleção *in frame*), cinco provavelmente benignas (todas intrônicas) e sete VUSs (duas missense, quatro intrônicas e uma deleção *in frame*). No gene *BRCA2*, foram detectadas 46 alterações classificadas como benignas (22 missense, 11 sinônimas, 11 intrônicas e duas 'UTR), uma provavelmente benigna (intrônica) e 22 VUSs (11 missense, três sinônimas e oito intrônicas). As 29 VUSs observadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, foram detectadas em 22 (27,8%) pacientes (Tabelas 12 e 13). Todas as alterações detectadas nesses genes estão descritas por paciente no Anexo I (*BRCA1*) e Anexo J (*BRCA2*).

Para as alterações missense, classificadas como VUS, procedeu-se à análise de probabilidade da mesma ser patogênica, utilizando-se os *softwares* PolyPhen, SIFT e

Align GVGD. Observou-se que a maioria delas são preditas como benignas, ou seja, não estão associadas à doença. Somente a alteração c.3349A>G (I1117V) foi determinada como potencialmente deletéria, utilizando-se os três *softwares* (Tabela 14).

Para análise das deleções *in frame*, utilizou-se o *software* Provean e as duas alterações identificadas no gene *BRCA1*, foram consideradas de significado deletério (Tabela 15). As pacientes portadoras destas alterações não têm familiar vivo com câncer que possibilitasse estudos adicionais.

Tabela 11 - Mutações deletérias nos genes *BRCA1* e *BRCA2*

Gene	Exon	NT	Códon	Designação	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Tipo	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar	n
<i>BRCA1</i>	2	185	22	185insA	c.66_67insA	p.Leu22_Glu23?fs	F	Sim	ND	ND	ND	Patogênica	1
	5	330	71	R71G	c.211A>G	p.Arg71Gly	M	Sim	Patogênica	ND	5-Causal	Patogênica	1
	11	3450	1111	3450del4	c.3331_3334delCAAG	p.Gln1111_Glu1112?fs	F	Sim	ND	ND	5-Causal	Patogênica	1
	20	5382	1755	5382insC	c.5263_5264insC	p.Ser1755?fs	F	Sim	ND	ND	ND	Patogênica	1
<i>BRCA2</i>	5-6	711	161	C161X	c.483T>A	p.Cys161Ter	N	ND	ND	ND	ND	ND	1
	10	1366	380	1366delA	c.1138_1138delA	p.Ser380Valfs	F	Sim	ND	ND	ND	Patogênica	1
	11	3036	936	3036delACAA	c.2808_2811delACAA	p.Lys936_Gln937?fs	F	Sim	ND	ND	5-Causal	Patogênica	2
	11	4184	1319	4184del4	c.3956_3959delATGA	p.Asn1319_Glu1320?fs	F	Sim	ND	ND	ND	Patogênica	1
	11	6884	2219	S2219X	c.6656C>G	p.Ser2219Ter	N	Sim	ND	ND	5-Causal	Patogênica	1
	13	7218	2330	7218del5	c.6990_6994delTACCT	p.Ile2330_Cys2332?fs	F	Sim	ND	ND	ND	Patogênica	1
	24	9382	3052	R3052W	c.9154C>T	p.Arg3052Trp	M	Desconhecida	Patogênica	5-Definitivamente patogênica	3-UV (incerta)	Patogênica	1
	25	9610	3128	R3128X	c.9382C>T	p.Arg3128Ter	N	Sim	ND	ND	5-Causal	Patogênica	1

NT, nucleotídeo; HGVS, *Human Genome Variation Society*; F, Frameshift; ND, não determinado; BIC, Breast Cancer Information Core; LOVD, Leiden Open Variation Database; LOVD-IARC, Leiden Open Variation Database - International Agency for Research on Cancer; UMD, Mutation Database Universal; n, número de pacientes acometidas com a mutação.

Tabela 12 - Alterações encontradas no gene *BRCA1*

Exon	NT	Códon	Designação	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Tipo	Global MAF	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar	Classif. Geral	n
2	140	7	140C>T	c.21C>T	p.Arg7=	Syn	A=0.0016/8	ND	ND	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
3	200-65	-	IVS2-65G>C	c.81-65G>C	-	IVS	ND	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Incerta	Benigna	1
3	233	38	233G>A	c.114G>A	p.Lys38=	Syn	T=0.0126/63	Não	Desconhecida	ND	2- Provavelmente neutra	Benigna	Benigna	1
5	331+23	-	IVS5+23T>A	c.212+23T>A	-	IVS	T=0.0106/53	ND	Desconhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	2
6	420+12	-	IVS+12A>C	c.301+12A>C	-	IVS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
7	441+36	-	c.441+36del14	c.441+36del14	-	IVS	ND	ND	ND	ND	1-Neutra	ND	Provavelmente benigna	45
7	441+51	-	IVS7+51delT	c.441+51delT	-	IVS	ND	ND	ND	ND	1-Neutra	ND	Provavelmente benigna	34
9	667-80	-	IVS8-80T>C	c.548-80T>C	-	IVS	ND	ND	ND	ND	1-Neutra	ND	VUS	1
9	667-58	-	IVS8-58delT	c.548-58_548-58delT	-	IVS	-=0.3349/1677	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	36
9	710	197	710C>T	c.591C>T	p.Cys197=	Syn	A=0.0004/2	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
10	713-67	-	IVS9-67G>T	c.594-67G>T	-	IVS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
11	1186	356	Q356R	c.1067A>G	p.Gln356Arg	M	C=0.0218/109	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	Benigna	Benigna	9
11	1965	616	S616del	c.1846_1848delTCT	p.Ser616delSer	IFD	-=0.0012/6	Desconhecida	ND	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
11	2090	657	2090A>G	c.1971A>G	p.Gln657=	Syn	C=0.0064/32	Não	ND	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
11	2116	666	2116T>C	c.1997T>C	p.Leu666Pro	M	ND	ND	ND	ND	3-UV (incerta)	ND	VUS	1
11	2196	693	D693N	c.2077G>A	p.Asp693Asn	M	T=0.0335/168	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	Benigna	Benigna	9
11	2201	694	2201C>T	c.2082C>T	p.Ser694=	Syn	A=0.3365/1685	Não	Desconhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	45

continua

continuação

Exon	NT	Códon	Designação	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Tipo	Global MAF	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar	Classif. Geral	n
11	2430	771	L771L	c.2311T>C	p.Leu771=	Syn	G=0.3353/1679	Não	Desconhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	42
11	2577	820	K820E	c.2458A>G	p.Lys820Glu	M	C=0.0104/52	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	Benigna	Benigna	3
11	2731	871	P871L	c.2612C>T	p.Pro871Leu	M	G=0.4561/2284	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	60
11	2933	938	2933A>G	c.2814A>G	p.Pro938=	Syn	C=0.0022/11	Não	ND	ND	3-UV (incerta)	Benigna	Benigna	2
11	3232	1038	E1038G	c.3113A>G	p.Glu1038Gly	M	C=0.3357/1681	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	Benigna	Benigna	43
11	3238	1040	S1040N	c.3119G>A	p.Ser1040Asn	M	T=0.0098/49	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	Benigna	Benigna	3
11	3537	1140	S1140G	c.3418A>G	p.Ser1140Gly	M	C=0.0100/50	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	Benigna	Benigna	2
11	3667	1183	K1183R	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	M	C=0.3526/1766	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	Benigna	Benigna	45
11	3858	1247	V1247I	c.3739G>A	p.Val1247Ile	M	T=0.0006/3	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
13	4427	1436	4427T>C	c.4308T>C	p.Ser1436=	Syn	G=0.3363/1684	Não	Desconhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	43
13	4466	1449	4466A>G	c.4347A>G	p.Thr1449=	Syn	C=0.0002/1	Não	ND	ND	ND	Benigna	Benigna	1
14	4603+14	-	IVS14+14A>G	c.4484+14A>G	-	IVS	C=0.0022/11	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	2-Provavelmente neutra	Benigna	Benigna	1
15	4604-64	-	IVS14-64C>G	c.4485-64C>G	-	IVS	ND	Desconhecida	ND	ND	ND	ND	Provavelmente benigna	45
16	4956	1613	S1613G	c.4837A>G	p.Ser1613Gly	M	C=0.3558/1782	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	Não	1-Neutra	Benigna	Benigna	45

continua

conclusão

Exon	NT	Códon	Designação	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Tipo	Global MAF	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar	Classif. Geral	n
16	5075	1652	M1652I	c.4956G>A	p.Met1652Ile	M	T=0.0112/56	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
17	5106-92	-	IVS16-92 A>G	c.4987-92A>G	-	IVS	C=0.3546/1776	Desconhecida	ND	ND	1-Neutra	ND	Provavelmente benigna	44
17	5106-68	-	IVS16-68 A>G	c.4987-68A>G	-	IVS	C=0.3546/1776	Não	Desconhecida	ND	1-Neutra	ND	Benigna	44
17	5106-20	-	IVS16-20A>G	c.4987-20A>G	-	IVS	C=0.0024/12	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
18	5194-53	-	IVS17-53C>T	c.5075-53C>T	-	IVS	A=0.0110/55	Não	ND	ND	1-Neutra	Incerta	Benigna	3
18	5271+66	-	IVS18+66 G>A	c.5152+66G>A	-	IVS	T=0.3425/1715	Não	Desconhecida	ND	1-Neutra	ND	Benigna	42
18	5271+85	-	IVS18+85 delT	c.5152+85_5152+85delT	-	IVS	ND	Desconhecida	Desconhecida	ND	1-Neutra	ND	Provavelmente benigna	4
23	5544	1809	VV1809del	c.5425_5430 delGTTGTG	p.Val1809_Val1810 delValVal	IFD	ND	Desconhecida	ND	ND	ND	Incerta	VUS	1
24	5606	1829	E1829K	c.5485G>A	p.Glu1829Lys	M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
24	5592+36	-	IVS24+36C>G	c.5592+36C>G	-	IVS	ND	Não	ND	ND	ND	ND	VUS	2

NT, nucleotídeo; HGVS, *Human Genome Variation Society*; Syn, sinônima; F, *Frameshift*; IVS, variante intrônica; M, missense; IFD, deleção *in frame*; ND, não determinado; MAF, minor allele frequency; BIC, Breast Cancer Information Core; LOVD, Leiden Open Variation Database; LOVD-IARC, Leiden Open Variation Database - International Agency for Research on Cancer; UMD, Mutation Database Universal; n, número de pacientes acometidas com a alteração

Tabela 13 - Alterações encontradas no gene *BRCA2*

Exon	NT	Códon	Designação	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Tipo	Global MAF	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar	Classif. Geral	n
2	203	-	203G>A	c.-26G>A	-	5'UTR	A=0.2093/1048	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	ND	Benigna	Benigna	28
2	218	-	218C>T	c.-11C>T	-	5'UTR	T=0.0044/22	Não	Desconhecida	ND	ND	Benigna	Benigna	1
3	296-38	-	IVS2-38A>G	c.68-38A>G	-	IVS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Provavelmente Benigna	26
3	353	42	Y42C	c.125A>G	p.Tyr42Cys	M	G=0.0008/4	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
5-6	516+21	-	IVS6+21A>T	c.516+21A>T	-	IVS	T=0.0090/45	ND	ND	ND	1-Neutra	Provavelmente benigna	Benigna	2
7	745-4	-	IVS6-4C>G	c.517-4C>G	-	IVS	G=?/0	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	ND	Incerta	VUS	1
8	909+56	-	IVS8+56C>T	c.681+56C>T	-	IVS	T=0.1859/931	ND	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Incerta	Benigna	27
10	1093	289	N289H	c.865A>C	p.Asn289His	M	C=0.0737/369	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	10
10		369	N369S	c.1105A>G	p.Asn369Ser	M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
10	1342	372	H372N	c.1114C>A	p.Asn372=	M	C=0.2494/1249	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	ND	Benigna	27
10	1503	425	E425E	c.1275A>G	p.Glu425=	Syn	G=0.0066/33	Não	ND	ND	3-UV (incerta)	Benigna	Benigna	1
10	1593	455	1593A>G	c.1365A>G	p.Ser455=	Syn	G=0.0737/369	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	Polimorfismo	Benigna	Benigna	11
11	2457	743	2457T>C	c.2229T>C	p.His743=	Syn	C=0.0735/368	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	10
11	3014	929	L929S	c.2786T>C	p.Leu929Ser	M	C=0.0020/10	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
11	3065	946	D946G	c.2837A>G	p.Asp946Gly	M	ND	Desconhecida	ND	ND	3-UV (incerta)	Incerta	VUS	1

continua

continuação

Exon	NT	Códon	Designação	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Tipo	Global MAF	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar	Classif. Geral	n
11	3188	987	N987I	c.2960A>T	p.Asn987Ile	M	T=0.0020/10	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
11	3199	991	N991D	c.2971A>G	p.Asn991Asp	M	G=0.0801/401	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	11
11		1078	V1078V	c.3234T>C	p.Val1078Val	Syn	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
11	3492	1088	3492T>C	c.3264T>C	p.Pro1088=	Syn	C=0.0068/34	Não	ND	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
11		1117	I1117V	c.3349A>G	p.Ile117Val	M	ND	ND	ND	ND	ND	Incerta	VUS	1
11	3624	1132	3624A>G	c.3396A>G	p.Lys1132=	Syn	G=0.2668/1336	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	34
11	4035	1269	4035T>C	c.3807T>C	p.Val1269=	Syn	C=0.1681/842	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	26
11	4138	1304	T1304S	c.3910A>T	p.Thr1304Ser	M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
11	4318	1364	I1364L	c.4090A>C	p.Ile1364Leu	M	C=0.0044/22	Não	ND	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
11	4415	1396	Q1396R	c.4187A>G	p.Gln1396Arg	M	G=0.0020/10	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	Provavelmente benigna	Benigna	1
11	4469	1414	T1414M	c.4241C>T	p.Thr1414Met	M	T=0.0024/12	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
11	4476	1416	1416A>C	c.4248A>G	p.Gln1416=	Syn	ND	ND	ND	ND	ND	Provavelmente benigna	VUS	1
11	4486	1420	D1420Y	c.4258G>T	p.Asp1420Tyr	M	T=0.0040/20	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	Benigna	Benigna	2
11		1472	K1472E	c.4414A>G	p.Lys1472Glu	M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
11	4791	1521	4791G>A	c.4563G>A	p.Leu1521=	Syn	A=0.0260/130	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	79
11	4909	1561	H1561N	c.4681C>A	p.His1561Asn	M	A=0.0016/8	Desconhecida	ND	ND	3-UV (incerta)	Benigna	VUS	1

continua

continuação

Exon	NT	Códon	Designação	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Tipo	Global MAF	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar	Classif. Geral	n
11	5324	1699	D1699G	c.5096A>G	p.Asp1699Gly	M	G=0.0002/1	Desconhecida	ND	ND	3-UV (incerta)	Incerta	VUS	1
11	5642	1805	N1805S	c.5414A>G	p.Asn1805Ser	M	G=?/0	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	ND	Incerta	VUS	1
11	5646	1806	5646A>G	c.5418A>G	p.Glu1806=	Syn	G=0.0068/34	Não	ND	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
11	5932	1902	D1902N	c.5704G>A	p.Asp1902Asn	M	A=0.0062/31	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
11	5972	1915	T1915M	c.5744C>T	p.Thr1915Met	M	T=0.0086/43	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	5
11		2026	T2026T	c.6078A>C	p.Thr2026Thr	Syn	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
11	6448	2074	H2074N	c.6220C>A	p.His2074Asn	M	A=0.0028/14	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	2-Provavelmente neutra	Benigna	Benigna	1
11	6551	2108	R2108H	c.6323G>A	p.Arg2108His	M	A=0.0038/19	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	1-Não patogênica	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
11	6640	2138	V2138F	c.6412G>T	p.Val2138Phe	M	T=0.0016/8	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	3-UV (incerta)	Benigna	Benigna	2
11	6741	2171	V2171V	c.6513C>G	p.Val2171=	Syn	G=0.0260/130	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	79
11	6782	2185	A2185V	c.6554C>T	p.Ala2185Val	M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
11	7069+80	-	IVS11+80delT TAA	c.6841+80_6841+83 delTTAA	-	IVS	ND	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Incerta	Benigna	36
12	770-73	-	IVS12-73T>A	c.6842-73T>A	-	IVS	ND	ND	ND	ND	Desconhecida	ND	VUS	2
14	7245	2339	K2339N	c.7017G>C	p.Lys2339Asn	M	C=0.0068/34	Não	ND	ND	2-Provavelmente neutra	Benigna	Benigna	1
14	7470	2414	7470A>G	c.7242A>G	p.Ser2414=	Syn	G=0.2326/1165	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	27

continua

continuação

Exon	NT	Códon	Designação	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Tipo	Global MAF	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar	Classif. Geral	n
14	7547	2440	H2440R	c.7319A>G	p.His2440Arg	M	G=0.0104/52	Não	ND	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
14	7625	2466	A2466V	c.7397C>T	p.Ala2466Val	M	T=0.0242/121	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	79
14	7646	2473	C2473Y	c.7418G>A	p.Cys2473Tyr	M	ND	Desconhecida	ND	ND	ND	Incerta	VUS	1
14	7663+53	-	IVS14+53C>T	c.7435+53C>T	-	IVS	T=0.0725/363	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	ND	Benigna	10
15	7697	2490	I2490T	c.7469T>C	p.Ile2490Thr	M	C=0.0160/80	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	4
16	8033+6	-	IVS16+6C>G	c.7805+6C>G	-	IVS	G=0.0016/8	Desconhecida	ND	ND	2- Provavelmente neutra	Benigna	Benigna	1
17	8034-14	-	IVS16-14T>C	c.7806-14T>C	-	IVS	T=0.4685/2346	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	32
18	8320	2698	A2698H	c.8092G>A	p.Ala2698Thr	M	A=?/0	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	ND	Incerta	VUS	1
19	8560-66	-	IVS18-66T>C	c.8332-66T>C	-	IVS	C=0.0014/7	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	3-UV (incerta)	Incerta	VUS	1
19	8715+19	-	IVS19+19A>G	c.8487+19A>G	-	IVS	G=0.0102/51	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	1
19	8715+47	-	IVS19+47C>T	c.8487+47C>T	-	IVS	T=0.0162/81	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Incerta	Benigna	2
20	8488-52	-	IVS19-52A>G	c.8488-52A>G	-	IVS	ND	ND	ND	ND	3-UV (incerta)	ND	VUS	1
22	8983-50	-	IVS21-50A>G	c.8755-50A>G	-	IVS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
22	8983-66	-	IVS21-66T>C	c.8755-66T>C	-	IVS	C=0.4884/2446	Não	ND	ND	1-Neutra	ND	Benigna	58

continua

conclusão

Exon	NT	Códon	Designação	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Tipo	Global MAF	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar	Classif. Geral	n
22	9079	2951	A2951T	c.8851G>A	p.Ala2951Thr	M	A=0.0100/50	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	4
25	9485-83	-	IVS24-83G>A	c.9257-83G>A	-	IVS	A=0.0505/253	Não	Desconhecida	ND	1-Neutra	Incerta	Benigna	8
26	9876+41	-	IVS26+41T>A	c.9648+41T>A	-	IVS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
26	9876+54	-	IVS26+54G>A	c.9648+54G>A	-	IVS	A=0.0018/9	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	3-UV (incerta)	Incerta	VUS	1
26	9876+106 6	-	IVS26+106del T	c.9648+106_9648+ 106delT	-	IVS	ND	Desconhecida	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	2- Provavelmente neutra	ND	Benigna	2
27	9877-68	-	IVS26-68G>A	c.9649-68G>A	-	IVS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
27	9958	3244	V3244I	c.9730G>A	p.Val3244Ile	M	ND	Não	ND	ND	3-UV (incerta)	Benigna	Benigna	1
27	10338	3370	R3370R	c.10110G>A	p.Arg3370=	Syn	A=0.0008/4	Desconhecida	Desconhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	7
27	10462	3412	I3412V	c.10234A>G	p.Ile3412Val	M	G=0.0449/225	Não	Nenhuma patogenicidade conhecida	ND	1-Neutra	Benigna	Benigna	8

NT, nucleotídeo; HGVS, *Human Genome Variation Society*; Syn, sinônima; F, *Frameshift*; IVS, variante intrônica; M, missense; ND, não determinado; MAF, minor allele frequency; BIC, Breast Cancer Information Core; LOVD, Leiden Open Variation Database; LOVD-IARC, Leiden Open Variation Database - International Agency for Research on Cancer; UMD, Mutation Database Universal; n, número de pacientes acometidas com a alteração

Tabela 14 – Análise in silico do potencial patogênico das alterações missense classificadas como VUS

Gene	Exon	Designação	HGVS cDNA	HGVS Proteína	PolyPhen	SIFT	Align GVGD	ID
BRCA1	11	2116T>C	c.1997T>C	p.Leu666Pro	Benigna	Tolerada	C0	498
	24	E1829K	c.5485G>A	p.Glu1829Lys	Benigna	Tolerada	C0	487
BRCA2	10	N369S	c.1105A>G	p.Asn369Ser	Benigna	Tolerada	C0	419
		D946G	c.2837A>G	p.Asp946Gly	Benigna	Tolerada	C0	452
		I1117V	c.3349A>G	p.Ile1117Val	Deletéria	Não Tolerada	C25	453
		T1304S	c.3910A>T	p.Thr1304Ser	Benigna	Tolerada	C0	521
	11	K1472E	c.4414A>G	p.Lys1472Glu	Deletéria	Tolerada	C0	503
		H1561N	c.4681C>A	p.His1561Asn	Benigna	Tolerada	C0	493
		D1699G	c.5096A>G	p.Asp1699Gly	Benigna	Tolerada	C0	480
		N1805S	c.5414A>G	p.Asn1805Ser	Provavelmente deletéria	Tolerada	C0	453
		A2185V	c.6554C>T	p.Ala2185Val	Benigna	Tolerada	C0	469
		C2473Y	c.7418G>A	p.Cys2473Tyr	Benigna	Tolerada	C0	452
	18	A2698H	c.8092G>A	p.Ala2698Thr	Benigna	Tolerada	C0	453

VUS, variant of uncertain significance; HGVS, *Human Genome Variation Society*; PolyPhen, *Polymorphism Phenotyping v2*; SIFT, *Sorting Intolerant From Tolerant*; AlignGVGD C0 é menos provável de interferir na função da proteína, já C25 é mais provável. ID, identificação da paciente.

Tabela 15 - Análise das deleções in frame presentes no gene BRCA1 com significado clínico desconhecido

Exon	Designação	HGVS cDNA	HGVS Proteína	Provean	Score	ID
11	S616del	c.1846_1848delTCT	p.Ser616delSer	Deletéria	-12.792	457
23	VV1809del	c.5425_5430 delGTTGTG	p.Val1809_Val1810 delValVal	Deletéria	-3.300	464

HGVS, *Human Genome Variation Society*; Provean, *Protein Variation Effect Analyzer*; ID, identificação da paciente.

Em pacientes que não apresentaram mutação deletéria pelo método de Sanger (n=66), os grandes rearranjos genômicos foram analisados pela técnica de MLPA. Não encontramos grandes deleções ou inserções nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em nenhuma das pacientes testadas (Anexo G). Além disso, nenhuma destas pacientes é carreadora da deleção c.1100delC no gene *CHECK2*, o qual também foi avaliado neste teste.

4. 4. Análise de Mutações Somáticas

• Sequenciamento do Exoma em Tumores Luminais das Pacientes Jovens

O terceiro objetivo foi identificar mutações somáticas em tumor luminal de pacientes jovens com câncer de mama por meio do sequenciamento completo do

exoma. Para isso, incluímos oito amostras de tumores coletados na cirurgia ou biópsia. O DNA foi extraído de região tumoral contendo $\geq 70\%$ de células malignas. Fizemos o sequenciamento pareado do DNA das células mononucleares do sangue e tumor da mesma paciente. Das oito amostras, duas são provenientes de tumor luminal A e estadiamento clínico I, seis são luminal B e estádios II, III e IV (Tabela 16).

Tabela 16 - Características das pacientes para o sequenciamento do exoma

ID	Idade	Histol.	Grade	ER	PR	HER2	Ki67	Lum.	Estadio	BRCA mut	HF
402	27	CLI	II	pos	pos	neg	30%	B	IIA	Não	Limitada
413	35	CDI	III	pos	pos	neg	35%	B	IIA	Não	Sim
406	33	CDI	II	pos	pos	neg	10%	A	I	Não	Não
416	27	CDI	II	pos	pos	neg	20%	B	IIA	Não	Não
401	24	CDI	II	pos	pos	neg	35%	B	IIA	Não	Sim
404	28	CDI	III	pos	pos	neg	50%	B	IIIA	Não	Limitada
415	32	CDI	II	pos	pos	neg	40%	B	IV	Não	Limitada
417	34	CDI	II	pos	pos	neg	5%	A	IA	Não	Não

ID, identificação da paciente; CDI, carcinoma ductal invasivo; CLI, carcinoma lobular invasivo; Lum, luminal; HF, História familiar; mut, mutado.

Utilizamos o sequenciador Illumina HiSeq 1000, no qual foram sequenciados 201,121 exons, compreendendo 62 mega bases (Mb) do genoma, com uma mediana de 95,3% cobertura. A média de *sequencing depths* por tumor e tecido normal foi de 35.79 e 36.29, respectivamente (Tabela 17). Considerando todas as alterações, foi observada uma média de 1,939 alterações por mega base, entretanto, incluindo somente alterações não silenciosas, uma média de 1,787 alterações por mega base foram observadas.

Para detecção de alterações de um único nucleotídeo, o *software* SomaticSniper (v1.0.2) foi utilizado. Foram observadas 310 alterações: quatro nonsense; 50 não sinônima (missense); 24 sinônima; 10 em região de *Splice*; 2 *splice donor*; 65 em regiões 3'UTR ou 5'UTR; 45 intrônica; 64 intergênica; 19 em exon não codificante; 18 em região *Downstream* do gene e nove *Upstream* do gene (Tabela 18). A média de alterações por paciente foi 39, variando de 19 a 74 alterações. A maioria das alterações são trocas de base G>A/C>T, seguida de G>T/C>A, G>C/C>G, A>G/T>C, A>C/T>G e A>T/T>A (Gráfico 1). Além disso, de acordo com análise do gráfico de trinucleotídeos, observamos que as trocas do trinucleotídeo mais frequente são ACG>ATG e CCG>CTG, envolvendo trocas C>T (Gráfico 2).

Tabela 17 - Sequencing depths por tumor e tecido normal

Amostra	ID	Média	Stdev
Tumor	402	29,2838	24,5808
	413	35,2194	27,5934
	406	36,5737	29,7472
	416	37,6557	31,5998
	401	37,4398	30,2831
	404	38,9684	31,2011
	415	29,5658	26,5644
	417	41,6143	32,7913
Mediana		35,790113	29,295138
Normal	402	41,629	32,3451
	413	31,8173	24,804
	406	20,9754	17,2859
	416	44,3717	33,9972
	401	36,545	28,6825
	404	38,3545	30,0327
	415	34,2078	26,1965
	417	42,46	32,3717
Mediana		36,295088	28,21445

ID, identificação da paciente; Stdev, *standard deviation*

Tabela 18 - Alterações de um único nucleotídeo observadas no sequenciamento do exoma

Tipo de alteração	ID								Total
	402	413	406	416	401	404	415	417	
Nonsense	0	0	0	1	0	1	1	1	4
Missense	10	7	7	6	6	4	5	5	50
Sinônima	4	0	1	1	3	3	11	1	24
Região de Splice	0	3	1	2	1	2	1	0	10
Splice donor	0	1	0	0	0	1	0	0	2
3' ou 5' UTR	16	7	4	9	4	8	9	8	65
Íntron	15	9	3	6	1	2	5	4	45
Intergênica	21	9	2	9	3	7	5	8	64
Exons não Codificante	3	1	1	3	3	0	5	3	19
<i>Downstream</i> gene	3	2	0	3	1	3	3	3	18
<i>Upstream</i> gene	2	1	0	2	1	0	1	2	9
Total	74	40	19	42	23	31	46	35	310

ID, identificação da paciente.

Gráfico 1 - Número de substituições e troca de bases das 310 alterações de um único nucleotídeo observadas no tumor

Gráfico 2 - Trinucleotídeo. SNVs, variantes de único nucleotídeo; A, adenina; C, citosina; G, guanina; T, timina.

Dentre as alterações observadas, 56 (quatro nonsense, 50 missense e duas *splice donor*) foram consideradas com potencial *driver* em 53 genes diferentes. Apenas alteração no gene *PIK3CA* foi observada em mais de uma paciente (402, 406 e 415). As alterações nonsense foram observadas nos genes *NOL9* (exon 4), *GRHL2* (exon 2), *GRIN1* (exon 20) e *TTC21B* (exon 20) e *splice donor* nos genes *EML5* e *ANLN* (Figura 3 e Tabela 19). A maioria das alterações também foram trocas de base G>A/C>T (Figura 3).

Figura 3 - Alterações com potencial *Driver* detectadas nos oito tumores luminais. Substituições e troca de bases. Não Sinônima (Missense)

Em relação as alterações missense, também calculamos a probabilidade de ser ou não patogênica pelos *softwares* PolyPhen e SIFT. Observamos que 24 alterações são preditas como deletérias pelo PolyPhen e 19 pelo SIFT, enquanto somente 15

alterações, nos genes *CACNA1E*, *CILP2*, *GLI3*, *HECW2*, *IL22*, *NDST4*, *NES*, *OSR2*, *PIK3API*, *POC5*, *POLD1*, *PRICKLE2*, *PRKD1*, *RSBN1* e *TP53* são preditas como deletéria em ambos os *softwares* (Tabela 19).

Tabela 19 - Alterações somáticas encontradas em câncer de mama de pacientes jovens

Rank	Gene	Qtd aa	Alteração	Tipo de alteração	Exon	PolyPhen	SIFT	ID
1	<i>PIK3CA</i>	1068	p.Glu545Lys/c.1633G>A	M	9	Deletéria	Tolerada	402
1	<i>PIK3CA</i>	1068	p.His1047Arg/c.3140A>G	M	20	Deletéria	Tolerada	406
1	<i>PIK3CA</i>	1068	p.His1047Leu/c.3140A>T	M	20	Benigna	Tolerada	415
2	<i>TP53</i>	393	p.Tyr220Cys/c.659A>G	M	6	Deletéria	Não Tolerada	406
3	<i>IL22</i>	179	p.Arg73Cys/c.217C>T	M	2	Deletéria	Não Tolerada	406
4	<i>PRKARIA</i>	381	p.Leu20Phe/c.58C>T	M	3	Benigna	Tolerada	406
5	<i>OSR2</i>	312	p.Gly262Glu/c.785G>A	M	4	Deletéria	Não Tolerada	406
6	<i>POC5</i>	575	p.Arg541Gln/c.1622G>A	M	12	Deletéria	Não Tolerada	406
7	<i>MTHFD2</i>	350	p.Pro17Leu/c.50C>T	M	1	Benigna	Tolerada	415
8	<i>C2orf57</i>	395	p.Thr265Met/c.794C>T	M	1	Benigna	Tolerada	406
9	<i>SEMA6D</i>	1011	p.Glu553Ala/c.1658A>C	M	19	ND	Tolerada	401
10	<i>FAM96A</i>	102	p.Glu75Lys/c.223G>A	M	2	Benigna	Tolerada	416
11	<i>AZI2</i>	243	p.Ile66Val/c.196A>G	M	2	Benigna	Tolerada	417
12	<i>CALB2</i>	271	p.Ala30Glu/c.89C>A	M	1	Benigna	Tolerada	417
13	<i>LONRF3</i>	759	p.Ala468Thr/c.1402G>A	M	5	Benigna	Tolerada	413
14	<i>CYP2A7</i>	494	p.Ser153Ala/c.457T>G	M	3	Deletéria	Tolerada	404
15	<i>NOL9</i>	703	p.Ser283*/c.848C>G	N	4	ND	ND	404
16	<i>ZCCHC24</i>	241	p.Lys123Arg/c.368A>G	M	2	Benigna	Tolerada	416
17	<i>GRHL2</i>	625	p.Glu32*/c.94G>T	N	2	ND	ND	417
18	<i>AK8</i>	479	p.Thr101Pro/c.301A>C	M	4	Benigna	Tolerada	413
19	<i>ENC1</i>	516	p.Pro300Ala/c.898C>G	M	2	ND	Tolerada	417
20	<i>ODC1</i>	332	p.Tyr188Ser/c.563A>C	M	10	ND	Não Tolerada	413
21	<i>SLC13A1</i>	595	p.Arg277Pro/c.830G>C	M	8	Benigna	Tolerada	413
22	<i>ELMO3</i>	773	p.Leu251Phe/c.753G>C	M	7	Benigna	Tolerada	404
23	<i>RIMBP2</i>	1052	p.Ala548Asp/c.1643C>A	M	10	Deletéria	Tolerada	404
24	<i>GLI3</i>	1580	p.Thr943Pro/c.2827A>C	M	15	Deletéria	Não Tolerada	401
25	<i>NDST4</i>	872	p.Val313Phe/c.937G>T	M	2	Deletéria	Não Tolerada	417
26	<i>PRICKLE2</i>	844	p.Pro81Leu/c.242C>T	M	3	Deletéria	Não Tolerada	417
27	<i>EML5</i>	1977	c.4238G>T	Splice	30	ND	ND	404
28	<i>PLA2G4D</i>	818	p.Ser173Gly/c.517A>G	M	7	Benigna	Tolerada	413
29	<i>ANLN</i>	1087	c.2968T>C	Splice	21	ND	ND	413
30	<i>FBNP1L</i>	551	p.Lys328Asn/c.984G>T	M	9	Deletéria	Tolerada	402
31	<i>MYO1H</i>	1022	p.Glu501Gly/c.1502A>G	M	14	ND	Tolerada	416
32	<i>RSBN1</i>	802	p.Pro148Ser/c.442C>T	M	1	Deletéria	Não Tolerada	413
33	<i>CIITA</i>	1130	p.Pro443Thr/c.1327C>A	M	11	Deletéria	Tolerada	402
34	<i>CILP2</i>	1156	p.Arg472Gly/c.1414C>G	M	8	Deletéria	Não Tolerada	404

continua

conclusão

Rank	Gene	Qtd aa	Alteração	Tipo de alteração	Exon	PolyPhen	SIFT	ID
35	<i>EPPK1</i>	2420	p.Arg2364Gln/c.7091G>A	M	2	Benigna	Tolerada	401
36	<i>FAM65B</i>	1047	p.Glu718Asp/c.2154G>C	M	15	ND	Tolerada	402
37	<i>GRIN1</i>	939	p.Gln910*/c.2728C>T	N	20	ND	ND	416
38	<i>LRRC66</i>	880	p.His434Asn/c.1300C>A	M	4	Benigna	Tolerada	401
39	<i>MAMLD1</i>	998	p.Ala775Val/c.2324C>T	M	5	ND	Tolerada	401
40	<i>PIK3AP1</i>	805	p.Gln285Lys/c.853C>A	M	5	Deletéria	Não Tolerada	415
41	<i>POLD1</i>	1107	p.Pro146Arg/c.437C>G	M	4	Deletéria	Não Tolerada	413
42	<i>PRKD1</i>	912	p.Tyr800Cys/c.2399A>G	M	16	Deletéria	Não Tolerada	415
43	<i>RNF213</i>	5207	p.Gln2801Lys/c.8401C>A	M	29	ND	Não Tolerada	401
44	<i>SMURF2</i>	748	p.Ser193Cys/c.578C>G	M	8	Benigna	Não Tolerada	402
45	<i>TTC21B</i>	1316	p.Arg898*/c.2692C>T	N	20	ND	ND	415
46	<i>ZNF33A</i>	699	p.Gly183Val/c.548G>T	M	6	ND	ND	413
47	<i>HECW2</i>	1572	p.Asp265Gly/c.794A>G	M	7	Deletéria	Não Tolerada	402
48	<i>CACNA1E</i>	2270	p.Arg590Trp/c.1768C>T	M	14	Deletéria	Não Tolerada	402
49	<i>FLG</i>	4061	p.Arg1166Cys/c.3496C>T	M	3	ND	Não Tolerada	416
50	<i>NES</i>	1621	p.Glu340Val/c.1019A>T	M	4	Deletéria	Não Tolerada	402
51	<i>STAB1</i>	2570	p.Gly1381Arg/c.4141G>A	M	38	Deletéria	Tolerada	402
52	<i>ZNF462</i>	2506	p.Gly2426Cys/c.7276G>T	M	12	Deletéria	Tolerada	402
53	<i>TTN</i>	34350	p.Leu6228Ser/c.18683T>C	M	65	Deletéria	ND	416

aa, aminoácido; PolyPhen, *Polymorphism Phenotyping v2*; SIFT, *Sorting Intolerant From Tolerant*; M, missense; N, nonsense; ID, identificação da paciente.

• Análise de Algumas Alterações do Sequenciamento do Exoma pelo Método de Sanger

Para confirmação dos dados provenientes do sequenciamento do exoma, selecionamos algumas alterações para serem analisadas pelo método de Sanger. Utilizamos as mesmas amostras (DNA das células mononucleares do sangue e tumor) nas quais foram utilizadas para o sequenciamento do exoma. Confirmamos a mutação somática em 14 alterações, todas ausente no tecido normal e presentes na amostra tumoral (Tabela 20), como por exemplo às alterações c.3140A>T (p.His1047Leu) no gene *PIK3CA* (Figura 4) e c.659A>G (p.Tyr220Cys) no gene *TP53* (Figura 5). As alterações presentes nos genes *CALB2*, *ENC1*, *ODC1*, *RIMBP2* e *FBNP1L* não foram observadas nas amostras tumorais (Tabela 20).

Tabela 20 - Análise das principais alterações detectadas no sequenciamento do exoma pelo método de Sanger

Rank	Gene	Alteração	Tecido Normal	Tumor	ID
1	<i>PIK3CA</i>	p.Glu545Lys/c.1633G>A	Ausente	Presente	402
1	<i>PIK3CA</i>	p.His1047Arg/c.3140A>G	Ausente	Presente	406
1	<i>PIK3CA</i>	p.His1047Leu/c.3140A>T	Ausente	Presente	415
2	<i>TP53</i>	p.Tyr220Cys/c.659A>G	Ausente	Presente	406
3	<i>IL22</i>	p.Arg73Cys/c.217C>T	Ausente	Presente	406
4	<i>PRKARIA</i>	p.Leu20Phe/c.58C>T	Ausente	Presente	406
5	<i>OSR2</i>	p.Gly262Glu/c.785G>A	Ausente	Presente	406
6	<i>POC5</i>	p.Arg541Gln/c.1622G>A	Ausente	Presente	406
7	<i>MTHFD2</i>	p.Pro17Leu/c.50C>T	Ausente	Presente	401
8	<i>C2orf57</i>	p.Thr265Met/c.794C>T	Ausente	Presente	406
9	<i>SEMA6D</i>	p.Glu553Ala/c.1658A>C	Ausente	Presente	401
10	<i>FAM96A</i>	p.Glu75Lys / c.223G>A	Ausente	Presente	416
17	<i>GRHL2</i>	p.Glu32*/c.94G>T	Ausente	Presente	417
45	<i>TTC21B</i>	p.Arg898*/c.2692C>T	Ausente	Presente	415

ID, identificação da paciente.

Figura 4 - Eletroferograma da alteração c.3140A>T (p.His1047Leu) no gene *PIK3CA*. Observa-se a substituição de uma adenina por uma timina (seta) na amostra tumoral (A) e não na amostra normal (B)

Figura 5 - Eletroferograma da alteração c.659A>G (p.Tyr220Cys) no gene *TP53*. Observa-se a substituição de uma adenina por uma guanina (seta) na amostra tumoral (A) e não na amostra normal (B)

• Meta Análise

O quarto o objetivo foi avaliar se mutações somáticas nos cinco genes mais frequentemente mutados em câncer de mama estão relacionadas à idade ao diagnóstico. Para isso, fizemos uma meta análise utilizando o banco de dados de mutação somática em câncer COSMIC e os dados da literatura recuperados no PubMed usando as palavras chave: breast neoplasms[MeSH Terms] AND "somatic"[All Fields] AND ("2003/10/13"[Pdat] : "2015/02/11"[Pdat] AND "humans"[MeSH Terms]) e (breast neoplasm [MeSH Terms]) AND "somatic") AND "PIK3CA". Após, alteramos o gene *PIK3CA* para os genes: "TP53"; P53; CDH1; GATA3 e PTEN. Foram incluídos 26 artigos que atendiam os critérios de inclusão, compreendendo um total de 1980 pacientes, 5,6% com menos de 36 anos. A maioria das pacientes, em ambos os grupos (≤ 35 anos vs > 35 anos) foram diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo, entretanto, alto grau histológico, tumor ER negativo, linfonodo comprometido e doença avançada, com estágio clínico III/IV, foram detectados principalmente em pacientes mais jovens (Tabela 21).

Tabela 21 - Características das pacientes com câncer de mama da meta análise

Características do Tumor	≤35 anos n (%)	>35 anos n (%)	OR	95% CI	p
Histologia					
CDI	89 (84)	1510 (84)	1		
Outras	17 (16)	288 (16)	1.001	0,587-1,708	0,996
Grau Histológico					
I	10 (10)	186 (11,5)	1		
II	17 (17)	680 (41,9)	0,465	0,209-1,033	0,06
III	73 (73)	756 (46,6)	1.796	0,910-3,545	0,091
Linfonodo					
Negativo	12 (36,4)	518 (54,2)	1		
Positivo	21 (63,6)	438 (45,8)	2.070	1,007-4,254	0,048
Estadiamento					
I/II	47 (71,2)	669 (85,1)	1		
III/IV	19 (28,8)	117 (14,9)	2.312	1,310-4,079	0,004
ER Status					
Positivo	42 (54,5)	973 (69,4)	1		
Negativo	35 (45,5)	430 (30,6)	1.886	1,887-2,995	0,007
PR Status					
Positivo	34 (47,9)	674 (50)	1		
Negativo	37 (52,1)	675 (50)	1.087	0,674-1,752	0,733
HER2					
Positivo	12 (18,2)	167 (13,1)	1		
Negativo	54 (81,8)	1104 (86,9)	0,681	0,357-1,299	0,243

CDI, carcinoma ductal invasivo; OR, Odds Ratio para detecção em pacientes jovens. Pacientes jovens (≤35 anos, n=111) e mais velhas (>35 anos, n=1869).

Mutação somática no gene *PIK3CA* foi mais frequente em tumores de pacientes mais velhas, enquanto que no gene *TP53* foi observada em aproximadamente 20% em ambos os grupos e no gene *PTEN* foi observada em uma (3,3%) paciente. Nenhuma paciente apresentou mutação nos genes *GATA3* e *CDH1* (Tabela 22).

Tabela 22 - Frequência de mutação somática nas pacientes jovens vs pacientes mais velhas

Gene	wt n (%)	mut n (%)	OR	95% CI	p
PIK3CA					
>35 anos	630 (73,3)	230 (26,7)	1		
≤35 anos	28 (93,3)	2 (6,7)	0,196	0,046-0,828	0,027
TP53					
>35 anos	1302 (79,9)	327 (20,1)	1		
≤35 anos	76 (78,4)	21 (21,6)	1.100	0,669-1,811	0,707
PTEN					
>35 anos	369 (96,9)	12 (3,1)	1		
≤35 anos	15 (93,8)	1 (6,3)	2.050	0,250-16,813	0,504
GATA3					
>35 anos	606 (92,4)	50 (7,6)			
≤35 anos	16 (100)	0 (0)	-	-	0,623
CDH1					
>35 anos	503 (91,8)	45 (8,2)			
≤35 anos	16 (100)	0 (0)	-	-	0,629

wt, wild type; mut, mutado, Qui-quadrado ou teste exato de Fisher e regressão logística, OR, Odds Ratio para presença de mutação

Cada variável associada com a idade (grau histológico, ER, linfonodo comprometido e estadiamento clínico) foi testada concomitantemente com mutação somática no gene *PIK3CA* usando regressão logística binária. Esta análise mostrou uma tendência para ocorrência de tumores ER positivos em pacientes mais jovens (OR: 0.433; 95% CI: 0,181-1,036; p=0,060), mas não para ocorrência de mutação somática no gene *PIK3CA* (OR: 0,233; 95% CI: 0,029-1,712; p= 0,149) (Tabela 23).

Tabela 23 - Variáveis associadas com pacientes jovens

Variável (n)	OR	95% CI	p-value
ER neg (225)	1		
ER pos (279)	0.433	0.181-1.036	0.060
<i>PIK3CA</i> _{wt} (408)	1		
<i>PIK3CA</i> _{mut} (96)	0.223	0.029-1.712	0.149

Regressão logística binária. OR, Odds Ratio para pacientes jovens ≤35 anos (n=25). Pacientes >35 anos (n=479)

Como associação entre mutação em determinados genes com subtipo tumoral já foi descrita, analisamos a seguir a presença de mutação somática de acordo com a

expressão de ER e HER2. Observamos que mutação somática no gene *PIK3CA* foi mais frequente em tumores ER positivos e mutação somática no gene *TP53* foi mais frequente em tumores ER negativos e HER2 positivos (Tabela 24).

Tabela 24 - Associação entre ER e HER2 (expressão positiva e negativa) com mutação somática

Gene	n (%)	n (%)	<i>p-value</i>
	ER (+)	ER (-)	
<i>PIK3CA</i> wt	201 (72)	207 (92)	<0.001
<i>PIK3CA</i> mut	78 (28)	18 (8)	
<i>TP53</i> wt	787 (88.9)	215 (57.2)	<0.001
<i>TP53</i> mut	88 (10.1)	161 (42.8)	
Gene	HER2 (+)	HER2 (-)	<i>p-value</i>
	HER2 (+)	HER2 (-)	
<i>PIK3CA</i> wt	45 (78.9)	269 (80.3)	0.813
<i>PIK3CA</i> mut	12 (21.1)	66 (19.7)	
<i>TP53</i> wt	121 (72.5)	843 (81.4)	0.006
<i>TP53</i> mut	46 (27.5)	192 (18.6)	

wt, *wild type*; mut, mutado

Seguindo a hipótese que mutações somáticas são acumuladas ao longo da vida (Stratton et al., 2009), a próxima etapa foi avaliar a frequência de mutações nos genes *PIK3CA* e *TP53* de acordo com o grupo etário da paciente, classificados em <30 anos e a cada 10 anos. A frequência de mutação somática no gene *PIK3CA* é maior nos grupos etários mais velhos, alcançando cerca de 30% em pacientes com ≥ 60 anos. Contudo, mutação somática no gene *TP53* foi mais frequente em pacientes de 40-49 anos (30%), diminuindo após esta idade (Figura 6).

Figura 6 - Frequência de mutação somática nos genes *PIK3CA* e *TP53* de acordo com os grupos etários (correlação de Pearson). Grupo etário com <10 pacientes foi excluído

Status de ER e HER2 também foi avaliado de acordo com os grupos etários. A frequência de tumores ER positivos foi diretamente correlacionada com a idade, alcançando 80% em pacientes com ≥ 60 anos. Em contrapartida, a frequência de tumores HER2 positivos foi indiretamente correlacionada com a idade, sendo mais frequente (25%) em pacientes com <30 anos (Figura 7).

Figura 7 - Frequência de ER e HER2 (expressão positiva ou negativa) de acordo com os grupos etários (correlação de Pearson)

Em seguida, avaliamos a frequência de mutação somática nos genes *PIK3CA* e *TP53* em tumores ER positivo/negativo e HER2 positivo/negativo, de acordo com os grupos etários. Houve uma tendência para maior frequência de mutação somática no gene *PIK3CA* em tumores ER positivos. Para as pacientes com <40 anos, a frequência de mutação somática em tumores ER positivos é baixa, em torno dos 10%. Após esta idade, mais do que 25% dos tumores ER positivos apresentam mutação somática no gene *PIK3CA*. Foi observada uma correlação positiva nos tumores HER2 negativos e mutação somática do gene *PIK3CA*. Em contrapartida, nenhuma correlação foi observada com mutação somática no gene *TP53* de acordo com as características tumorais e idade (Figura 8).

Figura 8 - Frequência de mutação somática nos genes *PIK3CA* e *TP53* com expressão tumoral de ER ou HER2 (expressão positiva ou negativa) de acordo com os grupos etários (correlação de Pearson). Grupo etário com <10 pacientes foi excluído

• Frequência de Alteração Somática nos Exons 9 e 20 do Gene *PIK3CA*

Como o gene *PIK3CA* foi mais o frequentemente mutado em câncer de mama de pacientes jovens, o quinto objetivo do nosso trabalho foi analisar a presença de mutação somática nos exons 9 e 20 deste gene, em pacientes jovens e pós menopausadas. Para esta análise, utilizamos o DNA extraído dos tumores emblocado em parafina de 40 pacientes jovens (seis carreadoras de mutação deletérias nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*) e três amostras de tumor fresco de outras pacientes jovens. Adicionalmente, incluímos dados clínicos e do sequenciamento do gene *PIK3CA* das oito pacientes jovens cujos tumores foram analisados por sequenciamento do exoma. Amostras emblocadas em

parafina de 23 pacientes mais idosas (≥ 55 anos) também foram incluídas (Anexo K). Duas amostras (453 e 521) foram excluídas por problemas técnicos.

Das 49 pacientes jovens incluídas para esta análise (38 tumor emblocados em parafina, três tumores frescos adicionais e oito tumores frescos provenientes do exoma), observamos alteração nos exons 9 e/ou 20 do gene *PIK3CA* em 15 (30,7%) pacientes. Alteração no exon 9 foi observado em nove (18,4%) pacientes e no exon 20 em sete (14,2%) pacientes. As pacientes 457 e 478 apresentaram duas alterações no exon 9 e 20, respectivamente e a paciente 480 apresentou alteração nos dois exons. A alteração c.1634A>C (E545A) foi observada em três pacientes (477, 480 e 483) e a alteração c.1615C>T (P539S) em duas pacientes (457 e 518) (Tabela 25).

Dentre as 15 diferentes alterações observadas nos dois exons, 11 são missense, três sinônimas e uma nonsense. Predição do significado clínico pelo PolyPhen e SIFT das alterações missense indicou que nove apresentam potencial deletério pelos dois *softwares* e quatro por apenas um deles (Tabela 25).

Das 15 pacientes jovens com alteração nos exons 9 e/ou 20, a maioria foi diagnosticada com carcinoma ductal invasivo (n=13: 86,7%), grau histológico 2 (n=sete: 46,7%), alto índice proliferativo de acordo com a marcação do Ki67 (n=11: 78,6%), subtipo luminal (n=11: 73,3%) e estadiamento I/II (n=10: 76,9%) (Tabela 26).

Tabela 25 - Alterações nos exons 9 e 20 do gene *PIK3CA* e análise in silico do potencial patogênico nas pacientes jovens

ID	Exon	Alteração	Tipo de alteração	PolyPhen	SIFT	ID COSMIC
455	9	c.1558G>A (D520N)	M	Benigno	Não Tolerada	COSM29096
484	9	c.1593C>A (L531L)	Syn	ND	Tolerada	ND
457	9	c.1615C>T (P539S)	M	Deletéria	Não Tolerada	COSM249880
		c.1664G>A (R555K)	M	Deletéria	Não Tolerada	COSM1716158
518	9	c.1615C>T (P539S)	M	Deletéria	Não Tolerada	COSM249880
402	9	c.1633G>A (E545K)	M	Deletéria	Tolerada	COSM763
477	9	c.1634A>C (E545A)	M	Deletéria	Não Tolerada	COSM12458
480*	9	c.1634A>C (E545A)	M	Deletéria	Não Tolerada	COSM12458
483	9	c.1634A>C (E545A)	M	Deletéria	Não Tolerada	COSM12458
468	9	c.1656G>A (W552X)	N	ND	ND	COSM37025
452	20	c.3130A>G (N1044D)	M	Deletéria	Não Tolerada	COSM27134
406	20	c.3140A>G (H1047R)	M	Deletéria	Tolerada	COSM775
415	20	c.3140A>T (H1047L)	M	Benigna	Tolerada	COSM776
454	20	c.3146G>A (G1049D)	M	Deletéria	Não Tolerada	COSM308548
478	20	c.3165G>A (M1055I)	M	Benigna	Não Tolerada	ND
		c.3201G>A (L1067L)	Syn	ND	Tolerada	ND
503	20	c.3150C>T (G1050G)	Syn	ND	Tolerada	ND
480*	20	c.3203A>C (N1068T)	M	Deletéria	Não Tolerada	ND

ID, identificação da paciente; *paciente com mutação no exon 9 e 20; M, missense; Syn, sinônima; PolyPhen, *Polymorphism Phenotyping v2*; SIFT, *Sorting Intolerant From Tolerant*; ID COSMIC, identificação no COSMIC.

Tabela 26 - Características clínico-patológicas de acordo com mutação no gene *PIK3CA* em pacientes jovens

Características clínico-patológica	<i>PIK3CA</i> Exons 9 e/ou 20		<i>p-value</i>
	Mutada (n=15)	Não Mutada (n=34)	
Idade mediana ao diagnóstico	32 anos (23 a 25 anos)	33 anos (27 a 35 anos)	
Tipo histológico			0.459
CDI	13 (86,7)	32 (94,1)	
CLI	1 (6,7)	0(0)	
Outros	1 (6,7)	2 (5,9)	
Grau histológico			0.146
1	2 (13,3)	0 (0)	
2	7 (46,7)	17 (51,5)	
3	6 (40)	16 (48,5)	
Ausente		1	
Ki67			0.062
≤14%	3 (21,4)	1 (3,3)	
>14%	11 (78,6)	29 (96,7)	
Ausente	1	4	
Subtipo molecular			0.621
Luminal	11 (73,3)	21 (63,6)	
HER2	2 (13,3)	3 (9,1)	
Triplo negativo	2 (13,3)	9 (23,7)	
Ausente		1	
Estadiamento			0.234
I e II	10 (76,9)	16 (53,6)	
III	2 (15,4)	12 (40)	
IV	1 (7,7)	2 (6,7)	
Ausente	2	4	

Como critério de comparação, analisamos também a frequência de mutação somática no gene *PIK3CA* em uma coorte de pacientes pós menopausadas (≥ 55 anos) com câncer de mama. Inicialmente foram incluídas 49 pacientes (Anexo K) com idade mediana ao diagnóstico de 62 anos, variando de 55 a 80 anos. Somente pacientes que tiveram diagnóstico de carcinoma ductal invasivo e história familiar positiva segundo os critérios da NCCN foram incluídas. Observamos que a maioria apresenta tumores com grau histológico 2 (n=30: 62,5%), alto índice proliferativo, de acordo com a expressão de Ki67 (n=29: 72,5%) e subtipo luminal (n=39: 79,6%), com positividade para ER (n=39: 79,6%) e PR (n=33: 67,3%). Apenas cinco (10,2%) pacientes foram diagnosticadas com tumor HER2 positivo e cinco (10,2%) pacientes com tumor triplo

negativo. O estágio clínico ao diagnóstico mostrou que 36 (75%) pacientes apresentam doença localizada, ou seja, estágio I/II (Tabela 27).

Tabela 27 - Dados clínico-patológicos das pacientes pós menopausadas

Característica Clínico-Patológica	Mais Idosas n (%)
Idade Mediana ao Diagnóstico	62 anos (55 a 80 anos)
Grau Histológico	
1	11 (22,9)
2	30 (62,5)
3	7 (14,6)
Ausente	1
Ki67	
≤14%	11 (27,5)
>14%	29 (72,5)
Ausente	9
Subtipo Molecular	
Luminal	39 (79,6)
HER2	5 (10,2)
Triplo Negativo	5 (10,2)
Status ER	
Pos	39 (79,6)
Neg	10 (20,4)
Status PR	
Pos	33 (67,3)
Neg	16 (32,7)
Status HER2	
Pos	8 (16,3)
Neg	41 (83,7)
Estadiamento	
I e II	36 (75)
III	12 (25)
IV	0
Ausente	1

Recuperamos os tumores emblocado em parafina de 23 pacientes e alteração nos exons 9 e/ou 20 do gene *PIK3CA* foi observada em dez (43,5%) pacientes, sete pacientes no exon 9 (30,4%) e quatro no exon 20 (17,3%). A paciente 26 apresenta duas alterações, uma no exon 9 e outra no exon 20, já a paciente 8 é portadora de duas alterações no exon 20. As alterações c.1634A>C (E545A) e c.3140A>T (H1047L) foram observadas em duas pacientes cada. Das dez diferentes alterações observadas,

seis são missense, três sinônima e uma nonsense. Quatro alterações missense são preditas como deletéria pelos dois *softwares* e quatro por apenas um deles (Tabela 28). Embora mais frequente em pacientes mais velhas, nenhuma significância foi observada em relação à mutação no gene *PIK3CA* entre pacientes jovens e pacientes idosas (Tabela 29).

Tabela 28 - Alterações nos exons 9 e 20 do gene *PIK3CA* e análise in silico do potencial patogênico nas pacientes mais idosas

ID	Exon	Alteração	Tipo de alteração	PolyPhen	SIFT	ID COSMIC
26*	9	c.1547G>A (R516K)	M	Benigna	Não Tolerada	COSM3724545
10	9	c.1549C>T (L517L)	Syn	ND	Tolerada	ND
21	9	c.1550T>C (L517P)	M	Benigna	Não Tolerada	ND
9	9	c.1629C>T (I543I)	Syn	ND	Tolerada	ND
1	9	c.1634A>C (E545A)	M	Deletéria	Não Tolerada	COSM12458
17	9	c.1634A>C (E545A)	M	Deletéria	Não Tolerada	COSM12458
3	9	c.1639G>C (E547Q)	M	Deletéria	Não Tolerada	ND
8	20	c.3075C>T (T1025T)	Syn	ND	Tolerada	COSM21451
		c.3140A>T (H1047L)	M	Benigna	Não Tolerada	COSM776
32	20	c.3098A>G (Q1033R)	M	Deletéria	Não Tolerada	COSM303947
23	20	c.3140A>T (H1047L)	M	Benigna	Não Tolerada	COSM776
26*	20	c.3170G>A (W1057X)	N	ND	ND	ND

ID, identificação da paciente; *paciente com mutação no exon 9 e 20; M, missense; Syn, sinônima; N, nonsense; PolyPhen, *Polymorphism Phenotyping v2*; SIFT, *Sorting Intolerant From Tolerant*; ID COSMIC, identificação no COSMIC.

Tabela 29 - Alterações observadas no gene *PIK3CA* em pacientes jovens e mais idosas

Mutação <i>PIK3CA</i>	Jovens (%)	Idosas (%)	<i>p-value</i>
Exon 9			0,36
Mut.	9 (18,4)	7 (30,5)	
wt	40 (81,6)	16 (69,5)	
Exon 20			0,74
Mut.	7 (14,2)	4 (17,3)	
wt	42 (85,8)	19 (82,7)	
Exons 9 e/ou 20			0,3
Mut.	15 (30,7)	10 (43,5)	
wt	34 (69,3)	13 (56,5)	

Mut., mutado; wt, wild type.

4.5. Seleção de Genes para Construção de Painel para Pesquisa de Mutação Somática em Pacientes Jovens com Câncer de Mama

A maioria dos estudos de sequenciamento do genoma e exoma em pacientes com câncer de mama não caracteriza *hot spots* na grande maioria dos genes mutados. Desta forma, acreditamos que o sequenciamento completo de genes candidatos seria uma estratégia mais apropriada. Para realizar estes experimentos uma opção é utilizar painéis de genes de interesse. Assim, seria possível amplificar toda região codificante de vários genes alvos de uma forma padronizada e econômica. Além disso, para a realização desta técnica, é necessária pouca quantidade de DNA, como acontece com amostras armazenadas em parafina.

Analizamos os dados das nossas oito pacientes que realizaram sequenciamento do exoma em conjunto com mais 14 pacientes jovens de outros estudos que fizeram sequenciamento completo do genoma ou exoma. Dentre as 22 amostras; 15 são provenientes de tumores luminal, seis triplo negativo e uma normal. Observamos que 35 genes apresentam alteração em pelo menos duas pacientes, incluindo *PIK3CA*, *TP53*, *NCOA3*, *UBR5*, entre outros, sendo a maioria das alterações missense (Tabela 30). Além disso, consideramos os onze genes mais mutados em pacientes com câncer de mama segundo o banco de dados COSMIC (Tabela 31). Adicionalmente, os genes *MAP3K1* e *ATR* foram incluídos por estarem mutados em amostras de câncer de mama subtipo luminal (Ellis et al., 2012). Desta forma, 31 genes foram incluídos no painel (Tabela 32).

Tabela 30 - Genes mutados em amostras de pacientes jovens de outros estudos e do presente estudo

	Outros Estudos													Presente Estudo										
Paper ID	237	325			405			466					729											
ID Paciente	2542	PD3905	PD4088	PD4116	BR-V-018	BR-V-052	BR-V-070	PD3998a	PD4093a	PD4112a	PD4204a	PD4107	mTNBC6	mTNBC11	401	402	404	406	413	415	416	417		
Sub. mol.	TN	TN	lum	lum	nor	lum	TN	lum	lum	lum	lum	TN	TN	TN	lum	lum	lum	lum	lum	lum	lum	lum		
BRCA mut	x	?	Não	B2	NA	NA	NA	x	B1	B2	x	B1	x	x	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não		
Genes mut																								
AKT1	M										M													
ANKRD5	M							M																
ARHGAP12	M												M											
CNTN6									M	M														
DHX57	M			M																				
DLG2	M												M											
EPHB3	M												M											
GRIN1	M																			N				
HK1	M									F														
KIAA1239	M							M																
KIAA1632	M												M											
KRBA1	M													M										
MLL3	M									M														
NCOA3	M							M	M															
NOTCH1							M		M															
ODZ4	M											M												
PCNT	M								M															

continua

conclusão

	Outros Estudos													Nosso Estudo										
Paper ID	237	325			405			466					729											
ID Paciente	2542	PD3905	PD4088	PD4116	BR-V-018	BR-V-052	BR-V-070	PD3998a	PD4093a	PD4112a	PD4204a	PD4107	mTNBC6	mTNBC11	401	402	404	406	413	415	416	417		
Sub. mol.	TN	TN	lum	lum	nor	lum	TN	lum	lum	lum	lum	TN	TN	TN	lum	lum	lum	lum	lum	lum	lum	lum		
BRCA mut	x	?	Não	B2	NA	NA	NA	x	B1	B2	x	B1	x	x	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não		
Genes mut																								
PIK3CA						M										M		M		M				
PKHD1		Syn	Syn																					
POLD1									M										M					
PRKAR1A													M					M						
PTK6	M					Syn																		
RCBTB2												M		N										
RNF149	M								M															
RNF213				M											M									
RYR2							M							M										
STAB1		N														M								
SYNE1		M	M																					
TCIRG1	M													M										
TOP2A				S									N											
TP53	M			F					M									M						
TTN									M												M			
UBR5	M												M											
USH2A												Syn	M											
ZFHX4	M							M																

ID paper: 237, Yost et al., 2012; 325, Nik-Zainal et al., 2012; 405, Banerji et al., 2012; 466, Stephens et al., 2012; 729, Craig et al., 2013; Sub. Mol., subtipo molecular; TN, triplo negativo; lum, luminal; nor, normal; NA, não avaliado; M, missense; N, nonsense; F, *Frameshift*; Syn, sinônima; S, sítio de *splice*.

Tabela 31 - Frequência de genes mutados em câncer de mama segundo o banco de dados COSMIC

Rank	Gene	Amostras Testadas	Amostras Mutadas	% Mutação
1	<i>PIK3CA</i>	11313	2976	26%
2	<i>TP53</i>	11833	2717	23%
3	<i>CDH1</i>	2100	243	12%
4	<i>MLL3</i>	1319	90	7%
5	<i>GATA3</i>	1650	110	7%
6	<i>MED12</i>	1449	94	6%
7	<i>PTEN</i>	3288	120	4%
8	<i>AKT1</i>	4918	150	3%
9	<i>RBI</i>	1690	48	3%
10	<i>ARID1A</i>	1673	47	3%
11	<i>RUNX1</i>	1720	43	3%

COSMIC, *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* - Acesso 04/03/2015.

Tabela 32 - Genes selecionados para o painel

Gene	Alteração	Amostras com a mesma alteração no COSMIC	Seleção
<i>PIK3CA</i>	c.1633G>A	375 mama, 380 intestino, 140 urinário, 140 pulmão, 45 trato aerodigestivo superior	Presente estudo, PolyPhen/SIFT, COSMIC e estudos pacientes jovens
<i>PIK3CA</i>	c.3140A>G	1020 mama, 250 intestino, 130 endométrio, 90 ovário, 40 estômago	Presente estudo, PolyPhen e SIFT e COSMIC
<i>PIK3CA</i>	c.3140A>T	105 mama, 45 intestino, 32 endométrio, 10 urinário, 8 hematopoiético e linfóide	Presente estudo, PolyPhen e SIFT e COSMIC
<i>TP53</i>	c.659A>G	32 mama, 44 ovário, 27 pulmão, 27 trato aerodigestivo superior e 24 SNC	Presente estudo, PolyPhen/SIFT, COSMIC e estudos pacientes jovens
<i>IL22</i>	c.217C>T	1 intestino e 1 pele	Presente estudo e PolyPhen/SIFT
<i>PRKARIA</i>	c.58C>T	0	Presente estudo, PolyPhen/SIFT e estudos pacientes jovens
<i>AZI2</i>	c.196A>G	0	Presente estudo e PolyPhen/SIFT
<i>CYP2A7</i>	c.2390G>A	1 tireóide, 1 próstata e 1 ovário	Presente estudo e PolyPhen/SIFT
<i>NOL9</i>	c.848C>G	0	Presente estudo e PolyPhen/SIFT
<i>GRHL2</i>	c.94G>T	0	Presente estudo e PolyPhen/SIFT
<i>GLI3</i>	c.2827A>C	0	Presente estudo e PolyPhen/SIFT
<i>EPPK1</i>	c.7091G>A	0	Presente estudo e PolyPhen/SIFT
<i>GRIN1</i>	c.2728C>T	0	Presente estudo, PolyPhen/SIFT e estudos pacientes jovens
<i>PIK3AP1</i>	c.853C>A	0	Presente estudo e PolyPhen/SIFT
<i>POLD1</i>	c.437C>G	0	Presente estudo, PolyPhen/SIFT e estudos pacientes jovens
<i>PRKD1</i>	c.2399A>G	0	Presente estudo e PolyPhen/SIFT
<i>CACNA1E</i>	c.1768C>T	2 hematopoiético e linfóide, 1 SNC, 1 pâncreas e 1 intestino	Presente estudo e PolyPhen/SIFT
<i>STAB1</i>	c.4141G>A	0	Presente estudo, PolyPhen/SIFT e estudos pacientes jovens
<i>RNF213</i>	c.8401C>A	0	Presente estudo e estudos pacientes jovens
<i>CDH1</i>	ND	ND	COSMIC
<i>MLL3</i>	ND	ND	COSMIC
<i>GATA3</i>	ND	ND	COSMIC
<i>MED12</i>	ND	ND	COSMIC
<i>PTEN</i>	ND	ND	COSMIC
<i>AKT1</i>	ND	ND	COSMIC e estudos pacientes jovens
<i>RB1</i>	ND	ND	COSMIC
<i>ARID1A</i>	ND	ND	COSMIC
<i>RUNX1</i>	ND	ND	COSMIC
<i>NCOA3</i>	ND	ND	Estudos pacientes jovens
<i>TOP2A</i>	ND	ND	Estudos pacientes jovens
<i>UBR5</i>	ND	ND	Estudos pacientes jovens
<i>MAP3K1</i>	ND	ND	Ellis et al., 2012
<i>ATR</i>	ND	ND	Ellis et al., 2012

ND, não determinado; SNC, sistema nervoso central; PolyPhen, *Polymorphism Phenotyping v2*; SIFT, *Sorting Intolerant From Tolerant*; COSMIC, *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* - Acesso 04/03/2015.

5. DISCUSSÃO

Os tumores de mama em pacientes jovens comumente apresentam fatores de mau prognóstico, sendo tumores biologicamente mais agressivos. No presente estudo, detectamos uma alta prevalência de tumores com alto grau histológico e mais proliferativos, da mesma forma que já relatado por outros autores (Dutra et al., 2009; Canello et al., 2013; Carraro et al., 2013). Além disso, uma alta incidência de tumores ER negativos, bem como tumores triplo negativo foi observado em nossas pacientes jovens, este aumento na frequência também já foi observado em outros estudos na população brasileira (Dutra et al., 2009; Bacchi et al., 2010; Carvalho et al., 2010) quanto que em outras populações (Gonzalez-Angulo et al., 2005; Azim et al., 2012).

De acordo com o questionário utilizado, observamos que o uso de contraceptivo oral foi utilizado pela maioria das pacientes jovens, da mesma forma como já relatado por outros autores (Althuis et al., 2003; Gonzalez-Angulo et al., 2005; Hunter et al., 2010). Contraceptivo oral pode ser um fator de risco para câncer de mama na pré menopausa, mas o aumento do risco associado com o uso de anticoncepcional é baixo, portanto, sua influência no desenvolvimento tumoral permanece controverso (Kahlenborn et al., 2006; Hunter et al., 2010).

Quanto à história familiar compatível com a síndrome de câncer de mama e ovário hereditário, detectamos que 19 (22,9%) pacientes não conhecem familiares em pelo menos um dos lados da família. Já em relação às pacientes que foi possível recuperar a história familiar, 30 (46,9%) pacientes, referiam história positiva, relatando pelo menos um membro da família (até terceiro grau) com câncer de mama, ovário, pâncreas ou próstata. Estes resultados indicam que pacientes jovens com câncer de mama apresentam uma alta porcentagem de parentes com cânceres característicos da síndrome de câncer de mama e ovário hereditário (Carraro et al., 2013; Bastos et al., 2014) em comparação à população de pacientes com câncer de mama.

Baseado nos dados do histórico familiar relatado pelas pacientes, utilizamos o *software* BOADICEA para calcular a probabilidade de a paciente ser carreadora de mutação deletéria nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, pois relata-se que o BOADICEA é mais eficaz na predição de pacientes com mutação deletéria em comparação a outros

algoritmos (Antoniou et al., 2008). Desta forma, observamos que onze (13,9%) pacientes apresentam risco >10% de serem carreadoras de mutação deletéria no gene *BRCA1* e dez (12,7%) pacientes para o gene *BRCA2*. É interessante ressaltar que segundo recomendações do NICE (*National Institute For Health and Core Excellence*), recomenda-se pesquisa de mutação deletéria nesses genes quando o cálculo de risco é superior a 10%. Contudo, todas as pacientes incluídas neste trabalho têm indicação desta análise segundo os critérios da NCCN, por serem jovens.

Observamos uma alta frequência de mutação deletéria nas pacientes jovens (13:16,5%). Uma porcentagem similar foi observada em diferentes populações: 14% coreana, 14% afro-americana, 17% caucasiana (Haffty et al., 2009); 18% britânicas (Lalloo et al., 2006); 20,4% brasileira (Carraro et al., 2013) e 23% grega (Loizidou et al., 2007). Em contraste, em estudos incluindo pacientes com câncer de mama de diversas faixa etária, observa-se menor porcentagem de pacientes carreadoras de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, ao redor de 1-4% (revisado por Kurian, 2010).

Detectamos doze diferentes mutações, sendo a maioria delas no gene *BRCA2*, da mesma forma com que observado na população grega (Loizidou et al., 2007) e afro-americana (Haffty et al., 2009), porém diferente da população brasileira (Carraro et al., 2013), britânica (Lalloo et al., 2006), caucasiana e coreana (Haffty et al., 2009) onde a maioria das mutações foram observadas no gene *BRCA1*.

A mutação c.2808_2811delACAA foi a única observada em duas pacientes. De acordo com o banco de dados do BIC, esta mutação é a segunda do tipo *Frameshift* mais frequente no gene *BRCA2* e mais prevalente em *Castilla y León*, na Espanha (Diez et al., 2003; Salazar et al., 2006; Diez et al., 2010). Esta mutação já foi relatada em quase todos os países da Europa ocidental (Neuhausen et al., 1998), bem como em mulheres africanas com câncer de mama na pré menopausa (Gao et al., 2000). Além disso, já foram encontrados casos de mutação *de novo* em pacientes com câncer de mama (van der Luijt et al., 2001). As duas pacientes carreadoras desta mutação desconhecem sua ascendência.

Outra mutação *Frameshift* frequentemente observada no banco de dados BIC é a c.3331_3334delCAAG, presente no gene *BRCA1*. Ela foi primeiramente descrita em famílias Canadenses (Durocher et al., 1996) e posteriormente em outros países. Contudo, estudos sugerem que esta mutação possa ser fundadora (Torres et al., 2007),

sendo relatada em diferentes regiões da Espanha (Blesa et al., 2000; Esteban et al., 2008). Foi observada em uma das nossas pacientes, a qual desconhece sua ascendência, e em três pacientes com câncer de ovário (dados do nosso grupo).

As mutações *Frameshift* c.66_67insA presente no gene *BRCA1* e a c.6990_6994delTACCT no gene *BRCA2*, foram observadas no banco de dados BIC em diversas pacientes de diferentes etnias. Diferentemente das mutações c.1138_1138delA e c.3956_3959delATGA, presentes no gene *BRCA2* e relatadas apenas em pacientes da Europa Ocidental e Alemanha, respectivamente. Essas mutações foram detectadas em nossas pacientes.

As mutações c.5263_5264insC e c.211A>G, ambas presentes no gene *BRCA1* e detectadas em nossas pacientes, foram descritas como fundadoras na população da Espanha. A primeira delas, de acordo com o banco de dados BIC, é uma das mais frequentes no gene *BRCA1* e foi originalmente descrita como mutação fundadora em Judeus Ashkenazi. Contudo, descreve-se que esta mutação é frequentemente observada em vários países europeus (Hamel et al., 2011; revisado por Karami e Mehdipour, 2013). Além disso, esta mutação foi observada por nosso grupo em três pacientes com câncer de ovário. Já a mutação missense c.211A>G foi observada principalmente na Galícia, onde representa 50% de todas as mutações nestes genes (Vega et al., 2001; Vega et al., 2002), e também nas Astúrias, onde foi observada em 23% das famílias analisadas (Blay et al., 2013). Em nosso estudo, as pacientes portadoras dessas mutações desconhecem sua ascendência.

Outra mutação missense detectada em nossa paciente e classificada como patogênica foi a c.9154C>T, presente no gene *BRCA2*. Embora classificada como desconhecida e incerta pelos bancos de dados BIC e UMD, alguns estudos sugerem, baseados na predição estrutural da proteína (ex. cristalografia) (Kutznetsov et al., 2008), história familiar (Gomez et al., 2009), co-segregação (Mohammadi et al., 2009) e modelo de probabilidade multifatorial (Farrugia et al., 2008; Walker et al., 2010) que esta mutação seja deletéria.

A mutação c.483T>A foi observada pela primeira vez no presente estudo. Mesmo não sendo observada em nenhum dos cinco bancos de dados analisados, foi caracterizada como deletéria por gerar um *stop* códon no aminoácido 161 localizado no exon 6 do gene *BRCA2*. Outras mutações observadas no presente estudo que também

geram *stop* códon são c.6656C>G e c.9382C>T, presentes nos exons 11 e 25, respectivamente, do gene *BRCA2*. Contudo, ambas já foram descritas nos bancos de dados BIC, UMD e ClinVar como deletérias. A mutação c.6656C>G foi descrita pela primeira vez em pacientes com câncer de mama da Espanha (Duran et al., 2003) e apesar de pouco frequente, já foi descrita em uma paciente brasileira (Duflath et al., 2005). Nossa paciente portadora desta mutação relatou ascendência paterna indígena.

É interessante observar que algumas mutações presentes nos genes *BRCA1* e *BRCA2* tem alta prevalência na Espanha. Este é um dos países berço de grande número de imigrantes que chegaram ao território brasileiro no século XX. Grande parte das nossas pacientes relatou ascendência européia, entretanto, a maioria desconhece sua ascendência.

Além das mutações deletérias, os resultados do sequenciamento dos genes *BRCA1* e *BRCA2* identificaram 29 VUS, presentes em 22 (27,8%) pacientes. Esta porcentagem de alterações sem significado clínico é alta em comparação a Carraro e colaboradores (2013), onde, foram observadas em 10 (18,5%) pacientes. Cada uma dessas alterações foram observadas em uma ou duas pacientes, indicando que estudos adicionais para avaliar sua neutralidade ou patogenicidade sejam importantes.

Analizamos o efeito funcional predito das alterações missense nos *softwares* PolyPhen, SIFT e AlignGVGD e observamos que apenas a alteração c.3349A>G, presente no exon 11 do gene *BRCA2*, é predita como deletéria nos três *softwares*. Esta alteração é mencionada por apenas um grupo no banco de dados ClinVar que classificou como de significado incerto.

Outra alteração que nos chamou atenção foi a deleção *in frame* c.5425_5430delGTTGTG. Esta alteração provoca a deleção de dois aminoácidos de valina nos códons 1809 e 1810, localizada no exon 23 do gene *BRCA1*. Esta região está localizada no domínio BRCT, o qual exerce crítico papel na supressão tumoral. Embora descrita pelos bancos de dados BIC e ClinVar como sendo de significado clínico desconhecido, análise por meio do *software* PROVEAN indicou que esta alteração é deletéria. Esta alteração também foi detectada em uma paciente com câncer de mama, triplo negativo, sequenciada no nosso laboratório e também foi analisada por Sobol e colaboradores (1996) o qual não chegou a uma conclusão sobre o efeito desta mutação. Nossa paciente portadora desta alteração teve carcinoma ductal invasivo triplo negativo

e história familiar positiva, isto é, em parente de primeiro grau. Estudos têm relatado alta prevalência de mutação no gene *BRCA1* em pacientes com tumor triplo negativo (Carraro et al., 2013; Couch et al., 2015; Villarreal-Garza et al., 2015). Estes indícios nos leva a supor que esta mutação possa ser patogênica e mereça ser mais bem estudada.

Outra deleção *in frame* detectada em nosso estudo foi a c.1846_1848delTCT, também observada no gene *BRCA1*. Embora tenha sido caracterizada como benigna nos bancos de dados UMD e ClinVar, ocorre em uma região altamente conservada do exon 11, o qual interage com várias proteínas reguladoras (McKean-Cowdin et al., 2005). Desta forma, acreditamos que estudos mais aprofundados desta alteração são necessários para melhor caracterização de sua importância clínica.

Como visto, aproximadamente 17% das nossas pacientes são carreadoras de mutação deletéria nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, desta forma, explicando o desenvolvimento do tumor em idade precoce. Pacientes carreadoras de mutação em um desses genes, apresentam defeito na via de reparo do DNA e o tumor apresenta características que o distinguem, como por exemplo, grande número de translocações somáticas (Stephens et al., 2009). Ainda, para a maioria das pacientes não se sabe quais fatores desencadearam o desenvolvimento do câncer de mama em idade precoce. Acredita-se que específicas mutações que ocorrem no tecido mamário passam ter iniciado o processo de carcinogênese.

Para investigar esta hipótese, avaliamos mutação somática em pacientes jovens com câncer de mama com subtipo luminal e sem mutação deletéria nos genes *BRCA1* e *BRCA2* por meio do sequenciamento completo do exoma. Comparando taxa global de alterações, observamos que em amostras dessas pacientes ocorrem aproximadamente 1,93 alterações por mega base, já em amostras de tumores luminais provenientes de pacientes na pós-menopausa, ocorrem 1,18 alterações por mega base (Ellis et al., 2012) e em amostras independentemente do subtipo ou idade, 1,66 alterações por mega base (Banerji et al., 2012). Podemos especular que haja uma tendência para o aumento da taxa de mutações em pacientes jovens.

Em nosso estudo, detectamos uma predominância de substituições C>T. Esta assinatura foi previamente associada com idade avançada, devido à elevada taxa de desaminação espontânea da 5-metil-citosina (Alexandrov et al., 2013), indicando que mesmo em jovens encontramos alterações associadas à idade.

No presente trabalho, mutações somáticas com potencial *driver* foram detectadas em 53 genes, todos já descritos no banco de dados COSMIC como alterados em câncer. Observamos a presença de mutações somáticas nos genes *PIK3CA* e *TP53*, as quais são mais frequentes em câncer de mama, independente do subtipo molecular. Comparando nossa lista de genes mutados em pacientes jovens com a lista dos genes mais frequentemente mutados em pacientes com câncer de mama luminal na pós-menopausa, excluindo estes dois genes, não houve intersecção de outros genes (Ellis et al., 2012).

Comparando os dados do sequenciamento do exoma das nossas pacientes com amostras de pacientes jovens de diferentes subtipos relatados por outros autores (n=14), além dos genes *PIK3CA* e *TP53*, mutações em outros genes foram observadas em comum, incluindo *GRIN1*, *STAB1* e *PRKARIA* (tumor triplo negativo) e *POLD1*, *RNF213* e *TTN* (tumor luminal) (Banerji et al., 2012; Nik-Zainal et al., 2012; Stephens et al., 2012; Yost et al., 2012; Craig et al., 2013).

GRIN1 codifica uma subunidade dos receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), o qual é um receptor ionotrópico ativado pelo glutamato. A frequência de mutação no gene *GRIN1* é baixa em neoplasias malignas em geral, sendo detectado em 4% dos tumores de paratireóide. Em linhagem de câncer de mama a inibição da expressão de *GRIN1* foi associada com disfunção no crescimento celular (North et al., 2010) e em células de melanoma, a perda da formação do complexo NMDAR entre *GRIN1* e *GRIN2A*, está associada ao aumento no crescimento e migração (Prickett et al., 2014). Detectamos uma alteração nonsense (p.Gln910*/c.2728C>T), localizada no final da proteína, ou seja, no domínio citoplasmático, o qual na maioria das vezes executa uma função sinalizadora para o interior celular.

STAB1 codifica uma proteína que atua como receptor transmembrana com importante papel na angiogênese e adesão celular. Esta proteína contém diversos domínios e é expressa principalmente em células endoteliais sinusoidais do fígado, baço e linfonodo. Além disso, este receptor parece estar envolvido na endocitose de diversas lipoproteínas de baixa densidade, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e produtos finais da glicosilação. Diversos tipos de cânceres apresentam alterações somáticas neste gene, principalmente câncer de pele (9,5%), intestino (7%) e estômago (6%). Detectamos uma alteração missense (p.Gly1381Arg/c.4141G>A), localizada no domínio extracelular da proteína, foi predita como deletéria apenas no PolyPhen.

PRKARIA codifica a subunidade regulatória de proteína quinase dependente de AMPc (também chamada de *PKA*), que fosforila diferentes proteínas alvo. A ativação da cascata é desencadeada pela ligação dos hormônios glucagon ou epinefrina. Perda de função por mutação no gene *PRKARIA* é a causa da maioria dos casos de complexo de Carney, que é uma síndrome de múltiplas neoplasias, caracterizada por vários tipos de tumores de pele, mixomas, schwannomas, fígado e outros tipos de câncer e neoplasias endócrinas. Acredita-se que alterações no gene *PRKARIA* podem causar hiper-ativação de sinalização de *PKA*, que impulsiona a transformação neoplásica, desta forma, *PRKARIA* é considerado um gene supressor tumoral (Almeida et al., 2011). Alteração missense p.Leu20Phe/c.58C>T, localizada no exon 3 e detectada em nossa paciente, ocorre um pouco antes da subunidade regulatória RIIA e foi considerada benigna no PolyPhen e SIFT, enquanto que, baixa frequência de alterações somáticas é observada no banco de dados COSMIC.

POLD1 codifica a subunidade catalítica da DNA polimerase delta, a qual exerce importante função na replicação e reparo do DNA. Em nossa paciente a alteração missense no gene *POLD1* (p.Pro146Arg/c.437C>G) ocorre no domínio exonuclease e foi considerada deletéria em ambos os *softwares* de predição. Alteração somática neste gene é pouco frequente, contudo, mutação germinativa no domínio exonuclease do gene *POLD1* confere um alto risco para múltiplos adenomas e carcinoma colorretal (Church et al., 2013).

RNF213 codifica uma proteína contendo um domínio dedo de zinco tipo C3HC4, que parece estar envolvido na interação proteína-proteína. A proteína também é composta por um domínio AAA que está associado com atividade ATPase. Este é um gene de susceptibilidade para a doença de Moyamoya e está envolvido na translocação com os genes *ALK* ou *MYC* em linfoma anaplásico de células grandes e casos de tumor miofibroblástico inflamatório. A frequência de mutação somática neste gene é baixa, sendo observada mais frequentemente em cânceres de pituitária (13%), peritônio (10%) e estômago (9%). Detectamos a alteração missense p.Gln2801Lys/c.8401C>A presente no exon 29 do gene *RNF213*, a qual foi predita como não tolerada apenas no SIFT.

TTN codifica a maior proteína descrita em seres humanos (Opitz et al., 2003) e atua principalmente na elasticidade e contração muscular, que após a miosina e actina, é a terceira proteína mais abundante no músculo (Labeit et al., 1997). Detectamos uma

alteração missense (p.Leu6228Ser/c.18683T>C), presente no domínio I-set da proteína, o qual está envolvido na orientação axonal, função imune e angiogênese (Stuart et al., 2006). Esta alteração foi predita como deletéria apenas pelo *software* PolyPhen. Alteração somática no gene *TTN* é uma das mais frequentes na maioria dos tipos de cânceres (Kim et al., 2013), incluindo câncer de intestino (44%), estômago (43%), pele (40%) e mama (15%) (banco de dados do COSMIC).

É interessante observar que em nossas amostras das pacientes jovens foram detectadas alterações em sítios de *splice* nos genes *EML5* e *ANLN* e alterações nonsense nos genes *NOL9*, *GRHL2*, *GRIN1* e *TTC21B*.

EML5 codifica uma proteína envolvida na organização dos microtúbulos. Detectamos uma alteração (c.4238G>T) localizada em sítio de *splice*. Mutação somática é pouco frequente, em torno de 4% em câncer de intestino, pele e endométrio.

ANLN codifica uma proteína de ligação à actina que desempenha importante papel no crescimento celular, migração e citocinese. Estudos com linhagem, onde o gene *ANLN* foi inativado, observou-se diminuição da migração de células de câncer da mama, reforçando a evidência de que o gene *ANLN* poderia estar envolvido na progressão tumoral (Zhou et al., 2015). Detectamos a alteração c.2968T>C presente no sítio de *splice* deste gene.

NOL9 codifica uma proteína envolvida no processamento do rRNA. Detectamos a alteração nonsense p.Ser283*/c.848C>G, o qual não está localizada em domínio funcional da proteína, contudo, localiza-se anteriormente ao domínio CLP1-P. Desta forma, podemos inferir que esta alteração ocasionou a perda deste domínio e do restante da proteína. A frequência de mutação somática não passa de 2%, principalmente em câncer de intestino, entretanto, não encontramos nenhum trabalho relatando a importância deste gene na carcinogênese.

GRHL2, codifica uma proteína que atua como fator de transcrição, podendo formar homodímero ou heterodímero com *GRHL1* ou *GRHL3*. Particularmente, o gene *GRHL2* está envolvido na regulação estrutural e na diferenciação dos tecidos epiteliais (Werth et al., 2010; Boglev et al., 2011; Senga et al., 2012). Amplificação neste gene tem sido observado em vários tumores, incluindo hepatocelular (Tanaka et al., 2008), carcinoma de células escamosas oral (Kang et al., 2009), câncer gástrico (Cheng et al.,

2012) e câncer de mama (Xiang et al., 2013; Yang et al., 2013). Além disso, tem sido proposto como um oncogene. Detectamos uma alteração nonsense (p.Glu32*/c.94G>T) no exon 2 deste gene, ou seja, no início da proteína, o que o torna um forte candidato a ser pesquisado.

TTC21B codifica uma proteína localizada no axonema dos cílios e desempenha um importante papel no transporte retrógrado intraflagellar. Alteração somática neste gene é baixa, sendo detectado em aproximadamente 3% dos casos de câncer de intestino e endométrio. Detectamos uma alteração nonsense (p.Arg898*/c.2692C>T), presente no exon 20 do gene *TTC21B*, ou seja, na porção final da proteína, presente no domínio tetratricopeptídeo de repetição, o qual mediam a interação proteína-proteína.

Foram observadas alterações em genes que codificam proteínas com função tirosina quinase, tais como: *PRKARIA*, *PRKDI* e *EPPKI* e genes com potencial deletério de acordo com ambos os *softwares* PolyPhen e SIFT, tais como: *CACNAIE*, *GLI3*, *IL22*, *PIK3AP1*, *POLD1* e *PRKDI*.

PRKDI é uma serina/treonina quinase que regula diversos processos celulares, como transporte no Golgi, proteção contra estresse oxidativo na mitocôndria, transcrição gênica, regulação do formato celular, motilidade e adesão. Em nossa paciente, a alteração missense p.Tyr800Cys/c.2399A>G está localizada no domínio quinase e foi considerada deletéria em ambos os *softwares* de predição. Alterações em todo o gene foram descritas em vários tipos de cânceres e alteração no domínio quinase em adenocarcinoma polimorfo de baixo grau foi associada com uma melhor sobrevida livre de metástase. Além disso, estudos funcionais sugerem que o gene *PRKDI* é provavelmente *driver* em adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (Weinreb et al., 2014).

EPPKI codifica uma proteína que pertence à família de proteínas plakin, que desempenham um papel na organização da arquitetura do citoesqueleto, provavelmente atuando na manutenção da integridade dos filamentos intermediários de queratina em células epiteliais. Recentemente o gene *EPPKI* foi apontado como possível *driver* em colangiocarcinoma intra-hepático (Zou et al., 2014), entretanto, a alteração missense p.Arg2364Gln/c.7091G>A presente no exon 2 do gene *EPPKI*, observada em nossa paciente, aparentemente tem caráter benigno em ambos os *softwares*.

CACNA1E codifica a subunidade $\alpha 1E$ de canal de cálcio tipo R, amplamente expressa no cérebro e sistema endócrino. Estes canais mediam a entrada de íons de cálcio em células excitáveis e estão envolvidos em uma variedade de processos celulares dependentes de cálcio, incluindo contração muscular, liberação hormonal ou neurotransmissor, expressão gênica, motilidade, divisão e morte celular. Em tumor de Wilms, a localização nuclear da proteína foi correlacionado com a redução da sobrevida livre de doença e a transfecção desse gene em células HEK293 revelou aumento da regulação dos genes *EGR1/EGR2/EGR3* e *FOS/FOSB*, mediada pela ativação da via MEK/ERK5/Nur77 (Natrajan et al., 2006). Alteração neste gene é observada em vários tipos de cânceres e a mesma alteração missense detectada em nossa amostra (p.Arg590Trp/c.1768C>T) já foi observada em outros tipos de cânceres como hematopoiético, sistema nervoso central, pâncreas e intestino, o que indica que este gene possa ser um candidato para novos estudos.

GLI3 codifica uma proteína que pertence a proteínas C2H2-tipo dedo de zinco subclasse da família Gli. Elas são caracterizadas como fator de transcrição de ligação ao DNA e são mediadoras da via de sinalização Sonic hedgehog (Shh). Detectamos a alteração missense p.Thr943Pro/c.2827A>C, presente no exon 15 do gene *GLI3*, mesma região onde já foram descritas alterações em câncer gástrico, principalmente nos que apresentam instabilidade de microssatélite (Wang et al., 2014).

IL22 é um membro da família de citocinas chamada IL10, o qual atuam como potentes mediadores da resposta inflamatória celular (Pestka et al., 2004). Detectamos a alteração missense p.Arg73Cys/c.217C>T, presente no exon 2 do gene *IL22*. Alterações somáticas neste gene são pouco frequentes, entretanto, a mesma alteração já foi observada em um tumor de intestino e pele.

PIK3API está envolvido na via do fosfatidilinositol 3-kinase (*PI3K*), que regula vários processos celulares, tais como crescimento, proliferação, apoptose, motilidade, diferenciação, sobrevivência e tráfego intracelular. No presente estudo, foi observada uma alteração missense (p.Gln285Lys/c.853C>A) presente no domínio Dof, BCAP e BANK (DBB). Esta mesma amostra também apresentou alteração no exon 20 do gene *PIK3CA*, que entretanto foi considerada benigna em ambos os *softwares* de predição. Podemos inferir que a desregulação desta via pode acontecer por alteração em diferentes genes.

Mutação somática no gene *PIK3CA* foi a mais frequente em nossas pacientes jovens analisadas no sequenciamento do exoma. A proteína sintetizada pelo gene *PIK3CA* é representada pela subunidade catalítica (110 kDa) do *PIK3*, o qual é composto também pela subunidade regulatória (85 kDa), que utiliza ATP para fosforilar alguns substratos. Este gene é considerado oncogene e está envolvido em diversos tipos de cânceres. Mutação somática representa uma das mais comuns alterações genéticas observadas em câncer de mama (revisado por Zardavas et al., 2014).

Avaliamos a frequência de mutação somática no gene *PIK3CA* em um grupo maior de pacientes jovens e as comparamos com pacientes mais idosas. Entre as 49 pacientes jovens (oito sequenciamento do exoma e 41 sequenciamento dos exons 9 e 20), 15 (30,7%) pacientes apresentaram mutação: nove no exon 9 (7 missense, uma nonsense, uma sinônima) e seis no exon 20 (4 missense e 2 sinônima). Nenhuma paciente com mutação no gene *PIK3CA* é carreadora de mutação germinativa nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

No presente estudo, não detectamos nenhuma diferença entre mutação somática no gene *PIK3CA* em pacientes jovens comparadas com pacientes mais velhas, da mesma forma com que já relatado por outros autores (Mangone et al., 2012; Cizkova et al., 2012; Loi et al., 2013) e em nossa meta análise, envolvendo 1980 pacientes, 111 jovens, indicando que esta via pode estar desregulada independente da idade. Entretanto, uma tendência na associação entre mutação neste gene e pacientes mais velhas já foi observada (Liedtke et al., 2008).

Observamos que a maioria das nossas pacientes jovens com mutação no gene *PIK3CA* são portadoras de tumor de mama luminal, sendo que associação entre mutação neste gene e expressão positiva de ER já foi relatada anteriormente (Maruyama et al., 2007; Kalinsky et al., 2009; Dunlap et al., 2010; Cizkova et al., 2012; Loi et al., 2013). Além disso, uma correlação direta na frequência de mutação somática no gene *PIK3CA* em tumores positivos para ER foi detectado, indicando que a frequência de mutação somática no gene *PIK3CA* aumenta em tumores positivos para receptor de estrógeno em pacientes idosas.

Outro gene alterado em tumor luminal de pacientes jovens foi o *TP53*. Segundo dados da nossa meta análise, aproximadamente 20% das pacientes com ≤ 35 anos apresentam mutação somática neste gene, porcentagem similar já observada em

pacientes jovens (Gentile et al., 1999). Nenhuma diferença foi detectada na frequência de mutação somática entre pacientes jovens e idosas, da mesma forma com que já observado em alguns trabalhos (Simão et al., 2002; Chen et al., 2004), entretanto, diferentemente de outros, onde houve associação com idade precoce (Van Emburgh et al., 2008) ou idade avançada (Bozhanov et al., 2010). Além disso, observamos que mutação somática no gene *TP53* foi mais frequente em tumores ER negativos (41,8%), de acordo com alguns autores (Olivier et al., 2006; Loi et al., 2013), porém, diferente de outros (Chen et al., 2004; Bozhanov et al., 2010), onde nenhuma associação foi detectada.

Em suma, em pacientes jovens com câncer de mama, observamos uma alta prevalência de história familiar positiva compatível com a Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário (n=30: 46,9%), bem como, uma alta taxa de pacientes carreadoras de mutação deletéria nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* (n=13: 16,5%). Aproximadamente 28% das pacientes apresentam alterações sem significado clínico conhecido nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*. Em tumores luminais de pacientes jovens, detectamos uma média de 39 alterações somáticas por paciente, incluindo genes que codificam receptores tirosina quinase e outras alterações com potencial *driver*. O gene *PIK3CA* foi o único alterado em mais de uma paciente, entretanto, nenhuma diferença na frequência de alterações foi observada quando comparada com pacientes mais velhas. Acreditamos que estudos funcionais possam contribuir para um melhor entendimento destas alterações na carcinogênese, assim, possibilitando traçar uma conduta mais apropriada tanto do ponto de vista de aconselhamento genético, no caso das alterações germinativas, quanto prognóstico e terapêutico, envolvidos com as alterações somáticas. Os manuscritos referentes a esta tese encontram-se nos Anexos L e M.

6. CONCLUSÕES

Características clínicas, hábitos de vida e história familiar:

- A maioria das pacientes jovens com câncer de mama tiveram diagnóstico de carcinoma ductal invasivo, alto grau histológico, alto índice proliferativo e subtipo luminal;
- Uso de contraceptivo oral foi utilizado pela maioria das pacientes jovens, diferentemente do uso de tabaco e álcool;
- Dentre as pacientes com história familiar informativa, 46,9% apresentaram história sugestiva para Síndrome de Câncer de Mama e ovário Hereditário;
- Aproximadamente 23% referiram história familiar não informativa, principalmente pelo desconhecimento de familiares do lado paterno.

Mutação de linhagem germinativa nos genes *BRCA1* e *BRCA2*:

- Cerca de 16% das pacientes jovens são carreadoras de mutação deletéria nos genes *BRCA1* (5%) e *BRCA2* (11%);
- Em 28% das pacientes foram detectadas alterações sem significado clínico conhecido;
- Nenhuma grande inserção e/ou deleção foi detectada em ambos os genes.

Mutações somáticas em tumores luminais de pacientes não carreadoras de mutação nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*:

- Uma média de 39 alterações somáticas foram detectadas, por tumor;
- *PIK3CA* foi o gene com maior número de alterações;
- Alterações em genes que codificam receptores tirosina quinase e outras alterações com potencial *driver* foram identificadas.

Meta análise de mutações somáticas relacionadas à idade:

- A frequência de mutação somática nos genes *PIK3CA*, *TP53*, *CDH1*, *GATA3* e *PTEN* não foi associada a idade.

Mutações somáticas no gene *PIK3CA* em pacientes jovens e mais idosas:

- Aproximadamente 31% das pacientes jovens e 44% das pacientes mais idosas apresentam alteração somática no gene *PIK3CA*.

7. ANEXOS

Anexo A. Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa – IBCC

Instituto Brasileiro de
Controle do Câncer
Entidade Camiliana

Av. Alcântara Machado, 2576
CEP 03102-002 - São Paulo - SP
Tel.: + 55 11 3474-4222
www.ibcc.org.br

São Paulo, 29 de maio de 2009.

Vimos informar que, em reunião do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do I.B.C.C., realizada no dia 29 de maio de 2009, foi apresentado o Projeto de Pesquisa: "Determinação de mutações somáticas e germinativas em pacientes jovens com câncer de mama". Pesquisador responsável Dr. Eduardo Carneiro de Lyra.

Após apreciação do CEP, o projeto de pesquisa supracitado foi aprovado.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'José Costa de Andrade', is written over a horizontal line.

Dr. José Costa de Andrade
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Brasileiro de Controle do Câncer – IBCC

Anexo B. Aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa – FMUSP/ICESP **APROVAÇÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **28/09/2011**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **397/11** intitulado: **“DETERMINAÇÃO DE MUTAÇÕES SOMÁTICAS E GERMINATIVAS EM PACIENTES JOVENS COM CÂNCER DE MAMA.”** apresentado pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo “Octávio Frias de Oliveira”

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

**Pesquisador (a) Responsável: Maria Aparecida de Azevedo Koike
Folgueira**

Pesquisador (a) Executante: Giselly Encinas Zanetti

CEP-FMUSP, 29 de Setembro de 2011.

**Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa**

Anexo C. Questionário – Antecedentes Pessoais e Hábitos

IDENTIFICAÇÃO

- 1) Data da entrevista: ____/____/____
- 2) Situação do(a) paciente no estudo. (1) caso (2) controle
- 3) Se for caso, qual o diagnóstico (tipo de tumor)?
 - a) Câncer na mama direita
 - b) Câncer na mama esquerda
- 4) Atualmente esta fazendo algum tipo de tratamento? a) Sim b) Não
- 5) Se sim, qual?
 - a) quimioterapia. Qual _____
 - b) radioterapia. Qual _____
 - c) hormonioterapia. Qual _____
 - d) outros. Qual _____
- 6) Número do(a) paciente no estudo: _____
- 7) Nome completo do(a) paciente (iniciais): _____
- 8) Data de Nascimento: ____/____/____
- 9) Idade: ____ anos.
- 10) Início da entrevista: ____ hs ____ min

DADOS GERAIS

- 11) Baseada no bronzeamento e queimadura de sol, cor de olhos e cabelos, qual sua cor da pele? Classificação de Fitzgerald para a definição de cores de pele, usando a escala de Von Luschan

Resp.	Tipo	Descrição de Pele	Reação ao Sol	Cor dos Olhos e Cabelos	Escala von Luschan
a)	I	muito clara, ou "celta"	Queima com frequência, raramente bronzeia.	A presença de sardas é frequente; cabelos ruivos, castanhos ou loiros e olhos claros: azuis, verdes, cinzas e etc.	1-5
b)	II	clara; europeu de pele clara	Queima com frequência, às vezes bronzeia.	Cabelos claros ou escuros, e olhos azuis, verdes, castanhos, cinzas e âmbar.	6-10
c)	III	clara média; europeu de pele escura, ou ainda, caucasiano médio	Às vezes queima, bronzeia com frequência.	Geralmente, cabelos castanhos e olhos azuis, verdes, castanhos, âmbar e, raramente, pretos.	11-15
d)	IV	escura média; pessoas típicas do "Mediterrâneo" (sul da Europa e norte da África), ou ainda, pele cor de oliva	Raramente queima, bronzeia com frequência.	Geralmente, cabelos castanhos escuros, pretos e olhos azuis, verdes, castanhos ou, ainda, pretos.	16-20
e)	V	escura, "marrom" ou "parda"	Pele natural marrom-negra.	Cabelos pretos e olhos castanhos ou pretos.	21-28
f)	VI	muito escura ou "negra"	Pele natural negra.	Cabelos e olhos pretos, com poucas variações.	29-36

12) Qual sua ancestralidade

Pai___ Mãe___ Avô Paterno___ Avó Paterna___ Avô Materno___ Avó Materna___

- a) Africano
- b) Europeu
- c) Asiático
- d) Indígena
- e) Oriental
- f) Judaico
- g) Brasileiro
- h) Outro _____
- i) Não sabe

13) Aonde o(a) senhor(a) nasceu?

Estado:_____ Município:_____ País:_____

14) Onde morou quando tinha:

até 10 anos ___ 11-20 anos ___ 21-30 anos ___ 31-40 anos ___

- a) Zona rural
- b) Zona urbana
- c) Zona semi-urbana
- d) Não sabe

15) Qual sua religião?

- a) Católico
- b) Evangélico
- c) Espirita
- d) Budista
- e) Adventista
- f) Testemunha de Jeová
- g) Judeu
- h) Nenhuma
- i) Outros

ESCOLARIDADE

16. O(a) senhor(a) é alfabetizada? a) Sim b) Não

17. Qual sua escolaridade?

- a) Fundamental I incompleto
- b) Fundamental I completo
- c) Fundamental II incompleto
- d) Fundamental II completo
- e) Ensino Médio incompleto
- f) Ensino Médio completo
- g) Ensino Superior incompleto
- h) Ensino Superior completo
- i) Nenhuma

18. Qual a escolaridade de seu pai?

- a) Fundamental I incompleto
- b) Fundamental I completo
- c) Fundamental II incompleto

- d) Fundamental II completo
- e) Ensino Médio incompleto
- f) Ensino Médio completo
- g) Ensino Superior incompleto
- h) Ensino Superior completo
- i) Nenhuma

19. Qual a escolaridade da sua mãe?

- a) Fundamental I incompleto
- b) Fundamental I completo
- c) Fundamental II incompleto
- d) Fundamental II completo
- e) Ensino Médio incompleto
- f) Ensino Médio completo
- g) Ensino Superior incompleto
- h) Ensino Superior completo
- i) Nenhuma

HISTÓRIA PROFISSIONAL

20. Qual sua situação profissional agora?

- a) Trabalhando
- b) Desempregada
- c) Aposentada
- d) Não trabalhando devido a doença permanente
- e) Nunca trabalhou
- f) Outros

21. Faz quanto tempo que o (a) senhor(a) deixou de trabalhar? _____ anos

22. Que tipo de atividade o(a) senhor(a) desempenha ou desempenhou em seu trabalho?

- a) Agricultura/trabalho em fazendas/pesca
- b) Indústria têxtil/costura
- c) Indústria
- d) Administração/escritório
- e) Serviços/vendas
- f) Serviço doméstico (em outras residências)
- g) Garçom em bares, restaurantes/discotecas
- h) Cabelereira
- i) Outra _____

23. Quantas horas por dia o(a) senhor(a) trabalha ou trabalhava?

- a) < 8 hs
- b) ≥ 8 hs
- c) não sabe

24. Por quanto tempo o(a) senhor(a) trabalha ou trabalhou nesta atividade? _____ anos

25. O(a) senhor(a) já teve outros empregos antes desse? a) Sim b) Não

26. Se *Sim*, com que tipo de atividade?

- a) Agricultura/trabalho em fazendas/pesca
- b) Indústria têxtil/costura
- c) Indústria
- d) Administração/escritório

- e) Serviços/vendas
 - f) Serviço doméstico (em outras residências)
 - g) Garçom em bares, restaurantes/discotecas
 - h) Cabelereira
 - i) Outra _____
27. Por quanto tempo? ____ anos

HISTÓRIA MENSTRUAL E OBSTÉTRICA

28. Quantos anos a senhora tinha quando ficou menstruada pela primeira vez? ____ anos
29. A senhora ainda menstrua? a) Sim b) Não
30. Se Não, com que idade a senhora parou de menstruar? ____ anos
31. A menstruação parou de vir depois de alguma tratamento/cirurgia? a) Sim b) Não
32. Se sim, qual a) cirurgia b) quimioterapia c) hormonioterapia d) radioterapia
33. Sua menstruação ocorre normalmente todos os meses? a) Sim b) Não
34. Como são seus ciclos menstruais? (excluir os ciclos em período de uso de pílula anticoncepcional)
- a) Menos de 26 dias
 - b) 26-30 dias
 - c) Mais de 41 dias
 - d) Muito irregulares
 - e) Não sabe informar
35. Antes ou durante a sua menstruação, a senhora costuma ou costumava ter:
- Dor nas mamas? a) Sim b) Não
 - Nódulo nas mamas? a) Sim b) Não
 - Mamas inchadas? a) Sim b) Não
 - Mamas endurecidas ou pesadas? a) Sim b) Não
36. Atualmente a senhora usa algum método contraceptivo? a) Sim b) Não
37. Qual _____ Idade que iniciou? ____ anos
38. A senhora já usou outros métodos contraceptivos? a) Sim b) Não
39. Qual ____ Idade-iniciou ____ Idade-parou ____ Pq parou ____
- MÉTODO** - a) Yasmin b) Microvilar c) Ciclo 21 d) Yaz e) Diane f) Selene g) Nordete h) Deprovera i) Tamisa j) Primera l) Perlatan m) Mesygina n) Prostran o) Gracial p) Não sabe
- PQ. PAROU** - a) devido à doença b) Decisão pessoal c) Não adaptação d) Mudança de método e) engravidar f) Orientação médica g) Não sabe
40. A senhora está grávida agora? a) Sim b) Não
41. A senhora já ficou grávida alguma vez? a) Sim b) Não
42. Caso à senhora tenha engravidado, quantas vezes foram? ____
43. A senhora já teve algum aborto? a) Sim b) Não
44. Se *Sim*, quantos naturais? ____
45. Quantos provocados? ____
46. Senhora poderia informar os seguintes dados sobre sua (s) gestação(ões), incluindo os abortamentos?
- Primeira Gestação
- Quantos anos a senhora tinha? ____ idade
- Quantos meses foram a sua gestação? ____ meses

Quantos recém-nascidos eram? ____

Qual o sexo? a) feminino b) masculino

O(s) recém nascido(s) nasceu(ram)? a) vivo(s) b) morto(s)

Segunda Gestação

Quantos anos a senhora tinha? ____ idade

Quantos meses foram a sua gestação? ____ meses

Quantos recém-nascidos eram? ____

Qual o sexo? a) feminino b) masculino

O(s) recém nascido(s) nasceu(ram)? a) vivo(s) b) morto(s)

Terceira Gestação

Quantos anos a senhora tinha? ____ idade

Quantos meses foram a sua gestação? ____ meses

Quantos recém-nascidos eram? ____

Qual o sexo? a) feminino b) masculino

O(s) recém nascido(s) nasceu(ram)? a) vivo(s) b) morto(s)

Quarta Gestação

Quantos anos a senhora tinha? ____ idade

Quantos meses foram a sua gestação? ____ meses

Quantos recém-nascidos eram? ____

Qual o sexo? a) feminino b) masculino

O(s) recém nascido(s) nasceu(ram)? a) vivo(s) b) morto(s)

47. Em relação ao(s) seu(s) seu(s) puerpério(s)? A senhora teve problema nas mamas? a) Sim b) Não Qual? _____

48. Amamentou? a) Sim b) Não Quanto tempo? ____

49. Se a senhora nunca engravidou, tal fato ocorreu devido a:

- a) Decisão individual ou do casal
- b) Tentou engravidar, mas não conseguiu
- c) Não sabe explicar

50. Alguma vez já foi identificado algum problema de fertilidade com a senhora ou seu marido? a) Sim b) Não

51. Se *Sim*, qual tipo de problema? _____

52. A senhora já fez ou faz tratamento para infertilidade? a) Sim b) Não Qual idade? _____

53. A senhora já fez Ooforectomia prévia? a) Sim b) Não Qual idade? _____

HISTÓRIA FAMILIAR

54. Qual o seu estado civil atual?

- a) Solteiro(a)
- b) Casado(a)/união estável por mais de 6 meses
- c) Separado(a)
- d) Divorciado(a)
- e) Viúvo(a)
- f) Outros _____

55. O(a) senhor(o) tem antecedente pessoal de câncer? a) Sim b) Não

56. Com quantos anos foi diagnosticado (a) com a doença? ____ anos

57. Qual o local do tumor? _____

58. Heredograma

HISTÓRIA SOCIAL – TABAGISMO

59. O(a) senhor(a) se enquadra, em relação ao hábito de fumar, em que condição:

- a) Fumante*
- b) Ex fumante**
- c) Nunca fumou

*Fumante se já fumou alguma vez na vida pelo menos um cigarro por dia durante um período mínimo de três meses.

**Ex-fumante a fumante anterior que interrompeu o hábito há pelo menos um ano.

60. Com quantos anos o(a) senhor(a) tentou fumar pela primeira vez? ____ anos

61. Com que idade o(a) senhor(a) começou a fumar regularmente (todos os dias por mais de 1 ano)? ____ anos

62. Em algum momento de sua vida o(a) senhor(a) parou e depois voltou a fumar?

- a) Sim b) Não

63. Quanto tempo neste período o(a) senhor(a) ficou sem fumar? ____

64. Qual tipo de tabaco o(a) senhor(a) fuma/fumava?

- a) Manufaturado com filtro
- b) Manufaturado, sem filtro
- c) Enroladinho de papel
- d) Enroladinho de palha
- e) Tabaco de mascar
- f) Charuto
- g) Cachimbo
- h) Outros
- i) Não sabe

65. Durante o tempo que o(a) senhor(a) fuma/fumou, quantos pacotes de cigarro geralmente fuma/fumava por dia?

- a) Menos da metade do pacote
- b) Metade do pacote
- c) Um pacote
- d) Um pacote e meio
- e) Dois pacotes
- f) Dois pacotes e meio
- g) Três pacotes
- h) Três pacotes e meio

- i) Mais de quatro pacotes
- j) Não lembra

66. De acordo com cada idade, quantos cigarros, charutos, cachimbos o(a) senhor(a) fumava por dia?

Aos 10-20 anos ____ Aos 21-30 anos ____ Acima dos 31 anos ____

- a) Menos da metade do pacote
- b) Metade do pacote
- c) Um pacote
- d) Um pacote e meio
- e) Dois pacotes
- f) Dois pacotes e meio
- g) Três pacotes
- h) Três pacotes e meio
- i) Mais de quatro pacotes
- j) Não lembra

67. O(a) senhor(a) já fumou maconha em algum momento de sua vida?

- a) Sim b) Não

68. O(a) senhor(a) fuma ou já fumou maconha (marijuana) regularmente (pelo menos uma vez por semana pelo menos por 6 meses)? a) Sim b) Não

69. Quantas vezes por semana fuma/fumava maconha?

- a) 1-2 vezes
- b) 3-4 vezes
- c) 5-6 vezes
- d) todos os dias

70. A senhora esteve ou esta casada com um(a) fumante? a) Sim b) Não

71. Em sua casa o(a) senhor(a) convive com fumantes? a) Sim b) Não Quantas pessoas? ____

72. Em sua casa ou trabalho a senhora acha que respira fumaça de em média por mais de 2 horas por dia? a) Sim b) Não

73. Em sua casa ou trabalho a senhora acha que nos últimos 10 anos respirou fumaça de cigarros em média por mais de 2 horas por dia? a) Sim b) Não

74. Quando era criança/adolescente (abaixo de 18 anos de idade) morou com adultos que fumavam cigarros (charuto/cachimbo) em sua casa? a) Sim b) Não

HISTÓRIA SOCIAL – ÁLCOOL

75. A senhora ingere bebidas alcoólicas regularmente?

- a) Sim, ainda bebe
- b) Nunca
- c) Só no passado

76. Com que idade o (a) senhor(a) experimentou bebida alcoólica pela primeira vez? ____

77. Com que idade o(a) senhor(a) começou a beber regularmente (pelo menos uma vez ao mês)? ____

78. O(a) senhor(a) consome/consumia vinho? a) Sim b) Não

79. Se *Sim*, quantas taças (200mL) por semana?

- a) 1 a 2 taças
- b) 3 a 4 taças
- c) 5 a 6 taças

- d) 7 a 8 taças
- e) Acima de 9 taças
- f) Não lembra

80. De acordo com cada idade, quantas taças de vinho o(a) senhor(a) bebia por semana?

Aos 10-20 anos ____ Aos 21-30 anos ____ Aos 31-40 anos ____

- a) 1 a 2 taças
- b) 3 a 4 taças
- c) 5 a 6 taças
- d) 7 a 8 taças
- e) Acima de 9 taças
- f) Não lembra

81. O(a) senhor(a) consome/consumia cerveja? a) Sim b) Não

82. Se *Sim*, quantas latinhas (350mL) o(a) senhor(a) bebe por semana?

- a) 1 a 2 latinhas
- b) 3 a 4 latinhas
- c) 5 a 6 latinhas
- d) 7 a 8 latinhas
- e) Acima de 9 latinhas
- f) Não lembra

83. De acordo com cada idade, quantas latinhas de cerveja o(a) senhor(a) bebia por semana?

Aos 10-20 anos ____ Aos 21-30 anos ____ Aos 31-40 anos ____

- a) 1 a 2 latinhas
- b) 3 a 4 latinhas
- c) 5 a 6 latinhas
- d) 7 a 8 latinhas
- e) Acima de 9
- f) Não lembra

84. O(a) senhor(a) consome/consumia vodka ou pinga? a) Sim b) Não

85. Se *sim*, quantas doses (30mL) o(a) senhor(a) bebe por semana?

- a) Menos de 2 doses
- b) 3 a 5 doses
- c) 6 a 8 doses
- d) 9 a 12 doses
- e) Acima de 13 doses
- f) Não lembra

86. De acordo com cada idade, quantas doses de vodka ou pinga o(a) senhor(a) bebia por semana?

Aos 10-20 anos ____ Aos 21-30 anos ____ aos 31-40 anos ____

- a) Menos de 2
- b) 3 a 5 doses
- c) 6 a 8 doses
- d) 9 a 12 doses
- e) Acima de 13
- f) Não lembra

87. O(a) senhor(a) consome/consumia alguma outra bebida? a) Sim b) Não

HABITOS DE VIDA

- 88.** O(a) senhor(a) prática exercícios físicos? a) Sim b) Não
- 89.** Se Sim, quantas vezes por semana?
- a) 1 a 2 vezes
 - b) 3 a 4 vezes
 - c) 5 a 6 vezes
 - d) Todos os dias
- 90.** O(a) senhor(a) já praticou exercícios físicos em algum momento de sua vida?
- a) Sim b) Não
- 91.** Se Sim, quantas vezes por semana?
- a) 1 a 2 vezes
 - b) 3-4 vezes
 - c) 5-6 vezes
 - d) Todos os dias
- 92.** Há quanto tempo parou?
- a) <6 meses
 - b) 6 meses a 1 ano
 - c) 2-5 anos
 - d) 6-10 anos
 - e) > 10 anos
 - f) não sabe
- 93.** A senhora tem algum animal de estimação em casa? a) Sim b) Não
- 94.** Se sim, qual? _____

HISTÓRIA AMBIENTAL

- 95.** O(a) senhor(a) vive ou já viveu em área rural onde se usava agrotóxicos (remédios para as plantas)? a) Sim b) Não
- 96.** Se *Sim*, que tipo de plantações? _____
- 97.** Se *Sim*, o(a) senhor(a) sabe informar qual tipo de remédio para as plantas são ou eram utilizados? _____
- 98.** Por quanto tempo o(a) senhor(a) vive ou viveu nesta(s) localidades(s)? _____
- 99.** Se o(a) senhor(a) não vive mais, quanto tempo faz? _____
- 100.** O(a) senhor(a) trabalha ou já trabalhou diretamente com agrotóxicos?
- a) Sim b) Não
- 101.** Se *Sim*, especifique _____
- 102.** O(a) senhor(a) usa, pelo menos duas vezes por mês, inseticidas para eliminar baratas e/ou outros insetos domésticos? a) Sim b) Não
- 103.** Se *Sim*, especifique _____
- 104.** Na sua residência o(a) senhor(a) já foi visitada por profissionais de Serviços Públicos de Higiene Sanitária para eliminação química de insetos? a) Sim b) Não
- 105.** Qual órgão? a) SUCAM b) FEEMA c) Outros d) Não sabe
- 106.** O(a) senhor(a) faz ou fez uso de serviço especializado particular de dedetização? a) Sim b) Não
- 107.** Com que frequência? a) 1x ano b) 2x ano c) 3x ano d) >4x ano
- 108.** Por quantos anos? a) 1 ano b) 2 anos c) 3 anos d) >4 anos

HISTÓRIA PATOLÓGICA PREGRESSA

109. O(a) senhor(a) já recebeu tratamento para alguma(s) doença(s) abaixo?

Hipertensão arterial a) Sim b) Não Idade____ Há qto tempo____

Deficiência hormonal a) Sim b) Não Idade____ Há qto tempo____

Distúrbio emocional nervoso (a) Sim b) Não Idade____ Há qto tempo____

Diabetes a) Sim b) Não Idade ____ Há quanto tempo ____

Dislipidemia (colesterol alto) a) Sim b) Não Idade ____ Há qto tempo ____ Outras a)

Sim b) Não Qual____ Idade____ Há qto tempo____

110. O(a) senhor(a) apresenta ou já apresentou problemas nas mamas como*

Dor a) Sim b) Não Idade____ Mama ____

Nódulo a) Sim b) Não Idade____ Mama ____

Abscesso a) Sim b) Não Idade____ Mama ____

Trauma a) Sim b) Não Idade____ Mama ____

Problema no mamilo a) Sim b) Não Idade____ Mama ____

Outros a) Sim b) Não Idade____ Mama ____

*Para os casos não considerar os relacionados à doença atual.

111. O(a) senhor(a) já foi submetida a alguma biópsia* de mama? a) Sim b) Não*

* Para os casos não considerar os procedimentos diagnósticos para a doença atual.

112. Se *Sim*, com que idade? ____ anos

113. O(a) senhor(a) já sofreu alguma cirurgia de mama? a) Sim b) Não

114. Se *Sim*, qual? _____ Idade ____ anos

115. O(a) senhor(a) faz/fez uso contínuo de AAS? a) Sim b) Não

116. Se *Sim*, qual dose? (1) < ou = 100mg (2) > 100mg (3) não sabe

117. Com que frequência o(a) senhor(a) usa/usava?

a) Diariamente

b) Dias alternados

c) Outros: _____

118. Por quanto tempo o(a) senhor(a) usa/usou?

a) < 1 ano

b) 1 a 3 anos

c) 3 a 5 anos

d) > 5 anos

e) não sabe

DADOS ANTROPOMÉTRICOS

119. A sua altura é (sem sapatos): _____m

120. O seu peso atual sem roupas é: _____ kg

121. Quanto o(a) senhor(a) pesava quando tinha a idade de 18 anos de idade? _____kg

122. Quanto o(a) senhor(a) pesava em torno dos 30 anos de idade? _____ kg

123. Qual foi o seu peso máximo excluindo-se os períodos de gestação? _ kg _anos

124. Qual o seu número de sutiã (se tiver feito plástica de mamas considerar o número antes da cirurgia)? a) P b) M c) G d) GG e) Não sabe

125. O(a) senhor(a) pinta ou já pintou os cabelos? a) Sim b) Não

126. Se *Sim*, Há quanto tempo? a) ≤ 1 ano b) 2-5 anos c) >5 anos d) não sabe

FINAIS

Para o entrevistador:

Final da entrevista: ____hs ____ min

A cooperação da entrevistada foi:

- a) Muito boa
- b) Boa
- c) Regular
- d) Ruim

Observações:

Anexo D. Oligonucleotídeos para o gene *BRCA1*.

Exon	Oligonucleotídeos Foward (F) e Reverso (R)	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho
2	F: 5' GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT 3' R: 5' TGTCTTTTCTTCCCTAGTATG 3'	56	250
3	F: 5' TCCTGACACAGCAGACATTTA 3' R: 5' TTGGATTTTTCGTTCTCAC TTA 3'	56	340
5	F: 5' GCTTGTAAATTCACCTGCCAT 3' R: 5' TTCCTACTGTGGTGGCTTCC 3'	56	270
6	F: 5' AGGTTTCTACTGTTGCTGCAT 3' R: 5' AAAAGGCTTATCACCACGTC A 3'	66	308
7	F: 5' GGGTTTCTCTTGGTTTCTTTG 3' R: 5' GGAGGACTGCTTC TAGCC TG 3'	66	329
8	F: 5' AAGCACAGAAGTGGCCAACA 3' R: 5' CACTTCCCAGAGC TGC TAC 3'	66	274
9	F: 5' TGCACAGTAGATGCTCAGT 3' R: 5' CACATACATCC CTGAACC TAAA 3'	64	292
10	F: 5' TTGGTCAGCTTTCTGTAATCG 3' R: 5' CCATACCACGACATTTGACA 3'	62	348
11A	F: 5' TAGCCAGTTGGTTGATTTC 3' R: 5' CCCATCTGTTATGTTGGCTC 3'	64	394
11B	F: 5' CCATGTGGCACAATACTCA 3' R: 5' TGATTCAGACTCCC CATCAT 3'	64	399
11C	F: 5' GAAAC TGC CATGC TCAGAGA 3' R: 5' ATTTATTTGTGAGGGGACGC 3'	64	437
11D	F: 5' TCCCCAACTTAAGCC CATGTA 3' R: 5' AGAAGACTTC CTCTCAGCC 3'	64	437
11E	F: 5' TTCAAACGAAAGCTGAACC 3' R: 5' TTGGAAGGCTAGGATTGACA 3'	64	444
11F	F: 5' GGTAAAGAAC CTGCAACTGG 3' R: 5' TCAATGCTGCACACTGACT 3'	64	416
11G	F: 5' GAAAGGGTTTGCAAACTGA 3' R: 5' TTCTCTTTC TGCATTTCCTG 3'	64	381
11H	F: 5' TTTCGTTGCTCTGAACTGA 3' R: 5' AACCACAGTCGGGAAACA 3'	64	376
11I	F: 5' CTCAGGTTGCAAAACCCTA 3' R: 5' ATCAC TGCAGGCTTTCC TGT 3'	64	507
11J	F: 5' AC TAATGAAGTGGGCTCAG 3' R: 5' CCAATGTGTATGGGTGAAA 3'	64	445
11K	F: 5' GATGTTCTGAGATGCC TTTG 3' R: 5' TGATGACCTGTTAGATGATGGT 3'	64	401
11L	F: 5' ACCGTTGC TACCGAGTGTCT 3' R: 5' GTGCTCCCCAAAAGCATAAA 3'	64	438
12	F: 5' GTCCTGCCAATGAGAAGAAAAG 3' R: 5' TGTCAAGCAAACCTAAGAATGT 3'	64	267
13	F: 5' AATGGAAGC TTCTCAAAGTA 3' R: 5' ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC 3'	66	322
14	F: 5' TGTGTATCATAGATTGATGCTTTT 3' R: 5' GCAATAAAGTGTATAAATGCCTGT 3'	60	360
15	F: 5' TTGC CAGTCATTTC TGATCT 3' R: 5' AAACCTTGATTAACTTGAGC 3'	60	484
16	F: 5' AATTCTTAACAGAGACCAGAAC 3' R: 5' AAAAC TCTTCCAGAATGTTGT 3'	60	452
17	F: 5' GTGTAGAACGTGCAGGATTG 3' R: 5' TCGCCTCATGTGGTTTAA 3'	56	265
18	F: 5' GGCTC TTTAGCTTC TTAGGAC 3' R: 5' GAGACCCATTTTCC CAGCATC 3'	62	354
19	F: 5' CTGTCATTCTTCCGTGCTC 3' R: 5' CATTGTTAAGGAAAGTGGTGC 3'	62	250
20	F: 5' TGACGTGCTGCTCCACTTC 3' R: 5' GGTGGGATGGAAGAGTGAA 3'	62	322
21	F: 5' CAGGTGGTGAACAGAGAAA 3' R: 5' ACATTTCAAGCAATCTGAGGA 3'	62	300
22	F: 5' CATCCGGAGAGGTAGGGTA 3' R: 5' CATCCATAGGGAC TGACAGG 3'	58	240
23	F: 5' CCTGTCTCAAAAACAACA 3' R: 5' CAAGCACCAGGTAATGAGTG 3'	60	235
24	F: 5' TGGAGTCGATTGATTAGAGC 3' R: 5' AGCCAGGACAGTAGAAGAAC 3'	58	301

F = senso (forward) e R = antissenso (reverse)

Anexo E. Oligonucleotídeos para o gene *BRCA2*.

Exon	Oligonucleotídeos Forward (F) e Reverse (R)	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho	Exon	Oligonucleotídeos Forward (F) e Reverse (R)	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho
2	F: 5' CCAGGAGATGGGACTGAATTAG 3' R: 5' CTGTGACGTACTGGGTTTGTAG 3'	64	311	11 M	F: 5' GCCAGTATTGAAGAAATGTTGAAGATC 3' R: 5' AACCCCTTATGTGAATGGGTGCTAC 3'	68-61/61	443
3	F: 5' TTCCTTATGATCTTTAACTGTTCTG 3' R: 5' GCTAAGATTAAACACAGGTTTGC 3'	64	408	11 N	F: 5' AACGAAATATGGCAGGTTGTTAC 3' R: 5' GCTTCCACTTGTCTAATAATCC 3'	68-61/61	436
4	F: 5' AGAATGCAATTTATATCCAGAGTA 3' R: 5' AATCAGATTGATCTTTATAGAACA 3'	62	249	11 O	F: 5' CCAGCTCACAGAGAGAAATACTG 3' R: 5' TTACGCTTTTAAAGTGAAGCCTGTTTC 3'	68-61/61	503
5+6	F: 5' TTCACAATTTATATGAATGAGATC 3' R: 5' CTCAGGGCAAGGGTATAACGC 3'	62	362	11 P	F: 5' AAACCCAGAGCACTGTGTAACTC 3' R: 5' TCTCCTCTCTTTTCCAAATCTTG 3'	68-61/61	487
7	F: 5' CCTAATGATCAGGGCATTTTC 3' R: 5' CAACCTCATCTGCTCTTCTTG 3'	64	214	11 Q	F: 5' TACAGATTCTAAATGCCAAGTCATG 3' R: 5' TAACCATCTCCCAAACTGAC 3'	68-61/61	265
8	F: 5' GTAGATGCTGTTTTTGATGCTGAC 3' R: 5' GAGAGACAGCAGAGTTTCAAGG 3'	64	315	12	F: 5' AATTGACATTGAAGACTGACTTACTC 3' R: 5' AGCACTTTGGAGAGCAGG 3'	64	370
9	F: 5' CAGATAACTGAATCACCAAAAGTG 3' R: 5' ACAACAACAAAAAACCCTGATTC 3'	62	262	13	F: 5' GCATCCGTTACATTCACCTGAAA 3' R: 5' ACGGGAAGTGTAACTTCTTAACG 3'	64	310
10 A	F: 5' TATAAATTAATGCTGTTCTGTT 3' R: 5' AAGGGCTCTGATTTGCTAC 3'	54	374	14 A	F: 5' ACCATGTAGCAATGAGGCTCT 3' R: 5' GCTTTGCTGTTTCTCTCCAA 3'	62	391
10 B	F: 5' ATCTGAAGTGGAACTCAATGATAC 3' R: 5' ACGTGGCAAGAATCTCTGAAGTAA 3'	64	280	14 B	F: 5' CACAGAGTTGAACAGTGTGTAGG 3' R: 5' GGCTTTAAATACCAACACC 3'	62	297
10 C	F: 5' TTTCAGAAAAGACCTATTAGACA 3' R: 5' CTTTGTGATACCTGAATGAAGAG 3'	62	242	15	F: 5' GCCAGGGGTTGTGCTTTT 3' R: 5' ATTTCAATCATCATCTCTGCT 3'	60	369
10 D	F: 5' TAAGCAGGCAATATCTGGAACTTCT 3' R: 5' GTGATAATTAACTGCAATCTTCA 3'	60	295	16	F: 5' TTGTTGAATTCAGTTTGTGTTTG 3' R: 5' AGCAACTTTTATAGTTTCAGAG 3'	60	396
10 E	F: 5' TTTAATGATATGGAAGCTGG 3' R: 5' TTACAAAAAAGAGACAGAGGT 3'	56	268	17	F: 5' CAGAGAAATGTTGATGTTGTTGA 3' R: 5' AGAACCCTTAACCCATCTGC 3'	62	306
11 A	F: 5' TTGTCAGATTTAACTTTTGTGAG 3' R: 5' CAAGTGGACATCTTCTTTCAG 3'	63-56/56	342	18 A	F: 5' TCAGTTTATTTCTCAGTTATTCAGTG 3' R: 5' GCATCCACCCTATCTGAAGTTC 3'	62	298
11 B	F: 5' GCTCAAGAAGCATGTCATGG 3' R: 5' TATGAAGACCAACAGAGTAGGT 3'	63-56/56	394	18 B	F: 5' GTTTCTGACATAAATTCATGAGC 3' R: 5' AAACCTTAACTGCTGAAGAAATGC 3'	62	420
11 C	F: 5' GAAAGAAAGTGTCCAGTTG 3' R: 5' ACCACAGTCTCAATAGAACAAGG 3'	63-56/56	360	19	F: 5' CTTATTACTGTCTTACTAATCTTCT 3' R: 5' GACCAGAACTCCATCTCAAC 3'	64	389
11 D	F: 5' TAGTCACAAGTTCCTCAACGA 3' R: 5' TGAGACCATTTGATCAGACG 3'	63-56/56	709	20	F: 5' GTGATCCACTAATCTCAGCCTC 3' R: 5' GTCCCTTGTGCTATCTTTGTCT 3'	66	451
11 E	F: 5' TGATTGATGGTACTTTAATTTGTAC 3' R: 5' AGCCAAGACCTCTTTTATATCTG 3'	63-56/56	338	21	F: 5' GGTGTTTATGCTTGTCTG 3' R: 5' CATTTCAACATATCTTCTCTG 3'	58	303
11 F	F: 5' AAGCTGATCTCTGTCATGCTG 3' R: 5' GATTTGTGTTTGTGTTGAATGTACC 3'	63-56/56	458	22	F: 5' AACACACCCTTAAGATGAGC 3' R: 5' GGCAATTAGTAGGATTTTGC 3'	62	455
11 G	F: 5' AAAATACATGAGAGTAGCATCACC 3' R: 5' AAATCTTTTAAATGACACTTGG 3'	63-56/56	330	23	F: 5' ACTCTTCCATTGCACTTTCTCA 3' R: 5' ATTTGCCAACTGATAGCTCC 3'	58	290
11 H	F: 5' CGAACCCATTTCAAGAAGCTTACCA 3' R: 5' TGTAATCATTTTCTTCTTG 3'	63-56/56	215	24	F: 5' GCAGCGACAAAAAACTCA 3' R: 5' ATTTGCCAACTGATAGCTCC 3'	64	365
11 I	F: 5' TTGTTTATGTTCTTGACAGAGAG 3' R: 5' CTTTGTGCTAGGTGTTAAATATGG 3'	63-56/56	487	25	F: 5' GCTTTGCCAAATTCAGCTA 3' R: 5' TACCAAAATGTGTGATGTC 3'	58	427
11 J	F: 5' TGCAATTAGATCAAGAAAGACTG 3' R: 5' CCTAAACCCACTTCAATTTTCATC 3'	63-56/56	500	26	F: 5' GTCCCAAACTTTTCAATTCGTC 3' R: 5' GGAGCCACATAACAACACA 3'	64	379
11 K	F: 5' TGAATCACTGCCATCAAAATCTAA 3' R: 5' GAAATTAACGGAGGTTGCTGG 3'	63-56/56	465	27 A	F: 5' CTGTGTGTAATTTGCGTGTCT 3' R: 5' GCAAGTCTTCAGTCAAGCTATG 3'	62	495
11 L	F: 5' AATGACTACTGGCACTTTTGTG 3' R: 5' CACTTGCAGTCTGAAAAAATGTATC 3'	63-56/56	401	27 B	F: 5' GAATCTCTCAGTACTGACTCA 3' R: 5' TCTTGTCTCAATGTGCAACA 3'	62	417

F = senso (forward) e R = antisenso (reverse)

Anexo F. Primers utilizados no sequenciamento de Sanger para confirmação da mutação somática observada no sequenciamento do exoma e análise de *PIK3CA*

Gene	Primer	°C anelamento	NM	Tamanho pb
<i>C2orf57</i>	F: CCTGCAGACTTGGTTCTTCC R: GGACCACACCAGGATGTCTG	62	152614	205
<i>FAM96A</i>	F: CTGGAAGTGGTCTCGGAAAG R: AGTCGCCAAAGAGCAATGAG	60	1289108	108
<i>GRHL2</i>	F: TGACCTCCATTCAATACCC R: CAGCACTGTCTCATCACCA	60	24915	128
<i>IL22</i>	F: tgctcaatgtccagaccctta R: caggtggaagggaacagaa	60	20525	219
<i>MTHFD2</i>	F: TGGCTGCGACTTCTCTAATG R: ggagatgttcgggaaggact	60	6636	209
<i>OSR2</i>	F: attgaaaagggtgcagtgt R: CAGATCACAGTTTCGCCTGA	60	1286841	203
<i>PIK3CA</i>	F: GGGAAAAATATGACAAAGAAAGC R: CTGAGATCAGCCAAATTCAGTT	62	6218	220
<i>PIK3CA</i>	F: CTCAATGATGCTTGGCTCTG R: TGAATCCAGAGTGAGCTTTC	62	6218	198
<i>POC5</i>	F: tgcttcaactccactcattgc R: GGGTGTGAGCTGATCTGGTT	60	1099271	242
<i>PRKAR1A</i>	F: AGTACCGCCGCCAGTGAG R: tcacaatcacctcatcatctcc	62	1276290	203
<i>SEMA6D</i>	F: gtgttcttggttctgctctgg R: cttacCATGGCAGTCCCCTA	60	20858	150
<i>TP53</i>	F: agagacgacagggtggtg R: cttaacccctcctcccagag	60	546	216
<i>TTC21B</i>	F: AGATGCAGTTCCTGCACAGA R: tctgaggaaattagaagacatctgg	60	24753	200

F, forward; R, reverse; pb, pares de base.

Anexo G. Características clínico patológicas, sequenciamento e MLPA dos genes BRCA1 e BRCA2, história familiar, tipo de tumor das pacientes jovens

ID	Idade Diag.	Tipo Histol.	Grau Histol.	Marcadores %				Subtipo Molecular	Est.	Seq.		MLPA	BOADICEA %		HF	Tumor	Análise Tumor	% cél. tum.	Nanodrop		
				ER	PR	HER2	Ki67			B1	B2		B1	B2					ng/µl	260/280	260/230
401	24	CDI	2	60	80	Neg.	35	Luminal B	II	Neg.	Neg.	Neg.	3,4	13	Sim	Fresco	Exoma	80	90.6	1.85	2.15
402	27	CLI	2	40	60	Neg.	30	Luminal B	III	Neg.	Neg.	Neg.	1,6	5,8	Lim.	Fresco	Exoma	70	104.4	1.80	1.96
403	32	CDI	2	Neg.	Neg.	Neg.	20	TN	III	Neg.	Neg.	Neg.	24,7	2,2	Sim	Fresco	PIK3CA	80	98.6	1.98	2.02
404	28	CDI	3	60	60	Neg.	50	Luminal B	III	Neg.	Neg.	Neg.	1,5	5,6	Lim.	Fresco	Exoma	75	193.9	1.84	2.03
406	33	CDI	2	50	40	Neg.	10	Luminal A	I	Neg.	Neg.	Neg.	1,2	4,5	Não	Fresco	Exoma	90	233.0	1.82	1.99
409	34	CDI	2	30	20	Neg.	90	Luminal B	III	Neg.	Neg.	Neg.	0,2	1,2	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
411	33	CLI	3	Neg.	<1	Neg.	50	Luminal B	III	Neg.	Pos.	ND	60,4	40,1	Sim	Fresco	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
413	35	CDI	3	70	<5	Neg.	35	Luminal B	III	Neg.	Neg.	Neg.	0,1	0,8	Sim	Fresco	Exoma	95	131.1	1.83	2.04
415	32	CDI	2	70	30	Neg.	40	Luminal B	IV	Neg.	Neg.	Neg.	0,9	3,5	Não	Fresco	Exoma	70	172.0	1.75	1.39
416	27	CDI	2	90	20	Neg.	20	Luminal B	II	Neg.	Neg.	Neg.	1,2	4,7	Não	Fresco	Exoma	65	284.1	1.83	1.77
417	32	CDI	2	90	90	Neg.	5	Luminal A	I	Neg.	Neg.	Neg.	2,9	7,6	Sim	Fresco	Exoma	95	155.4	1.80	1.85
418	32	CDI	2	100	60	Neg.	70	Luminal B	II	Neg.	Neg.	Neg.	0,7	0,3	Não	Fresco	PIK3CA	75	73.0	1.89	1.32
419	35	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	40	TN	II	Neg.	Neg.	Neg.	8,7	1,6	Sim	Fresco	PIK3CA	90	97.1	1.68	1.02
450	27	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	30	TN	III	Neg.	Neg.	Neg.	33,9	0,8	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
451	33	CDI	2	70	70	Neg.	20	Luminal B	II	Neg.	Neg.	Neg.	0,7	3	Sim	Parafina	PIK3CA	90	171.7	1.83	2.08
452	34	CDI	3	66	10	Pos	55	Luminal B	I	Neg.	Neg.	Neg.	0,3	1,3	Lim.	Parafina	PIK3CA	80	73.6	1.97	0.21
453	29	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	40	TN	I	Neg.	Neg.	Neg.	7,3	1,2	Lim.	Parafina	PIK3CA	90	268.2	1.78	2.14
454	34	Outros	1	10	Neg.	Neg.	ND	Luminal	II	Neg.	Neg.	Neg.	1	3	Não	Parafina	PIK3CA	70	4.0	4.8	0.06
455	28	CDI	3	100	100	Pos	70	Luminal B	II	Neg.	Neg.	Neg.	4,1	0,8	Lim.	Parafina	PIK3CA	80	63.6	1.84	1.58
456	35	CDI	2	100	80	Neg.	18	Luminal B	II	Neg.	Neg.	Neg.	0,6	2,2	Lim.	Parafina	PIK3CA	90	19.7	2.18	0.39
457	33	CDI	2	90	Neg.	Neg.	22	Luminal B	I	Neg.	Neg.	Neg.	0,4	1,9	Não	Parafina	PIK3CA	60	36.7	1.80	0.91

continua

continuação

ID	Idade Diag.	Tipo Histol.	Grau Histol.	Marcadores %				Subtipo Molecular	Est.	Seq.		MLPA	BOADICEA %		HF	Tumor	Análise Tumor	% cél. tum.	Nanodrop		
				ER	PR	HER2	Ki67			B1	B2		B1	B2					ng/µl	260/280	260/230
458	34	Outros	3	Pos.	Pos.	Neg.	ND	Luminal	0	Neg.	Neg.	Neg.	0,2	1,4	Não	Parafina	PIK3CA	70	969.1	1.93	2.05
459	27	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	65	TN	II	Neg.	Neg.	Neg.	5,5	1	Não	Parafina	PIK3CA	70	31.6	1.73	0.75
460	34	CDI	1	Pos.	Pos.	Neg.	ND	Luminal	I	Neg.	Neg.	Neg.	1,1	4,6	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
461	34	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	40	TN	II	Pos.	Neg.	ND	83	12,2	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
463	28	CDI	3	50	70	Neg.	40	Luminal B	III	Neg.	Neg.	Neg.	0,9	4,3	Lim.	Parafina	PIK3CA	60	43.7	1.84	1.11
464	32	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	30	TN	III	Neg.	Neg.	Neg.	33,8	5	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
465	33	CDI	2	66	33	Neg.	38	Luminal B	III	Neg.	Pos.	ND	0,4	2,6	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
466	31	CDI	3	Neg.	1	Neg.	30	Luminal B	III	Pos.	Neg.	ND	19,8	4,8	Sim	Parafina	PIK3CA	40	32.1	1.91	1.34
467	34	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	30	TN	II	Pos.	Neg.	ND	3,7	0,8	Não	Parafina	PIK3CA	70	149.2	1.83	1.95
468	33	CDI	1	95	95	Neg.	1	Luminal A	ND	Neg.	Neg.	Neg.	1,2	1,2	Não	Parafina	PIK3CA	60	20.4	1.92	1.79
469	34	CDI	3	Pos.	Pos.	Neg.	ND	Luminal	I	Neg.	Neg.	Neg.	0,4	1,9	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
470	35	CDI	3	Pos.	Pos.	Pos.	ND	Luminal	III	Neg.	Neg.	Neg.	2,6	0,6	Não	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
471	32	CDI	3	Neg.	Neg.	Pos.	30	HER2	II	Neg.	Neg.	Neg.	1,7	1,1	Sim	Parafina	PIK3CA	100	131.3	1.84	1.97
472	32	CDI	2	90	40	Neg.	40	Luminal B	III	Neg.	Neg.	Neg.	0,3	1,5	Lim.	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
473	34	CDI	3	50	50	Neg.	30	Luminal B	II	Neg.	Pos.	ND	0,6	2,5	Lim.	Parafina	PIK3CA	70	121.6	1.84	1.15
474	35	CDI	2	Neg.	Neg.	Pos.	ND	HER2	II	Neg.	Pos.	ND	1,9	0,8	Lim.	Parafina	PIK3CA	70	25.8	1.89	1.60
475	30	CDI	2	Neg.	Neg.	Neg.	50	TN	III	Neg.	Neg.	Neg.	11	1,8	Sim	Parafina	PIK3CA	30	32.5	1.86	0.65
476	35	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	60	TN	III	Neg.	Neg.	Neg.	9,9	1,8	Lim.	Parafina	PIK3CA	100	18.7	2.70	0.12
477	27	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	35	TN	ND	Neg.	Neg.	Neg.	8,4	1,6	Lim.	Parafina	PIK3CA	90	51.2	1.75	1.12
478	29	CDI	3	Neg.	Neg.	Pos.	40	HER2	III	Neg.	Neg.	Neg.	2	1	Sim	Parafina	PIK3CA	50	24.8	1.97	0.98
479	31	CDI	2	40	70	Neg.	20	Luminal B	I	Neg.	Neg.	Neg.	0,9	3,4	Não	Parafina	PIK3CA	80	35.9	1.66	0.91
480	31	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	70	TN	II	Neg.	Neg.	Neg.	7,3	1,5	Não	Parafina	PIK3CA	30	18.4	2.34	0.25

continua

continuação

ID	Idade Diag.	Tipo Histol.	Grau Histol.	Marcadores %				Subtipo Molecular	Est.	Seq.		MLPA	BOADICEA %		HF	Tumor	Análise Tumor	% cél. tum.	Nanodrop		
				ER	PR	HER2	Ki67			B1	B2		B1	B2					ng/µl	260/280	260/230
481	29	CDI	2	70	30	Pos.	15	Luminal B	I	Neg.	Neg.	Neg.	7,2	88,9	Sim	Parafina	PIK3CA	70	6.3	4.06	1.49
482	32	CDI	2	10	15	Neg.	16	Luminal B	II	Neg.	Neg.	Neg.	1,1	4,3	Lim.	Parafina	PIK3CA	80	77.9	1.81	1.55
483	35	CDI	3	Neg.	1	Neg.	70	Luminal B	II	Neg.	Neg.	Neg.	3,4	1,5	Sim	Parafina	PIK3CA	70	46.6	1.80	1.23
484	35	CDI	2	100	80	Neg.	10	Luminal A	II	Neg.	Neg.	Neg.	0,6	2,5	Não	Parafina	PIK3CA	90	62.9	1.85	1.22
485	35	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	80	TN	III	Neg.	Neg.	Neg.	6,4	1,1	Não	Parafina	PIK3CA	90	38.1	1.96	0.41
486	32	CDI	3	66	66	Neg.	30	Luminal B	II	Neg.	Pos.	ND	0,8	2,4	Não	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
487	35	Outros	2	66	33	Pos.	20	Luminal B	III	Neg.	Neg.	Neg.	0,6	2,9	Não	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
488	35	Outros	2	Neg.	Neg.	Pos.	ND	HER2	ND	Neg.	Neg.	Neg.	0,5	0,3	Lim.	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
489	30	CDI	3	Neg.	Neg.	Pos.	30	HER2	III	ND	ND	ND	5	1	Lim.	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
490	29	CDI	3	50	20	Neg.	ND	Luminal	II	Neg.	Neg.	Neg.	0,8	3,3	Não	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
491	30	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	ND	TN	II	Neg.	Neg.	Neg.	8,5	2,2	Não	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
492	34	Outros	ND	Pos.	Pos.	Neg.	≤14	Luminal A	0	ND	ND	ND	1,9	1,6	Lim.	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
493	33	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	>14	TN	III	Neg.	Neg.	Neg.	9,7	1,7	Não	Parafina	PIK3CA	40	21.7	1.92	1.34
494	32	CDI	2	Pos.	Pos.	Pos.	>14	Luminal B	IV	Neg.	Neg.	Neg.	0,2	1,7	Não	Parafina	PIK3CA	80	3.7	3.87	0.29
495	31	CDI	3	Pos.	Pos.	Neg.	>14	Luminal B	ND	Neg.	Neg.	Neg.	13,1	43,3	Não	Parafina	PIK3CA	60	20.8	1.99	1.87
496	24	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	>14	TN	IIIB	Neg.	Neg.	Neg.	6,6	1,3	Não	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
497	34	CDI	2	Pos.	Pos.	Neg.	>14	Luminal B	IIIB	Neg.	Neg.	Neg.	0,6	3,7	Sim	Parafina	PIK3CA	40	17.3	2.03	1.09
498	24	CDI	2	Pos.	Pos.	Neg.	≤14	Luminal A	III	Neg.	Neg.	Neg.	1	4,8	Não	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
499	29	CDI	2	Pos.	Pos.	Neg.	>14	Luminal B	III	Neg.	Neg.	Neg.	1	4	Não	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
500	32	CDI	2	Neg.	Neg.	Neg.	ND	TN	III	Neg.	Neg.	Neg.	6,8	1,2	Não	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
501	29	CDI	ND	Neg.	Pos.	Pos.	ND	Luminal	IV	ND	ND	ND	1,4	0,6	Não	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND

continua

conclusão																					
ID	Idade Diag.	Tipo Histol.	Grau Histol.	Marcadores %				Subtipo Molecular	Est.	Seq.		MLPA	BOADICEA %		HF	Tumor	Análise Tumor	% cél. tum.	Nanodrop		
				ER	PR	HER2	Ki67			B1	B2		B1	B2					ng/µl	260/280	260/230
502	31	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	ND	TN	III	Neg.	Neg.	Neg.	0,6	0,2	Não	Parafina	PIK3CA	60	38.8	1.68	1.35
503	35	CDI	2	Neg.	Neg.	Pos.	>14	HER2	II	Neg.	Neg.	Neg.	0,8	0,4	Lim.	Parafina	PIK3CA	60	63.2	2.02	1.49
504	35	CDI	2	Pos.	Pos.	Neg.	>14	Luminal B	IIIA	Neg.	Neg.	Neg.	0,5	2,3	Não	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
505	26	CDI	2	Pos.	Pos.	Neg.	ND	Luminal	II	Neg.	Neg.	Neg.	0,6	3,1	Não	Parafina	PIK3CA	60	94.6	1.83	1.32
506	23	Outros	ND	Neg.	Neg.	ND	30	ND	ND	Neg.	Neg.	Neg.	3,3	4,8	Sim	Parafina	PIK3CA	70	9.3	1.88	0.48
507	32	CDI	2	100	80	Neg.	20	Luminal B	ND	Neg.	Neg.	Neg.	2,7	2,8	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
508	32	CDI	2	Pos.	Pos.	Pos.	50	HER2	ND	Neg.	Neg.	Neg.	15,3	15,2	Sim	Parafina	PIK3CA	70	25.0	2.02	1.53
509	31	CDI	3	Pos.	Pos.	Neg.	ND	Luminal	0	Neg.	Pos.	ND	19,2	32,7	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
510	28	CLI	3	Neg.	Neg.	Neg.	ND	TN	III	ND	ND	ND	6,5	1	Não	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
511	28	CDI	3	Pos.	Pos.	Neg.	ND	Luminal	ND	Neg.	Neg.	Neg.	4,4	16,3	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
512	31	CDI	2	Pos.	Pos.	Pos.	>14	Luminal B	III	Neg.	Pos.	ND	0,3	1,8	Não	Parafina	PIK3CA	70	37.2	1.83	0.91
513	33	CDI	2	Pos.	Pos.	Neg.	>14	Luminal B	III	Neg.	Neg.	Neg.	0,5	2,2	Não	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
514	33	CDI	3	Neg.	Neg.	Pos.	>14	HER2	III	Neg.	Neg.	Neg.	1,2	0,6	Lim.	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
516	32	CDI	3	Pos.	Pos.	Neg.	>14	Luminal B	I	Neg.	Pos.	ND	31,9	42	Sim	Parafina	PIK3CA	70	52.8	1.94	1.60
517	25	CDI	3	Pos.	Pos.	Neg.	ND	Luminal	III	Neg.	Neg.	Neg.	1,9	8,1	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
518	31	CDI	2	Pos.	Pos.	Neg.	>14	Luminal B	II	Neg.	Neg.	Neg.	9	4,8	Sim	Parafina	PIK3CA	80	166.9	1.88	1.62
519	25	CDI	2	66	30	Neg.	>14	Luminal B	III	Neg.	Pos.	ND	1,2	12,3	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
520	22	CDI	ND	Neg.	Neg.	Neg.	ND	TN	ND	Pos.	Neg.	ND	7,9	1,7	Lim.	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
521	32	CDI	2	90	90	Neg.	10%	Luminal A	II	Neg.	Neg.	Neg.	3,3	5,1	Não	Parafina	PIK3CA	80	118.5	1.68	1.63

ID: identificação paciente; Diag., diagnóstico; Histol., histológico; CDI: carcinoma ductal invasivo; CLI: carcinoma lobular invasivo; ND: não determinado; TN, triplo negativo; Est, estadiamento; Seq, Sequenciamento; B1, BRCA1; B2, BRCA2; HF, história familiar; Lim, limitada; cél, células; tum, tumores.

Anexo H - Heredograma das pacientes carreadoras de mutação deletéria nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* e eletroferograma das mutações.

A paciente 461 teve diagnóstico de carcinoma ductal invasivo aos 34 anos e relatou história familiar positiva, pois sua irmã teve câncer de mama aos 29 e 40 anos e sua mãe câncer de mama aos 54 e 59 anos. A probabilidade de mutação deletéria por meio do BOADICEA foi de 83% no gene *BRCA1* (Anexo G). Esta paciente é portadora da mutação deletéria c.66_67insA (185insA), no qual, ocorre a inserção da adenina no códon 22 localizado no exon 2 do gene *BRCA1*. Esta inserção resultará em um *stop* códon prematuro no códon 40 (Tabela 12).

Heredograma da paciente 461. Portadora da mutação c.66_67insA (185insA). Observa-se que dois parentes de 1º grau tiveram câncer de mama e faleceram devido à doença

Eletoferograma da alteração *Frameshift* c.66_67insA (185insA). Observa-se sobreposições dos picos após a inserção de uma adenina (seta)

A paciente 467 teve diagnóstico de carcinoma ductal invasivo aos 34 anos e relatou história familiar negativa de câncer. A probabilidade de mutação deletória por meio do BOADICEA foi de 3,7% no gene *BRCA1* (Anexo G). Esta paciente é portadora da mutação deletória c.3331_3334delCAAG (3450del4), onde ocorre a deleção dos nucleotídeos CAAG no códon 1111 localizando no exon 11 do gene *BRCA1*. Esta deleção resultará em um *stop* códon prematuro no códon 1115 (Tabela 12).

Heredograma da paciente 467. Portadora da mutação c.3331_3334delCAAG (3450del4). Nenhum familiar desta paciente foi acometido com câncer

Eletroferograma da alteração *Frameshift* c.3331_3334delCAAG (3450del4). A deleção de CAAG provoca um erro de leitura evidenciado pela sobreposição dos picos

A paciente 520 teve diagnóstico de carcinoma ductal invasivo aos 22 anos e relatou história familiar limitada. A probabilidade de mutação deletéria por meio do BOADICEA foi de 7,9% no gene *BRCA1* (Anexo G). Esta paciente é portadora da mutação deletéria c.5263_5264insC (5382insC), onde ocorre a deleção da citosina no códon 1755 localizando no exon 20 do gene *BRCA1*. Esta deleção resultará em um *stop* códon prematuro no códon 1829 (Tabela 12).

Heredograma da paciente 520. Portadora da mutação c.5263_5264insC (5382insC). Nenhum familiar desta paciente foi acometido com câncer

Eletroferograma da alteração *Frameshift* c.5263_5264insC (5382insC). A inserção de uma citosina provoca um erro de leitura evidenciado pela sobreposição dos picos

A paciente 474 teve diagnóstico de carcinoma ductal invasivo aos 35 anos e relatou história familiar limitada. A probabilidade de mutação deletéria por meio do BOADICEA foi de 0,8% no gene *BRCA2* (Anexo G). Esta paciente é portadora da mutação deletéria c.1138_1138delA (1366delA), no qual ocorre a deleção de uma adenina localizado no códon 380 do exon 10 do gene *BRCA2*. Esta deleção resultará em um *stop* códon prematuro no códon 398 (Tabela 13).

Heredograma da paciente 474. Portadora da mutação c.1138_1138delA (1366delA), com histórico familiar limitado. A paciente desconhece os demais membros da família

Eletroferograma da alteração *Frameshift* c.1138_1138delA (1366delA). Observa-se sobreposições dos picos após a deleção de uma adenina

A paciente 411 teve diagnóstico de carcinoma lobular invasivo aos 33 anos e relatou história familiar positiva, no qual, há vários membros da família afetados com câncer de mama, inclusive um indivíduo do sexo masculino. A probabilidade de mutação deletéria por meio do BOADICEA foi de 40,1% no gene *BRCA2* (Anexo G). Esta paciente é portadora da mutação deletéria c.2808_2811delACAA (3036delACAA), onde ocorre a deleção dos nucleotídeos ACAA no códon 936 localizado no exon 11 do gene *BRCA2*. Esta deleção resultará em um *stop* códon prematuro no códon 959 (Tabela 13).

Heredograma da paciente 411. Portadora da mutação c.2808_2811delACAA (3036delACAA). Inúmeros membros da família foram acometidos com câncer de mama, inclusive indivíduo do sexo masculino

Eletoferograma da alteração *Frameshift* c.2808_2811delACAA (3036del ACAA). A deleção de ACAA provoca um erro de leitura evidenciado pela sobreposição dos picos

Outra paciente com esta mesma alteração foi a 512, no qual teve diagnóstico de carcinoma ductal invasivo aos 31 anos e não tem história familiar de câncer segundo os critérios do NCCN. A probabilidade de mutação deletéria por meio do BOADICEA foi de 1,8% no gene *BRCA2* (Anexo G).

Heredograma da paciente 512. Portadora da mutação c.2808_2811delACAA (3036delACAA). Esta paciente teve apenas um parente distante com câncer de mama aos 59 anos

A paciente 519 teve diagnóstico de carcinoma ductal invasivo aos 25 anos e relatou história familiar positiva, pois sua mãe teve câncer de mama aos 50 anos e uma tia avó câncer de mama aos 41 anos. A probabilidade de mutação deletéria por meio do BOADICEA foi de 12,3% no gene *BRCA2* (Anexo G). Esta paciente é portadora da mutação deletéria c.3956_3959delATGA (4184del4), onde ocorre a deleção dos nucleotídeos ATGA no códon 1319 localizado no exon 11 do gene *BRCA2*. Esta deleção resultará em um *stop* códon prematuro no códon 1334 (Tabela 13).

Heredograma da paciente 519. Portadora da mutação c.3956_3959delATGA (4184del4). A mãe teve câncer de mama aos 50 anos e uma tia avó aos 41 anos

Eletoferograma da alteração *Frameshift* c.3956_3959delATGA (4184del4). A deleção de ATGA provoca um erro de leitura evidenciado pela sobreposição dos picos

A paciente 473 teve diagnóstico de carcinoma ductal invasivo aos 34 anos e relatou história familiar limitada. A probabilidade de mutação deletéria por meio do BOADICEA foi de 2,5% no gene *BRCA2* (Anexo G). Esta paciente é portadora da mutação deletéria c.6990_6994delTACCT (7218del5), onde ocorre a deleção dos nucleotídeos TACCT no códon 2330 localizado no exon 13 do gene *BRCA2*. Esta deleção resultará em um *stop* códon prematuro no códon 2337 (Tabela 13).

Heredograma da paciente 473. Portadora da mutação c.6990_6994delTACCT (7218del5). Esta paciente desconhece todos seus parentes do lado paterno e nenhum dos parentes conhecidos tiveram câncer

Eletroferograma da alteração *Frameshift* c.6990_6994delTACCT (7218del5). A deleção de TACCT provoca um erro de leitura evidenciado pela sobreposição dos picos

A paciente 466 teve diagnóstico de carcinoma ductal invasivo aos 31 anos e relatou história familiar positiva, sua mãe teve câncer de mama aos 55 anos e um tio avô câncer de próstata aos 65 anos. A probabilidade de mutação deletéria por meio do BOADICEA foi de 19,8% no gene *BRCA1* (Anexo G). Esta paciente é portadora da mutação deletéria missense c.211A>G (R71G), no qual, ocorre a substituição dos aminoácidos arginina por glicina, no códon 71 localizado no exon 5 do gene *BRCA1* (Tabela 12).

Heredograma da paciente 466. Portadora da mutação c.211A>G (R71G). Sua mãe teve câncer de mama aos 55 anos e um tio avô câncer de próstata aos 65 anos

Eletroferograma da alteração missense c.211A>G (R71G). Observa-se a substituição de uma adenina por uma guanina (seta)

A paciente 516 teve diagnóstico de carcinoma ductal invasivo bilateral aos 32 e 36 anos e relatou história familiar positiva, pois um tio teve câncer de pâncreas aos 40 anos e uma tia faleceu de câncer de mama aos 48 anos. A probabilidade de mutação deletéria por meio do BOADICEA foi de 42% no gene *BRCA2* (Anexo G). Esta paciente é portadora da mutação deletéria missense c.9154C>T (R3052W), no qual, ocorre a substituição dos aminoácidos arginina por triptofano, no códon 3052 localizado no exon 24 do gene *BRCA2* (Tabela 13).

Heredograma da paciente 516. Portadora da mutação c.9154C>T (R3052W). A paciente teve câncer de mama bilateral (32 e 36 anos), teve uma tia que faleceu por câncer de mama ao 48 e um tio com câncer de pâncreas aos 40 anos

Eletoferograma da alteração missense c.9154C>T (R3052W). Observa-se a substituição de uma citosina por uma timina (seta)

A paciente 509 teve diagnóstico de carcinoma ductal invasivo aos 31 anos e relatou história familiar positiva, pois sua irmã teve câncer de mama aos 32 anos e sua prima câncer de mama aos 34 anos. A probabilidade de mutação deletéria por meio do BOADICEA foi de 32,7% no gene *BRCA2* (Anexo G). Esta paciente é portadora da mutação deletéria c.483T>A (C161X), no qual, gera um *stop* códon no aminoácido 161 localizado no exon 6 do gene *BRCA2*. Esta alteração não foi descrita em nenhum banco de dados analisados (Tabela 13).

Heredograma da paciente 509. Portadora da mutação c.483T>A (C161X). A paciente teve uma irmã câncer de mama aos 32 anos e uma prima aos 34 anos

Eletoferograma da alteração nonsense c.483T>A (C161X). Observa-se a substituição de uma timina por uma adenina (seta)

A paciente 486 teve diagnóstico de carcinoma ductal invasivo aos 32 anos e não tem história familiar de câncer de mama e/ou ovário. A probabilidade de mutação deletéria por meio do BOADICEA foi de 2,4% no gene *BRCA2* (Anexo G). Esta paciente é portadora da mutação deletéria c.6656C>G (S2219X), no qual, gera um *stop* códon no aminoácido 2219 presente no exon 11 do gene *BRCA2* (Tabela 13).

Heredograma da paciente 486. Portadora da mutação c.6656C>G (S2219X). História familiar negativa, nenhum familiar acometido com câncer de mama e/ou ovário

Eletroferograma da alteração nonsense c.6656C>G (S2219X). Observa-se a substituição de uma citosina por uma guanina (seta)

A paciente 465 teve diagnóstico de carcinoma ductal invasivo aos 33 anos e relatou história familiar positiva, pois teve uma tia com câncer de mama aos 65-70 anos. A probabilidade de mutação deletéria por meio do BOADICEA foi de 2,6% no gene *BRCA2* (Anexo G). Esta paciente é portadora da mutação deletéria c.9382C>T (R3128X), onde, é responsável em gerar um *stop* códon no aminoácido 3128 presente no exon 25 do gene *BRCA2* (Tabela 13).

Heredograma da paciente 465. Portadora da mutação c.9382C>T (R3128X). Observa-se que uma tia (parente de 2º grau) teve câncer de mama bilateral (65 e 70 anos)

Eletroferograma da alteração nonsense c.9382C>T (R3128X). Observa-se a substituição de uma citosina por uma timina (seta)

Anexo I - Alterações detectadas no gene *BRCA1*, por paciente

<i>BRCA1</i>	401	402	403	404	406	409	411
Exon 2							
Exon 3							
Exon 5							
Exon 6							
Exon 7	c.441+36del14	c.441+51delT	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+36del14
Exon 9	c.548-58_548-58delT			c.548-58_548-58delT	c.548-58_548-58delT	c.548-58_548-58delT	c.548-58_548-58delT
Exon 10							
Exon 11	c.2077G>A c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3119G>A c.3548A>G		c.2082C>T c.2612C>T c.2458A>G c.3548A>G	c.2077G>A c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2077G>A c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2077G>A c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G
Exon 13	c.4308T>C			c.4308T>C	c.4308T>C	c.4308T>C	c.4308T>C
Exon 14							
Exon 15	c.4485-64C>G		c.4485-64C>G	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G
Exon 16	c.4837A>G		c.4837A>G	c.4837A>G	c.4837A>G	c.4837A>G	c.4837A>G
Exon 17	c.4987-92A>G c.4987-68A>G		c.4987-92A>G c.4987-68A>G	c.4987-92A>G c.4987-68A>G	c.4987-92A>G c.4987-68A>G	c.4987-92A>G c.4987-68A>G	c.4987-92A>G c.4987-68A>G
Exon 18	c.5152+66G>A		c.5152+66G>A	c.5152+66G>A c.5075-53C>T	c.5152+66G>A	c.5152+66G>A	
Exon 20							
Exon 21							
Exon 22							
Exon 23							
Exon 24			c.5592+36C>G				

<i>BRCA1</i>	413	415	416	417	418	419	450
Exon 2							
Exon 3							
Exon 5							
Exon 6							
Exon 7	c.441+51delT	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+51delT	c.441+36del14	c.441+51delT	c.441+36del14
Exon 9		c.548-64_548-64delT	c.548-64_548-64delT				c.548-64_548-64delT
Exon 10							
Exon 11	c.2612C>T	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G		c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2612C>T	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G
Exon 13		c.4308T>C	c.4308T>C		c.4308T>C		c.4308T>C
Exon 14							
Exon 15		c.4485-64C>G	c.4485-64C>G		c.4485-64C>G		c.4485-64C>G
Exon 16		c.4837A>G	c.4837A>G		c.4837A>G		c.4837A>G
Exon 17		5106-68A>G 5106-92A>G	5106-68A>G 5106-92A>G		5106-68A>G 5106-92A>G		5106-68A>G 5106-92A>G
Exon 18		c.5152+66G>A	c.5152+66G>A		c.5152+66G>A	c.5152+85_5152 +85delT	c.5152+66G>A
Exon 20							
Exon 21							
Exon 22							
Exon 23							
Exon 24							

BRCA1	451	452	453	454	455	456	457
Exon 2							
Exon 3							
Exon 5							
Exon 6							
Exon 7	c.441+51delT	c.441+36delI4	c.441+51delT	c.441+36delI4	c.441+36delI4	c.441+36delI4	c.441+36delI4
Exon 9		c.548-58_548-58delT		c.548-58_548-58delT	c.548-58_548-58delT	c.548-58_548-58delT	
Exon 10							
Exon 11		c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3119G>A c.3548A>G		c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2077G>A c.2082C>T c.2311T>C c.2458A>G c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.1846_1848delTCT c.2082C>T c.2458A>G c.2612C>T c.2814A>G c.3548A>G
Exon 13		c.4308T>C		c.4308T>C	c.4308T>C	c.4308T>C	
Exon 14							
Exon 15		c.4485-64C>G		c.4485-64C>G	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G
Exon 16		c.4837A>G		c.4837A>G	c.4837A>G	c.4837A>G	c.4837A>G
Exon 17		c.4987-92A>G c.4987-68A>G		c.4987-92A>G c.4987-68A>G	c.4987-92A>G c.4987-68A>G	c.4987-92A>G c.4987-68A>G	c.4987-92A>G c.4987-68A>G
Exon 18		c.5152+66G>A		c.5152+66G>A	c.5152+66G>A	c.5152+66G>A c.5152+85_5152+85delT	c.5152+66G>A
Exon 20							
Exon 21							
Exon 22							
Exon 23							
Exon 24							c.5592+36C>G

BRCA1	458	459	460	461	463	464	465
Exon 2				c.66_67insA			
Exon 3							
Exon 5							
Exon 6							
Exon 7	c.441+36del14	c.441+51delT	c.441+51delT	c.441+51delT	c.441+36del14	c.441+51delT	c.441+51delT
Exon 9	c.548-58_548-58delT				c.548-58_548-58delT		
Exon 10							
Exon 11	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.1067A>G		c.2612C>T	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2612C>T	c.1067A>G
Exon 13	c.4308T>C c.4347A>G				c.4308T>C		
Exon 14							
Exon 15	c.4485-64C>G				c.4485-64C>G		
Exon 16	c.4837A>G				c.4837A>G		
Exon 17	c.4987-92A>G c.4987-68A>G				c.4987-92A>G c.4987-68A>G		
Exon 18	c.5152+66G>A			c.5152+85_5152 +85delT	c.5152+66G>A		
Exon 20							
Exon 21							
Exon 22							
Exon 23						c.5425_5430delGTTGTG	
Exon 24							

<i>BRCA1</i>	466	467	468	469	470	471	472
Exon 2							
Exon 3					c.114G>A		
Exon 5	c.211A>G						
Exon 6							
Exon 7	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+51delT	c.441+51delT	c.441+51delT	c.441+36del14	c.441+36del14
Exon 9	c.548-57_548-57delT					c.548-58_548-58delT	c.548-58_548-58delT
Exon 10							
Exon 11	c.2077G>A c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.3331_3334delCAAG	c.3119G>A	c.2612C>T		c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G
Exon 13	c.4308T>C					c.4308T>C	c.4308T>C
Exon 14							
Exon 15	c.4485-64C>G					c.4485-64C>G	c.4485-64C>G
Exon 16	c.4837A>G					c.4837A>G	c.4837A>G
Exon 17	c.4987-92A>G c.4987-68A>G					c.4987-92A>G c.4987-68A>G	c.4987-92A>G c.4987-68A>G
Exon 18	c.5152+66G>A c.5075-53C>T					c.5152+66G>A	c.5152+66G>A
Exon 20							
Exon 21							
Exon 22							
Exon 23							
Exon 24							

BRCA1	473	474	475	476	477	478	479
Exon 2							
Exon 3							
Exon 5							
Exon 6							
Exon 7	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+51delT	c.441+51delT	c.441+51delT
Exon 9			c.548-58_548-58delT	c.548-58_548-57delT		c.548-58_548-58delT	
Exon 10							c.594-67G>T
Exon 11	c.2077G>A c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2077G>A c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2612C>T	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.1971A>G c.2612C>T
Exon 13	c.4308T>C	c.4308T>C	c.4308T>C	c.4308T>C		c.4308T>C	
Exon 14							
Exon 15	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G		c.4485-64C>G	
Exon 16	c.4837A>G	c.4837A>G	c.4837A>G	c.4837A>G		c.4837A>G	
Exon 17	c.4987-92A>G c.4987-68A>G	c.4987-92A>G c.4987-68A>G	c.4987-92A>G c.4987-68A>G	c.4987-92A>G c.4987-68A>G		c.4987-92A>G c.4987-68A>G	
Exon 18	c.5152+66G>A c.5075-53C>T	c.5152+66G>A	c.5152+66G>A	c.5152+66G>A			
Exon 20							
Exon 21							
Exon 22							
Exon 23							
Exon 24							

<i>BRCA1</i>	480	481	482	483	484	485	486
Exon 2							
Exon 3		c.81-65G>C					
Exon 5							
Exon 6				c.301+12A>C			
Exon 7	c.441+51delT	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+51delT	c.441+51delT	c.441+51delT	c.441+51delT
Exon 9		c.548-58_548-58delT	c.548-58_548-58delT				
Exon 10							
Exon 11	c.1067A>G	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3418A>G c.3548A>G	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.1067A>G	c.2612C>T c.3418A>G		c.1067A>G
Exon 13		c.4308T>C	c.4308T>C				
Exon 14							
Exon 15		c.4485-64C>G	c.4485-64C>G				
Exon 16		c.4837A>G	c.4837A>G				
Exon 17		c.4987-92A>G c.4987-68A>G	c.4987-92A>G c.4987-68A>G		c.4987-20A>G		
Exon 18		c.5152+66G>A	c.5152+66G>A		c.5152+66G>A		
Exon 20							
Exon 21							
Exon 22							
Exon 23							
Exon 24							

<i>BRCA1</i>	487	488	490	491	493	494	495
Exon 2							
Exon 3							
Exon 5							
Exon 6							
Exon 7	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+51delT	c.441+51delT	c.441+51delT	c.441+36del14
Exon 9	c.548-58_548-58delT	c.548-64_548-64delT	c.548-64_548-64delT				c.548-64_548-64delT
Exon 10							
Exon 11	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G		c.2612C>T	c.2612C>T c.3113A>G	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G
Exon 13	c.4308T>C	c.4308T>C	c.4308T>C				c.4308T>C
Exon 14							
Exon 15	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G				c.4485-64C>G
Exon 16	c.4837A>G c.4956G>A	c.4837A>G	c.4837A>G				c.4837A>G
Exon 17	c.4987-92A>G c.4987-68A>G	5106-68A>G 5106-92A>G	5106-68A>G 5106-92A>G				5106-68A>G 5106-92A>G
Exon 18	c.5152+66G>A	c.5152+66G>A	c.5152+66G>A				c.5152+66G>A
Exon 20							
Exon 21							
Exon 22							
Exon 23							
Exon 24	c.5485G>A						

<i>BRCA1</i>	496	497	498	499	500	502	503
Exon 2							
Exon 3							
Exon 5							
Exon 6							
Exon 7	c.441+51delT	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+51delT	c.441+51delT	c.441+51delT	c.441+51delT
Exon 9	c.591C>T	c.548-64_548-64delT	c.548-64_548-64delT				
Exon 10							
Exon 11		c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.1997T>C c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2612C>T			c.1067A>G c.2612C>T
Exon 13	c.4308T>C	c.4308T>C	c.4308T>C				
Exon 14							
Exon 15		c.4485-64C>G	c.4485-64C>G				
Exon 16		c.4837A>G	c.4837A>G				
Exon 17		5106-68A>G 5106-92A>G	5106-68A>G 5106-92A>G				
Exon 18				c.5152+85_5152 +85delT			
Exon 20							
Exon 21							
Exon 22							
Exon 23							
Exon 24							

<i>BRCA1</i>	504	505	506	507	508	509	511
Exon 2							
Exon 3							
Exon 5							
Exon 6							
Exon 7	c.441+36del14	c.441+51delT	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+51delT
Exon 9				c.548-64_548-64delT	c.548-64_548-64delT		c.548-80T>C
Exon 10							
Exon 11	c.2082C>T c.2458A>G c.2612C>T c.3548A>G	c.2612C>T	c.2077G>A c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.1067A>G c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2082C>T c.2612C>T
Exon 13			c.4308T>C	c.4308T>C	c.4308T>C	c.4308T>C	
Exon 14						c.4484+14A>G	
Exon 15	c.4485-64C>G		c.4485-64C>G	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G	
Exon 16	c.4837A>G		c.4837A>G	c.4837A>G	c.4837A>G	c.4837A>G	
Exon 17	5106-68A>G 5106-92A>G		5106-68A>G 5106-92A>G		5106-68A>G 5106-92A>G	5106-68A>G 5106-92A>G	
Exon 18	c.5152+66G>A		c.5152+66G>A	c.5152+66G>A	c.5152+66G>A	c.5152+66G>A	
Exon 20							
Exon 21							
Exon 22						c.5406+33A>T	
Exon 23							
Exon 24							

<i>BRCA1</i>	512	513	514	516	517	518	519
Exon 2							
Exon 3							
Exon 5							
Exon 6							
Exon 7	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+36del14	c.441+51delT	c.441+36del14
Exon 9	c.548-64_548-64delT	c.548-64_548-64delT	c.548-64_548-64delT		c.548-64_548-64delT		c.548-64_548-64delT
Exon 10							
Exon 11	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.1067A>G c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.1067A>G c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G	c.2612C>T c.3119G>A c.3739G>A	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G
Exon 13	c.4308T>C	c.4308T>C	c.4308T>C	c.4308T>C		c.4308T>C	c.4308T>C F
Exon 14							
Exon 15	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G	c.4485-64C>G		c.4485-64C>G
Exon 16	c.4837A>G	c.4837A>G	c.4837A>G	c.4837A>G	c.4837A>G		c.4837A>G
Exon 17	5106-68A>G 5106-92A>G	5106-68A>G 5106-92A>G	5106-68A>G 5106-92A>G	5106-68A>G 5106-92A>G	5106-68A>G 5106-92A>G		5106-68A>G 5106-92A>G
Exon 18	c.5152+66G>A	c.5152+66G>A	c.5152+66G>A	c.5152+66G>A	c.5152+66G>A		c.5152+66G>A
Exon 20							
Exon 21							
Exon 22							
Exon 23							
Exon 24							

<i>BRCA1</i>	520	521
Exon 2	c.21C>T	
Exon 3		
Exon 5		
Exon 6		
Exon 7	c.441+51delT	c.441+36del14
Exon 9		c.548-64_548-64delT
Exon 10		
Exon 11	c.2612C>T	c.2082C>T c.2311T>C c.2612C>T c.3113A>G c.3548A>G
Exon 13		c.4308T>C F
Exon 14		
Exon 15		c.4485-64C>G
Exon 16		c.4837A>G
Exon 17		5106-68A>G 5106-92A>G
Exon 18		c.5152+66G>A
Exon 20	c.5263_5264insC	
Exon 21		
Exon 22		
Exon 23		
Exon 24		

Anexo J - Alterações detectadas no gene *BRCA2*, por paciente

BRCA2	401	402	403	404	406	409	411
Exon 2		c.-26G>A			c.-26G>A		
Exon 3							c.125A>G
Exons 5 + 6							
Exon 7							
Exon 8							
Exon 10	c.1114C>A		c.1114C>A	c.865A>C c.1365A>G		c.865A>C c.1114C>A c.1365A>G	
Exon 11	c.4563G>A c.6513C>G	c.3396A>G c.4258G>T c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.4563G>A c.6513C>G	c.2229T>C c.2971A>G c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G	c.3396A>G c.3807T>C c.4248A>G c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.2229T>C c.2971A>G c.4563G>A c.6513C>G	c.2808_2811delACAA c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G
Exon 12							
Exon 13							
Exon 14	c.7397C>T	c.7397C>T	c.7397C>T	c.7397C>T c.7435+53C>T	c.7242A>G c.7397C>T	c.7397C>T	c.7397C>T
Exon 15							
Exon 16							
Exon 17		c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C
Exon 18							
Exon 19		c.8487+19A>G					
Exon 20							
Exon 22			c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C
Exon 24							
Exon 25							
Exon 26							
Exon 27							c.10110G>A

BRCA2	413	415	416	417	418	419	450
Exon 2				c.-26G>A	c.-26G>A	c.-26G>A	
Exon 3				c.68-38A>C	c.68-38A>C		c.68-38A>C
Exons 5 + 6	c.516+22A>T						
Exon 7							
Exon 8	c.681+56C>T	c.681+56C>T	c.681+56C>T		c.681+56C>T		c.681+56C>T
Exon 10		c.1114A>C				c.1105A>G	
Exon 11	c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.4563A>G c.6513G>C	c.3807T>C c.4563A>G c.6513G>C	c.3396A>G c.3807T>C c.4563A>G c.5744C>T c.6513G>C c.6841+80_6841 +83delTTAA	c.3396A>G c.4563A>G c.6513G>C c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3396A>G c.4563A>G c.6513G>C c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3234T>C c.3264T>C c.4563A>G c.6513G>C
Exon 12							
Exon 13							
Exon 14	c.7242A>G c.7397C>T	c.7397T>C	c.7397T>C	c.7242A>G c.7397C>T	c.7242A>G c.7397C>T	c.7397T>C	c.7017G>C c.7319A>G c.7397T>C
Exon 15		c.7469T>C					
Exon 16							
Exon 17	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C
Exon 18							
Exon 19							
Exon 20							
Exon 22	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C
Exon 24							
Exon 25						c.9257-83G>A	
Exon 26	c.9648+106_9648 +106delT						
Exon 27							c.9730G>A

BRCA2	451	452	453	454	455	456	457
Exon 2	c.-26G>A	c.-26G>A				c.-26G>A	
Exon 3							
Exons 5 + 6							
Exon 7			c.517-4C>G				
Exon 8		c.681+56C>T					
Exon 10							
Exon 11	c.3396A>G c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.2837A>G c.3396A>G c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3349A>G c.3807T>C c.4563G>A c.5414A>G c.6412G>T c.6513C>G	c.3396A>G c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G	c.2971A>G c.3396A>G c.4241C>T c.4563G>A c.5704G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G
Exon 12			c.6842-73T>A				
Exon 13							
Exon 14	c.7242A>G c.7397C>T	c.7242A>G c.7397C>T c.7418G>A	c.7397C>T	c.7242A>G c.7397C>T	c.7397C>T	c.7242A>G c.7397C>T	c.7397C>T
Exon 15							
Exon 16							
Exon 17	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C		c.7806-14T>C	
Exon 18			c.8092G>A				
Exon 19		c.8332-66T>C			c.8487+47C>T		
Exon 20						c.8488-52A>G	
Exon 22	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C c.8755-50A>G		c.8755-66T>C		c.8755-66T>C	
Exon 24							
Exon 25							
Exon 26			c.9648+54G>A				
Exon 27							

BRCA2	458	459	460	461	463	464	465
Exon 2	c.-26G>A	c.-26G>A			c.-11C>T	c.-26G>A	
Exon 3							
Exons 5 + 6							
Exon 7							
Exon 8	c.681+56C>T		c.681+56C>T		c.681+56C>T		
Exon 10	c.1114C>A c.1365A>G	c.1114C>A		c.1114C>A	c.1114C>A		
Exon 11	c.3396A>G c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3396A>G c.4563G>A c.5744C>T c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.4563G>A c.6513C>G	c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G	c.4090A>C c.4563G>A c.6513C>G	c.3396A>G c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.4563G>A c.6513C>G
Exon 12							
Exon 13							
Exon 14	c.7242A>G c.7397C>T	c.7242A>G c.7397C>T	c.7397C>T	c.7397C>T	c.7397C>T	c.7242A>G c.7397C>T	c.7397C>T
Exon 15					c.7469T>C		c.7469T>C
Exon 16							
Exon 17	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C		c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	
Exon 18							
Exon 19							
Exon 20							
Exon 22	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C		c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	
Exon 24							
Exon 25							c.9382C>T
Exon 26			c.9648+41T>A				
Exon 27							

BRCA2	466	467	468	469	470	471	472
Exon 2		c.-26G>A	c.-26G>A		c.-26G>A	c.-26G>A	
Exon 3							
Exons 5 + 6							
Exon 7							
Exon 8			c.681+56C>T	c.681+56C>T		c.681+56C>T	c.681+56C>T
Exon 10	c.1114C>A						
Exon 11	c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G	c.3396A>G c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3396A>G c.4563G>A c.5744C>T c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.4563G>A c.6513C>G c.6554C>T	c.3396A>G c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3396A>G c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.4563G>A c.6513C>G
Exon 12							
Exon 13							
Exon 14	c.7397C>T	c.7397C>T	c.7242A>G c.7397C>T	c.7397C>T	c.7242A>G c.7397C>T	c.7242A>G c.7397C>T	c.7397C>T
Exon 15							
Exon 16							
Exon 17			c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C
Exon 18							
Exon 19							
Exon 20							
Exon 22			c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C
Exon 24							
Exon 25					c.9257-83G>A		
Exon 26							
Exon 27					c.10362A>C		

BRCA2	473	474	475	476	477	478	479
Exon 2	c.-26G>A		c.-26G>A				
Exon 3							
Exons 5 + 6					c.516+22A>T		
Exon 7							
Exon 8		c.681+56C>T		c.681+56C>T	c.681+56C>T		
Exon 10	c.865A>C c.1114C>A c.1365A>G	c.1138_1138delA		c.1114C>A		c.865A>C c.1365A>G	
Exon 11	c.2229T>C c.2971A>G c.4563G>A c.6513C>G	c.4563G>A c.6513C>G	c.3396A>G c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.4563G>A c.6513C>G	c.4563G>A c.6513C>G	c.2229T>C c.2971A>G c.3396A>G c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G
Exon 12							
Exon 13	c.6990_6994delTACCT						
Exon 14	c.7397C>T c.7435+53C>T	c.7397C>T	c.7242A>G c.7397C>T	c.7397C>T	c.7397C>T	c.7397C>T c.7435+53C>T	c.7397C>T
Exon 15							
Exon 16							
Exon 17	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	
Exon 18							
Exon 19							
Exon 20							
Exon 22	c.8755-66T>C c.8851G>A	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C c.8851G>A	
Exon 24							
Exon 25							c.9257-83G>A
Exon 26					c.9648+106_9648+106delT		
Exon 27							c.10362A>C

BRCA2	480	481	482	483	484	485	486
Exon 2							c.-26G>A
Exon 3							
Exons 5 + 6							
Exon 7							
Exon 8				c.681+56C>T			
Exon 10	c.865A>C c.1114C>A c.1365A>G	c.865A>C c.1114C>A c.1365A>G			c.1114C>A c.1275A>G	c.1114C>A	
Exon 11	c.2229T>C c.2971A>G c.4563G>A c.5096A>G c.6513C>G	c.2229T>C c.2971A>G c.4563G>A c.6513C>G	c.3396A>G c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3396A>G c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.4563G>A c.6323G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3396A>G c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3396A>G c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G c.6656C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA
Exon 12							
Exon 13							
Exon 14	c.7397C>T c.7435+53C>T	c.7397C>T c.7435+53C>T	c.7242A>G c.7397C>T	c.7242A>G c.7397C>T	c.7397C>T c.7435+53C>T	c.7242A>G c.7397C>T	c.7397C>T
Exon 15							
Exon 16							
Exon 17	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C		c.7806-14T>C	c.7806-14T>C
Exon 18							
Exon 19							
Exon 20							
Exon 22	c.8755-66T>C c.8851G>A	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C		c.8755-66T>C	
Exon 24							
Exon 25			c.9257-83G>A				
Exon 26							
Exon 27			c.10362A>C				

BRCA2	487	488	490	491	493	494	495
Exon 2	c.-26G>A				c.-26G>A	c.-26G>A	c.-26G>A
Exon 3		c.68-38A>C	c.68-38A>C	c.68-38A>C		c.68-38A>C	c.68-38A>C
Exons 5 + 6							
Exon 7							
Exon 8	c.681+56C>T						
Exon 10			c.865A>C c.1114A>C c.1365A>G	c.1114A>C			c.1114A>C
Exon 11	c.3396A>G c.4563G>A c.6220C>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G	c.2229T>C c.2971A>G c.4563G>A c.6513C>G	c.4563G>A c.6513C>G	c.3396A>G c.4563G>A c.4681C>A c.6412G>T c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3396A>G c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3396A>G c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA
Exon 12					c.6842-73T>A		
Exon 13							
Exon 14	c.7242A>G c.7397C>T	c.7397T>C	c.7397T>C c.7435+53C>T	c.7397T>C	c.7242A>G c.7397C>T	c.7242A>G c.7397C>T	c.7397T>C
Exon 15							
Exon 16					c.7805+6C>G		
Exon 17		c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C
Exon 18							
Exon 19							
Exon 20							
Exon 22	c.8755-66T>C		c.8755-66T>C c.8851G>A	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	
Exon 24							
Exon 25						c.9257-83G>A	
Exon 26							
Exon 27						c.10362A>C	

BRCA2	496	497	498	499	500	502	503
Exon 2		c.-26G>A		c.-26G>A			
Exon 3	c.68-38A>C	c.68-38A>C		c.68-38A>C	c.68-38A>C	c.68-38A>C	c.68-38A>C
Exons 5 + 6							
Exon 7							
Exon 8		c.681+56C>T	c.681+56C>T		c.681+56C>T	c.681+56C>T	
Exon 10	c.1114A>C					c.865A>C c.1365A>G	c.865A>C c.1365A>G
Exon 11	c.2786T>C c.2960A>T c.3807T>C c.4563G>A c.6078A>C c.6513C>G	c.3396A>G c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.4563G>A c.6513C>G	c.3396A>G c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.4563G>A c.6513C>G	c.2229T>C c.2971A>G c.4563G>A c.6513C>G	c.2229T>C c.2971A>G c.3807T>C c.4187A>G c.4414A>G c.4563G>A c.6513C>G
Exon 12							
Exon 13							
Exon 14	c.7397T>C	c.7242A>G c.7397T>C	c.7397T>C	c.7397T>C	c.7397T>C	c.7397T>C c.7435+53C>T	c.7397T>C c.7435+53C>T
Exon 15							
Exon 16							
Exon 17		c.7806-14T>C	c.7806-14T>C		c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C
Exon 18							
Exon 19							
Exon 20							
Exon 22		c.8755-66T>C	c.8755-66T>C		c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C
Exon 24							
Exon 25	c.9257-83G>A						c.9257-83G>A
Exon 26							
Exon 27	c.10362A>C	c.9649-68G>A				83897A>C	c.10362A>C

BRCA2	504	505	506	507	508	509	511
Exon 2	c.-26G>A			c.-26G>A			
Exon 3	c.68-38A>C	c.68-38A>C	c.68-38A>C	c.68-38A>C	c.68-38A>C	c.68-38A>C	c.68-38A>C
Exons 5 + 6						c.483T>A	
Exon 7							
Exon 8			c.681+56C>T				c.681+56C>T
Exon 10	c.1114A>C	c.1114A>C		c.1114A>C	c.1114A>C		c.1114A>C
Exon 11	c.3396A>G c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.4563G>A c.6513C>G	c.4563G>A c.6513C>G	c.3396A>G c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.4563G>A c.6513C>G	c.3396A>G c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G
Exon 12							
Exon 13							
Exon 14	c.7397T>C	c.7397T>C	c.7397T>C	c.7242A>G c.7397T>C	c.7397T>C	c.7242A>G c.7397T>C	c.7397T>C
Exon 15							
Exon 16							
Exon 17			c.7806-14T>C	c.7806-14T>C		c.7806-14T>C	c.7806-14T>C
Exon 18							
Exon 19							c.8487+47C>T
Exon 20							
Exon 22			c.8755-66T>C	c.8755-66T>C		c.8755-66T>C	c.8755-66T>C
Exon 24							
Exon 25		c.9257-83G>A					
Exon 26							
Exon 27		c.10362A>C					

BRCA2	512	513	514	516	517	518	519
Exon 2			c.-26G>A			c.-26G>A	
Exon 3	c.68-38A>C		c.68-38A>C	c.68-38A>C			c.68-38A>C
Exons 5 + 6							
Exon 7							
Exon 8	c.681+56C>T	c.681+56C>T			c.681+56C>T		
Exon 10			c.1114A>C				c.1114A>C
Exon 11	c.2808_2811delACAA c.4563G>A c.6513C>G	c.4563G>A c.6513C>G	c.3396A>G c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G	c.3807T>C c.4563G>A c.6513C>G	c.3396A>G c.4563G>A c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3956_3959delATGA c.4563G>A c.6513C>G
Exon 12							
Exon 13							
Exon 14	c.7397T>C	c.7397T>C	c.7242A>G c.7397T>C	c.7397T>C	c.7397T>C	c.7242A>G c.7397T>C	c.7397T>C
Exon 15			c.7469T>C				
Exon 16							
Exon 17	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C		c.7806-14T>C	c.7806-14T>C	
Exon 18							
Exon 19							
Exon 20							
Exon 22	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C		c.8755-66T>C	c.8755-66T>C	
Exon 24				c.9154C>T			
Exon 25							
Exon 26							
Exon 27							

BRCA2	520	521
Exon 2	c.-26G>A	
Exon 3	c.68-38A>C	
Exons 5 + 6	R	
Exon 7		
Exon 8		
Exon 10	c.865A>C c.1365A>G	c.1114A>C
Exon 11	c.2229T>C c.2971A>G c.3396A>G c.4563G>A c.5744C>T c.6513C>G c.6841+80_6841+83 delTTAA	c.3910A>T c.4563G>A c.6513C>G
Exon 12		
Exon 13		
Exon 14	c.7242A>G c.7397T>C c.7435+53C>T	c.7397T>C
Exon 15		
Exon 16		
Exon 17	c.7806-14T>C	c.7806-14T>C
Exon 18		
Exon 19		
Exon 20		
Exon 22	c.8755-66T>C	c.8755-66T>C
Exon 24		
Exon 25		
Exon 26		
Exon 27		

Anexo K. Características clínico patológicas, história familiar, tipo de tumor das pacientes idosas

ID	Idade Diag.	Tipo Histol.	Grau Histol.	Marcadores%				Subtipo Molecular	Est.	HF	Tumor	Análise Tumor	%cél tum	Nanodrop		
				ER	PR	Her2	Ki67							ng/μl	260/280	260/230
1	71	CDI	2	100	80	Neg.	25	Luminal B	III	Sim	Parafina	PIK3CA	60	53.0	1.65	1.50
2	80	CDI	2	80	80	Neg.	30	Luminal B	ND	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
3	66	CDI	1	95	80	Neg.	15	Luminal B	II	Sim	Parafina	PIK3CA	70	42.8	2.38	1.10
4	61	CDI	2	95	Neg.	Neg.	20	Luminal B	II	Sim	Parafina	PIK3CA	50	62.7	2.01	1.90
5	61	CDI	2	100	100	Neg.	12	Luminal A	II	Não	Parafina	PIK3CA	70	24.8	1.42	0.79
6	74	CDI	1	100	100	Neg.	10	Luminal A	I	Sim	Parafina	PIK3CA	60	112.1	2.02	1.83
7	66	CDI	2	60	66	Neg.	30	Luminal B	I	Sim	Parafina	PIK3CA	60	25.4	2.10	0.78
8	61	CDI	2	Pos.	Pos.	Neg.	30	Luminal B	III	Sim	Parafina	PIK3CA	60	24.5	2.09	0.72
9	73	CDI	2	100	100	Neg.	ND	Luminal	I	Sim	Parafina	PIK3CA	80	5.0	4.56	0.10
10	57	CDI	ND	90	70	Neg.	ND	Luminal	I	Sim	Parafina	PIK3CA	60	23.4	2.06	0.76
11	73	CDI	2	95	Neg.	Neg.	15	Luminal B	II	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
12	73	CDI	3	100	5	Neg.	ND	Luminal	I	Sim	Parafina	PIK3CA	70	40.9	1.82	0.58
13	59	CDI	1	Neg.	Neg.	Pos.	ND	HER 2	III	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
14	62	CDI	2	90	70	Neg.	ND	Luminal	II	Sim	Parafina	PIK3CA	70	224.5	1.92	1.45
16	60	CDI	1	90	100	Neg.	8	Luminal A	II	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
17	56	CDI	3	Pos.	Pos.	Neg.	80	Luminal B	III	Sim	Parafina	PIK3CA	70	12.7	1.80	3.35
18	56	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	30	TN	I	Sim	Parafina	PIK3CA	30	4.6	1.79	0.24
19	63	CDI	2	10	Neg.	Neg.	20	Luminal B	I	Sim	Parafina	PIK3CA	60	46.0	1.88	1.97
20	65	CDI	2	50	Neg.	Neg.	30	Luminal B	II	Sim	Parafina	PIK3CA	70	20.1	2.20	0.40
21	67	CDI	1	100	100	Neg.	30	Luminal B	II	Sim	Parafina	PIK3CA	80	54.1	1.94	0.91
22	56	CDI	2	66	1	Neg.	30	Luminal B	II	Sim	Parafina	PIK3CA	90	29.8	1.94	1.35
23	62	CDI	2	95	1	Neg.	18	Luminal B	I	Sim	Parafina	PIK3CA	70	16.7	1.77	2.25
24	76	CDI	3	Neg.	Neg.	Pos.	40	HER2	III	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND

continua

continuação

ID	Idade Diag.	Tipo Histol.	Grau Histol.	Marcadores%				Subtipo Molecular	Est.	HF	Tumor	Análise Tumor	%cél tum	Nanodrop		
				ER	PR	Her2	Ki67							ng/μl	260/280	260/230
25	60	CDI	2	Neg.	Neg.	Neg.	65	TN	III	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
26	60	CDI	2	Pos.	Neg.	Neg.	30	Luminal B	II	Sim	Parafina	PIK3CA	70	331.6	1.87	1.82
27	56	CDI	2	Pos.	Pos.	Neg.	30	Luminal B	I	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
28	63	CDI	2	66	66	Neg.	30	Luminal B	I	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
29	58	CDI	2	Neg.	Neg.	Neg.	33	TN	III	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
30	62	CDI	1	100	Neg.	Neg.	5	Luminal A	III	Sim	Parafina	PIK3CA	70	27.6	1.90	0.41
31	60	CDI	2	66	66	Neg.	30	Luminal B	II	Sim	Parafina	PIK3CA	70	67.0	1.85	0.79
32	56	CDI	1	90	70	Neg.	10	Luminal A	I	Sim	Parafina	PIK3CA	70	95.1	1.46	0.71
33	55	CDI	1	Neg.	Neg.	Neg.	ND	TN	I	Não	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
34	61	CDI	2	95	15	Neg.	20	Luminal B	II	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
35	68	CDI	2	66	66	Neg.	10	Luminal A	II	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
36	63	CDI	1	90	80	Neg.	10	Luminal A	I	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
37	62	CDI	2	95	10	Pos.	30	Luminal B	I	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
38	59	CDI	2	40	75	Neg.	20	Luminal B	I	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
39	63	CDI	2	100	100	Neg.	13	Luminal A	II	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
40	63	CDI	2	100	30	Pos.	20	Luminal B	III	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
41	62	CDI	2	Pos.	Pos.	Pos.	ND	Luminal	II	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
42	77	CDI	3	Neg.	Neg.	Pos.	70	HER2	III	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
43	65	CDI	2	>50	>50	Neg.	5-30	Luminal B	II	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
44	56	CDI	3	90	Neg.	Neg.	30-40	Luminal B	II	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
45	64	CDI	2	Pos.	Pos.	Neg.	ND	Luminal	II	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
46	55	CDI	2	Neg.	Neg.	Pos.	10	HER2	III	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND
47	58	CDI	3	Neg.	Neg.	Neg.	70	TN	III	Sim	Nenhum	Nenhuma	ND	ND	ND	ND

continua

ID: identificação paciente; Diag., diagnóstico; Histol., histológico; CDI: carcinoma ductal invasivo; ND: não determinado; TN, triplo negativo; Est, estadiamento; HF, história familiar; cél, células; tum, tumorais.

ID: identificação paciente; Diag., diagnóstico; Histol., histológico; CDI: carcinoma ductal invasivo; ND: não determinado; TN, triplo negativo; Est, estadiamento; HF, história familiar; cél, células; tum, tumorais.

Anexo L. Manuscrito 1**Somatic Mutations in Breast and Serous Ovarian Cancer Young Patients:
Systematic Review and Meta-Analysis**Giselly Encinas¹Simone Maistro¹⁻²Fátima Solange Pasini¹⁻²Maria Lucia Hirata Katayama¹Maria Mitzi Brentani¹Geertruida Hendrika de Bock³Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira¹

1. Departamento de Radiologia e Oncologia, Disciplina de Oncologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.
2. Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, SP, Brazil.
3. Department of Epidemiology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, The Netherlands.

Corresponding author:

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira

Associate Professor

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Departamento de Radiologia, Disciplina de Oncologia

Av. Dr. Arnaldo, 455 – sala 4115

01246-903, Sao Paulo, SP, Brasil

Phone: 55 11 30617165 - FAX: 55 11 30826580

e-mail: makoike@lim24.fm.usp.br

Abstract

Objective: Our aim was to evaluate whether somatic mutations in five genes were associated with an early age at presentation of breast cancer (BC) or serous ovarian cancer (SOC).

Methods: COSMIC database was searched for the five most frequent somatic mutations in BC and SOC. A systematic review of Pubmed was performed. Young age for BC and SOC patients was set at ≤ 35 and ≤ 40 years, respectively. Age groups were also classified in < 30 years and every 10 years thereafter.

Results: Twenty six (1980 patients, 111 younger) and 16 studies (598, 41 younger), were analyzed for BC and SOC, respectively. In BC, tumor *PIK3CA* wild type was associated with early onset, not confirmed in binary regression with ER status. In HER2 negative tumors, there was increased frequency of *PIK3CA* somatic mutation in later age groups; in ER positive tumors, there was a trend towards an increased frequency of *PIK3CA* somatic mutation in older age groups. *TP53* somatic mutation was described in 20% of tumors from both younger and older patients; *PTEN*, *CDH1* and *GATA3* somatic mutation was investigated only in 16 patients and *PTEN* mutation was detected in one of them. In SOC, *TP53* somatic mutation was rather common, detected in more than 50% of tumors, however, more frequently in older patients.

Conclusion: Frequency of somatic mutations in specific genes was not associated with early-onset breast cancer. Although very common in patients with serous ovarian cancer diagnosed at all ages, *TP53* mutation was more frequently detected in older women.

Keywords: Somatic mutation, young patients, breast cancer, serous ovarian cancer

Introduction

The probability of being diagnosed with an invasive cancer increases with age. In breast cancer, the incidence goes from 1.9%, in women below 50 years, to 2.3%, 3.5%, 6.7% in women categorized within the age groups of 50 to 59, 60 to 69 and 70 and over, respectively.¹ Age-specific incidence rates for epithelial ovarian cancer (per 100,000 women) also increases with advancing age varying from 12.51, 41.96 and 54.95 in the age groups of 40-44; 60-64 and 75-79 years old.² One reason for the

increased incidence rate of cancer at later ages is that carcinogenesis is a continuous process associated with the accumulation of genetic and epigenetic damage to the DNA, that takes place along a lifetime.³

Although breast cancer is the first leading cause of cancer deaths in females aged 20 to 59, in adolescents and younger adults, aged 15-39 years, there is still a paucity of information, concerning cancer incidence and behavior. In this age group, breast cancer is the most common type of cancer, responsible for 14% of the cancer cases.^{1,4} Younger age has been associated with a less favorable prognosis, which might be in part due to a lower proportion of luminal A and higher proportion of triple negative and high grade tumors.⁵ However, molecular studies have also suggested that breast cancer in young patients may be characterized by unique disease biology, as compared to older patients, beyond subtype distribution.⁶

One of the predisposing factors for breast cancer is germLine mutation in tumor suppressor genes as *BRCA1/2*, and in younger patients its frequency may be as high as 10.9% to 23%, as reported in women from different countries.⁷⁻¹²

Another cancer associated with *BRCA1/2* germLine mutation is epithelial ovarian cancer, where prevalence of the mutation in unselected patients is higher than in breast cancer, varying from 8-13%.¹³ In this cancer, a high prevalence (24%) was described in women diagnosed in their forties with a lower prevalence in younger women in their thirties (11%).¹⁴ Epithelial ovarian cancer is not common in women below 40 years and young age has been reported as a favorable prognostic factor. In analogy with older ovarian cancer patients, serous ovarian cancer is the most frequent histology in young women ≤ 40 years, but in contrast, low tumor grade is more common in this age group.¹⁵

However, *BRCA1/2* germLine mutation does not explain breast or epithelial ovarian cancer development in the majority of cases. A large number of cancer somatic alterations were recently characterized, most of which deposited in COSMIC (Catalogue of Somatic Mutation in Cancer - <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>).¹⁶ However it is still not clear whether there might be any association between gene somatic mutations and age of diagnosis. Hence, we performed a systematic analysis and meta-analysis to evaluate a possible

association between somatic alterations in specific genes in breast and serous ovarian cancer samples and age at cancer diagnosis.

Methods

- **Study eligibility and identification:**

At first, COSMIC database was searched for the identification of five of the genes most frequently mutated (somatic mutations) in breast cancer, which were *PIK3CA* (25%), *TP53* (23%), *CDH1* (11%), *GATA3* (7%) and *PTEN* (5%). Search strategy was: breast tissue, subtissue (all), cancer histology, subhistology (all). Date References shown in COSMIC for these selected genes were reviewed. The search was performed on October 2013.

A literature search through PubMed database followed, to ensure that studies including somatic alterations in these specific genes in breast cancer were not missed. PubMed was searched for using the key words specified: breast neoplasms[MeSH Terms] AND "somatic"[All Fields] AND ("2003/10/13"[PDat] : "2015/02/11"[PDat] AND "humans"[MeSH Terms]) and (breast neoplasm [MeSH Terms]) AND "somatic" AND "PIK3CA"; followed by TP53; P53; CDH1; GATA3 and PTEN.

After consulting COSMIC and PubMed, a total of 821 unique articles were identified. After exclusions, which were mainly due to lack of individual data for age or gene mutation, 26 studies were selected (Table 1).

The same strategy used above was employed to analyze ovarian cancer, including identification of the five most frequently mutated genes in COSMIC, as of October 2013, were *TP53* (65%), *KRAS* (6%), *BRCA1* (4%), *NF1* (4%) and *CHEK2* (3%). Search strategy in COSMIC was: ovary tissue, subtissue (all), cancer histology and serous cancer subhistology. Only serous cancer was included due to its higher frequency and differential frequencies of somatic gene mutations detected in different histologies. Subsequently, PubMed was searched for using the key words specified: ovarian neoplasms[MeSH Terms] AND somatic[All Fields] AND ("2003/10/18"[PDat] : "2015/02/11"[PDat] AND "humans"[MeSH Terms]) and ovarian cancer (MeSH Terms) AND somatic AND TP53 followed by: P53; KRAS, BRCA1, NF1, CHK2 and

CHEK2. Among 439 unique articles, after exclusions, which were mainly due to absence of individual data for age and mutation, sixteen studies were selected (Table 1).

- **Selection and exclusion criteria for studies**

The following inclusion criteria were used for selection of the publications: (a) studies in which data was available for each individual patient, concerning age and somatic mutation; (b) studies employing whole tumor genome or exome sequencing; (c) studies evaluating mutations in the five candidate genes in tumor specimens using direct sequencing. Exclusion criteria were: (a) studies without individual data; (b) mutation analyzed only through loss of heterozygosity (LOH), Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Single-strand conformation polymorphism (SSCP) not confirmed by direct sequencing; and (c) other techniques not related with direct sequencing.

References from selected studies, reviews and meta-analysis were checked for other relevant publications. Authors of manuscripts were contacted by email for missing information, most authors replied, but only one was able to report on missing clinical data.²⁷ Almost all abstracts from studies published in other languages than English were reviewed, but neither one met the inclusion criteria.

- **Data collection**

The aim of the present study was to evaluate the rate of somatic mutations in five specific genes, disregarding the type of mutation and the number of mutations in each gene on the same sample. In case of multiple reports of the same data, only one was taken into consideration. Each abstract was reviewed by two investigators independently. In case of any disagreement, the issue was discussed with the group until a consensus was reached.

Microsoft Excel Database was assembled with included trials and reasons for exclusion of excluded trials. A second datasheet was assembled with included articles reporting each patient and mutation found: identification of patient, age, tumor histology; histological grade, stage and mutation (presence or absent). Additionally, for breast cancer patients, information about node, ER, PR and HER2, as reported by the authors, was included.

- **Data analysis**

In this work cut off ages for early age breast cancer and ovarian cancer were 35 and 40 years, respectively. Group ages were then stratified in 7 groups: (1) <30 years, (2) 30-39 years, (3) 40-49 years, (4) 50-59 years, (5) 60-69 years, (6) 70-79 years and (7) ≥ 80 years. Age groups with less than 10 patients were not taken into consideration for analysis.

Chi-square or Fisher's Exact tests were used to evaluate association between variables. Odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (95% CIs) were estimated using logistic regression. Correlation between variables was evaluated through Pearson correlation and correlation coefficients (r) are provided. P values ≤ 0.05 were considered significant. The analysis was performed using *Statistical Package for the Social Sciences* 18.0 (SPSS).

Results

A total of 1980 patients, 5.6% of whom aged less than 36 years were included in the 26 studies selected (Table 1). In these studies, data available comprehended each patient's age and specific mutations. At first, breast cancer patients were separated in two subsets: younger (≤ 35 years) vs older (>35 years). Most patients, both younger and older, were diagnosed with invasive ductal cancer (84% in both groups); however high histological grade (73% vs 46.6%; $P < 0.001$) and ER negative tumor (45.5% vs 30.6%; $P = 0.006$) as well as node positivity (63.6% vs 45.8%; $P = 0.044$) and advanced disease, clinical stage III/IV (28.8% vs 14.9%; $P = 0.003$) were mainly detected in younger patients.

PIK3CA somatic mutation was more frequently detected in tumors from older patients as compared with younger patients (≤ 35 y) (26.7% vs 6.7%; $P = 0.014$). *TP53* somatic mutation was described in similar frequencies of younger and older patients, 21.6% and 20.1% respectively. *PTEN*, *CDH1* and *GATA3* somatic mutation was investigated only in a small number of younger patients (16 patients each). *PTEN* somatic mutation was detected in 3.3% of all patients and in 1/16 younger patients. *GATA3* and *CDH1* somatic mutations were analyzed in 672 and 564 patients, respectively and detected in approximately 8% of them, none aged ≤ 35 years. *CDH1* somatic mutation was detected in almost half (47%) of the lobular cancers and median

age of patients was higher in patients harboring *CDH1* somatic mutation than in patients not harboring the mutation (62 vs 57 years; $P=0.007$, Mann Whitney test).

Each variable significantly associated with age (histological grade, node, clinical stage, ER status) was then tested concomitantly with *PIK3CA* somatic mutation in the subsets of younger and older breast cancer patients, using binary logistic regression. This analysis showed a trend towards a lower chance of ER positive tumor, in younger as compared with older patients (OR: 0.433; 95% CI: 0.181-1.036; $P=0.060$); but not for *PIK3CA* somatic mutation (OR: 0.233; 95% CI: 0.029-1.712; $P=0.149$).

An association between gene mutations and tumor subtypes was already described; hence, the whole group of patients was then tested for these associations, independent of age. *PIK3CA* somatic mutation was more frequently detected in ER positive than in ER negative tumors (28% vs 8%; $P<0.001$) and *TP53* somatic mutation was more frequently detected in ER negative (42.8% vs 10.1%; $P<0.001$) and HER2 positive tumors (27.5% vs 18.6%; $P=0.006$). Considering the whole group of patients who had both *PIK3CA* and *TP53* analyzed, only 5.5% (35/637) presented both *PIK3CA* and *TP53* somatic mutations while 49.6% (316/637) presented both *PIK3CA* wt and *TP53* wt.

Following the hypothesis that the number of somatic mutations accumulate along the lifetime,³ the next step was to evaluate *PIK3CA* and *TP53* somatic mutations according to age groups, classified in <30 years and then every 10 years. Frequency of *PIK3CA* somatic mutation increased in older age groups and reached about 30% in patients aged more than 60 years; *TP53* somatic mutation peaked in 20-30% in patients aged 30-59 years, decreasing thereafter (Figure 1).

ER and HER2 status was also determined according to age groups, as another aim was to evaluate presence of somatic mutations according to tumor characteristics (ER and HER2) in the age groups. Frequency of ER positive tumors was directly correlated with age and reached 80% in women aged 60 years or more. In contrast, frequency of HER2 positive tumors was indirectly correlated with age and maximum level, around 25%, was detected in patients aged less than 30 years (Figure 1).

Afterwards, frequency of *PIK3CA* and *TP53* somatic mutation was evaluated in ER positive/negative and HER2 positive/negative tumors, according to age groups.

There was a trend towards an increased frequency of *PIK3CA* somatic mutation in ER positive tumors, according to age groups (Figure 2). For patients aged less than 40 years, frequency of *PIK3CA* somatic mutation in ER positive tumors was low, near 10%. After this age, more than 25% of the ER positive tumors presented *PIK3CA* somatic mutation. In HER2 negative tumors, a positive correlation in frequency of *PIK3CA* somatic mutation according to age groups, was detected. No correlation was observed in frequency of *TP53* mutation according to tumor characteristics and age (Figure 2).

Among 16 studies selected in serous ovarian cancer, 598 samples were evaluated (6.8% of whom aged less than 41 years), while other histologies, comprehending 95 samples, disregarded from further analysis (Table 1). Patients were grouped in younger (≤ 40 years) and older age (>40 years), the majority of them diagnosed with advanced disease (clinical stage III/IV). High grade tumors (histological grade III) were mainly observed in older patients (88.8% vs 65%; $P < 0.001$). *TP53* somatic mutation was rather common, detected in more than 50% of tumors in both age groups, however, more frequently in older patients (86.7% vs 55.2%; $P < 0.001$). *KRAS* somatic mutation was described in less than 3% of the tumors; however, only 35 younger patients were included, among whom, one with mutation. A low frequency of somatic mutation was also observed for *BRCA1* (3.5%), *NF1* (5.5%) and *CHECK2* (0.3%), none detected in younger patients.

Frequency of *TP53* mutation was also tested in age groups, classified in <30 years and then every 10 years), and detected in more than 75% of tumors from patients aged 40 years or more. This evaluation was not performed for the other genes, due to the small number of patients available.

Discussion

We have investigated whether frequency of somatic mutations would differ in younger and older cancer patients.

At first, frequency of somatic mutations in *PIK3CA*, *TP53*, *CDH1*, *GATA3* and *PTEN* was evaluated in younger and older breast cancer patients, using a cut off of 35 years. *PIK3CA* somatic mutation was found less frequently mutated in younger (≤ 35 years) than older patients (>35 years) (6.7% vs 26.7%, respectively). In addition, an

association between *PIK3CA* somatic mutation and positive expression of ER was detected, as already reported.⁵⁹⁻⁶³ However, taking into consideration both aspects (ER expression and *PIK3CA* somatic mutation) in binary logistic regression, only OR for ER positive expression, but not for *PIK3CA* somatic mutation, was lower in younger patients.

Analyzing some other manuscripts, that were not included in the present meta-analysis (as individual age of cancer diagnosis was not available), no association between *PIK3CA* somatic mutation and age, was found. In these studies, however, a cut point was set at a higher age, 50-55 years or menopause.⁶²⁻⁶⁴ On the other hand, a trend towards association between *PIK3CA* somatic mutation in older patients was also already reported.⁶⁵

PIK3CA somatic mutation frequency was then investigated in different age groups (<30 y and then every 10 years) and a direct correlation was verified. Furthermore, a direct correlation of frequency of *PIK3CA* somatic mutation in ER positive tumors and age groups was detected, indicating that *PIK3CA* somatic mutation frequency increases in aging patients. Hence, it seems likely *PIK3CA* somatic mutation rate increases in estrogen receptor positive tumors in aging patients.

In the present analysis, *TP53* somatic mutation frequency was similar (around 20%) in both younger and older breast cancer patients. Considering frequency of *TP53* somatic mutation in the age groups, it tended to increase in the early age groups, reaching almost 30% in patients aged 40-49 years, going downwards in later age groups. In agreement, in another manuscript, which was not included in this meta-analysis due to unavailability of age for all patients, but only for *TP53* somatic mutation carriers, *TP53* somatic mutation was reported to be 17% in early onset breast cancer patients (< 37 years).⁶⁶ In addition, a fall in *TP53* somatic mutation rate in later age groups, above 59 years, was also reported in a large study.⁶⁷ Discrepancies however, evaluating *TP53* somatic mutation frequency and age were also shown, varying from no association^{68, 69} to reduced⁷⁰ or increased age⁷¹ being associated with *TP53* somatic mutation. In the present series, *TP53* somatic mutation was more frequent in ER negative tumors (41.8%), in accordance with some authors^{63, 67} but in contrast with others, that found no association.^{69, 71}

In the current analysis, *PTEN*, *CDH1* and *GATA3* somatic mutation was investigated only in a small number of younger breast cancer patients (16 patients), in whom it seemed to be very infrequent, even absent as in the case of *PTEN* and *CDH1*.

In contrast, it is interesting to observe that in another recent work, it was reported that *GATA3* somatic mutations tended to occur in tumors from patients aged ≤ 40 years, mainly in luminal-like subtype.⁷² In the present analysis, median age of patients presenting *CDH1* somatic mutation was 62 years, in accordance with another study, where mean age was 64.9 years, indicating that it is mainly detected in old age patients.⁷³

In serous ovarian cancer, *TP53* somatic mutation was rather common and mutation frequency increased with advancing age, in agreement with previous studies.⁷⁴⁻⁷⁶ In addition, *KRAS* somatic mutation rate was low ($<3\%$), also reflecting data from other authors.⁷⁷ *BRCA1* somatic mutation was detected in tumors from 3.5% of the patients, and even though no mutations were detected in younger patients, only 16 were aged less than 41 years. A similarly low *BRCA1* somatic mutation rate was also detected in another study of epithelial ovarian cancer. In that analysis all affected patients presented familial history of breast and/or ovarian cancer and tumor subtype specificity was not reported.⁷⁸

Conclusion

In breast cancer samples, there is a trend towards increasing *PIK3CA* somatic mutation rate in estrogen receptor positive tumors in aging patients. *TP53* somatic mutation peaks around 20-30% in patients aged 30-59 years, decreasing thereafter. In addition, *CDH1* somatic mutation seems to be unlikely in younger patients.

In ovarian cancer samples *TP53* somatic mutation is rather frequent, detected in more than 50% of tumors in younger and more than 75% of tumors in older patients.

Acknowledgements

The authors would like to thank Prof. Michael H. Bloch M.D., M.S., Assistant Professor at Yale Child Study Center and Assistant Director of Yale OCD Clinic, for giving a course about “Metanalysis” at Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo in 2012; Cristina Piñero Grandal, for editing the figures, Tatiane Furuya Mazzoti and Eduardo Oda, for discussions on statistical analysis.

Supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant #2012/12306-4). Giselly Encinas Zanetti received a PhD scholarship grant by São Paulo Research Foundation (FAPESP, #2011/09572-1) and Simone Maistro received a postdoctoral scholarship by CAPES Foundation (#029/2012).

References

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 2014;64(1):9-29.
2. Quirk JT, Natarajan N. Ovarian cancer incidence in the United States, 1992-1999. *Gynecol Oncol.* 2005;97(2):519-23.
3. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. The cancer genome. *Nature.* 2009;458(7239):719-24.
4. Bleyer A, Barr R, Hayes-Lattin B, Thomas D, Ellis C, Anderson B, et al. The distinctive biology of cancer in adolescents and young adults. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(4):288-98.
5. Canello G, Maisonneuve P, Mazza M, Montagna E, Rotmensz N, Viale G, et al. Pathological features and survival outcomes of very young patients with early breast cancer: how much is "very young"? *Breast.* 2013;22(6):1046-51.
6. Azim HA Jr, Michiels S, Bedard PL, Singhal SK, Criscitiello C, Ignatiadis M, et al. Elucidating prognosis and biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling. *Clin Cancer Res.* 2012;18(5):1341-51.
7. Bonadona V, Sinilnikova OM, Chopin S, Antoniou AC, Mignotte H, Mathevet P, et al. Contribution of BRCA1 and BRCA2 germ-line mutations to the incidence of breast cancer in young women: results from a prospective population-based study in France. *Genes Chromosomes Cancer.* 2005;43(4):404-13.
8. Lalloo F, Varley J, Moran A, Ellis D, O'dair L, Pharoah P, et al. BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. *Eur J Cancer.* 2006;42(8):1143-50.
9. Loizidou M, Marcou Y, Anastasiadou V, Newbold R, Hadjisavvas A, Kyriacou K. Contribution of BRCA1 and BRCA2 germLine mutations to the incidence of early-onset breast cancer in Cyprus. *Clin Genet.* 2007;71(2):165-70.
10. Figueiredo JC, Ennis M, Knight JA, McLaughlin JR, Hood N, O'Malley F, et al. Influence of young age at diagnosis and family history of breast or ovarian cancer on

breast cancer outcomes in a population-based cohort study. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;105(1):69-80.

11. Haffty BG, Choi DH, Goyal S, Silber A, Ranieri K, Matloff E, et al. Breast cancer in young women (YBC): prevalence of BRCA1/2 mutations and risk of secondary malignancies across diverse racial groups. *Ann Oncol.* 2009;20(10):1653-9.

12. Carraro DM, Koike Folgueira MA, Garcia Lisboa BC, Ribeiro Olivieri EH, Vitorino Krepschi AC, de Carvalho AF, et al. Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germLine mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. *PLoS One.* 2013;8(3):e57581.

13. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Kwan E, et al. Prevalence and penetrance of germLine BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet.* 2001;68(3):700-10.

14. Zhang S, Royer R, Li S, McLaughlin JR, Rosen B, Risch HA, et al. Frequencies of BRCA1 and BRCA2 mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2011;121(2):353-7.

15. Bozas G, Dimopoulos MA, Kastritis E, Efstathiou E, Koutsoukou V, Rodolakis A, et al. Young age is associated with favorable characteristics but is not an independent prognostic factor in patients with epithelial ovarian cancer: a single institution experience. *Oncology.* 2006;70(4):265-72.

16. Forbes SA, Bhamra G, Bamford S, Dawson E, Kok C, Clements J, et al. The Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). *Curr Protoc Hum Genet.* 2008;Chapter 10:Unit 10.11.

17. Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW, et al. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature.* 2010;464(7291):999-1005.

18. Yost SE, Smith EN, Schwab RB, Bao L, Jung H, Wang X, et al. Identification of high-confidence somatic mutations in whole genome sequence of formalin-fixed breast cancer specimens. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(14):e107.

19. Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Van Loo P, Greenman CD, Raine K, et al; Breast Cancer Working Group of the International Cancer Genome Consortium. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell*. 2012;149(5):979-93.
20. 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;486(7403):405-9.
21. Shah SP, Roth A, Goya R, Oloumi A, Ha G, Zhao Y, et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature*. 2012;486(7403):395-9.
22. 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;486(7403):400-4.
23. 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;486(7403):353-60.
24. Jiao X, Hooper SD, Djureinovic T, Larsson C, Wärnberg F, Tellgren-Roth C, et al. Gene rearrangements in hormone receptor negative breast cancers revealed by mate pair sequencing. *BMC Genomics*. 2013;14:165.
25. Craig DW, O'Shaughnessy JA, Kiefer JA, Aldrich J, Sinari S, Moses TM, et al. Genome and transcriptome sequencing in prospective metastatic triple-negative breast cancer uncovers therapeutic vulnerabilities. *Mol Cancer Ther*. 2013;12(1):104-16.
26. Benvenuti S, Frattini M, Arena S, Zanon C, Cappelletti V, Coradini D, et al. PIK3CA cancer mutations display gender and tissue specificity patterns. *Hum Mutat*. 2008;29(2):284-8.
27. Miron A, Varadi M, Carrasco D, Li H, Luongo L, Kim HJ, et al. PIK3CA mutations in in situ and invasive breast carcinomas. *Cancer Res*. 2010;70(14):5674-8.
28. Martins FC, De S, Almendro V, Gönen M, Park SY, Blum JL, et al. Evolutionary pathways in BRCA1-associated breast tumors. *Cancer Discov*. 2012;2(6):503-11.

29. Hernandez L, Wilkerson PM, Lambros MB, Campion-Flora A, Rodrigues DN, Gauthier A, et al. Genomic and mutational profiling of ductal carcinomas in situ and matched adjacent invasive breast cancers reveals intra-tumour genetic heterogeneity and clonal selection. *J Pathol.* 2012;227(1):42-52.
30. Lima EU, Soares IC, Danilovic DL, Marui S. New mutation in the PTEN gene in a Brazilian patient with Cowden's syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2012; 56(8):592-6.
31. Jong YJ, Li LH, Tsou MH, Chen YJ, Cheng SH, Wang-Wuu S, et al. Chromosomal comparative genomic hybridization abnormalities in early- and late-onset human breast cancers: correlation with disease progression and TP53 mutations. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;148(1):55-65.
32. Lavarino C, Corletto V, Mezzelani A, Della Torre G, Bartoli C, Riva C, et al. Detection of TP53 mutation, loss of heterozygosity and DNA content in fine-needle aspirates of breast carcinoma. *Br J Cancer.* 1998;77(1):125-30.
33. Wistuba II, TomLinson GE, Behrens C, Virmani A, Geradts J, Blum JL, et al. Two identical triplet sisters carrying a germLine BRCA1 gene mutation acquire very similar breast cancer somatic mutations at multiple other sites throughout the genome. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;28(4):359-69.
34. Masri MA, Abdel Seed NM, Fahal AH, Romano M, Baralle F, El Hassam AM, et al. Minor role for BRCA2 (exon11) and p53 (exon 5-9) among Sudanese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2002;71(2):145-7.
35. Lien HC, Lin CW, Mao TL, Kuo SH, Hsiao CH, Huang CS. p53 overexpression and mutation in metaplastic carcinoma of the breast: genetic evidence for a monoclonal origin of both the carcinomatous and the heterogeneous sarcomatous components. *J Pathol.* 2004;204(2):131-9.
36. Eachkoti R, Hussain I, Afroze D, Aejazaziz S, Jan M, Shah ZA, et al. BRCA1 and TP53 mutation spectrum of breast carcinoma in an ethnic population of Kashmir, an emerging high-risk area. *Cancer Lett.* 2007;248(2):308-20.
37. Vincent-Salomon A, Gruel N, Lucchesi C, MacGrogan G, Dendale R, Sigal-Zafrani B, et al. Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of

basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Res.* 2007;9(2):R24.

38. Aceto GM, Solano AR, Neuman MI, Veschi S, Morgano A, Malatesta S, et al. High-risk human papilloma virus infection, tumor pathophenotypes, and BRCA1/2 and TP53 status in juvenile breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122(3):671-83.

39. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature.* 2012;486(7403):346-52.

40. Ripamonti CB, Colombo M, Mondini P, Siranoush M, Peissel B, Bernard L, et al. First description of an acinic cell carcinoma of the breast in a BRCA1 mutation carrier: a case report. *BMC Cancer.* 2013;13:46.

41. Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2006;314(5797):268-74.

42. Ang D, VanSandt AM, Beadling C, Warrick A, West RB, Corless CL, et al. Biphasic papillary and lobular breast carcinoma with PIK3CA and IDH1 mutations. *Diagn Mol Pathol.* 2012;21(4):221-4.

43. Bell D, Berchuck A, Birrer M, Chien J, Cramer D, Dao F, et al. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011;474(7353):609-15.

44. Jones S, Wang TL, Kurman RJ, Nakayama K, Velculescu VE, Vogelstein B, et al. Low-grade serous carcinomas of the ovary contain very few point mutations. *J Pathol.* 2012;226(3):413-20.

45. Zhang J, Shi Y, Lalonde E, Li L, Cavallone L, Ferenczy A, et al. Exome profiling of primary, metastatic and recurrent ovarian carcinomas in a BRCA1-positive patient. *BMC Cancer.* 2013;13:146.

46. Bashashati A, Ha G, Tone A, Ding J, Prentice LM, Roth A, et al. Distinct evolutionary trajectories of primary high-grade serous ovarian cancers revealed through spatial mutational profiling. *J Pathol.* 2013;231(1):21-34.

47. Merajver SD, Pham TM, Caduff RF, Chen M, Poy EL, Cooney KA, et al. Somatic mutations in the BRCA1 gene in sporadic ovarian tumours. *Nat Genet.* 1995;9(4):439-43.
48. Koul A, Loman N, Malander S, Borg A, Ridderheim M. Two BRCA1-positive epithelial ovarian tumors with metastases to the central nervous system: a case report. *Gynecol Oncol.* 2001;80(3):399-402.
49. Enomoto T, Weghorst CM, Inoue M, Tanizawa O, Rice JM. K-ras activation occurs frequently in mucinous adenocarcinomas and rarely in other common epithelial tumors of the human ovary. *Am J Pathol.* 1991; 39(4):777-85.
50. Fu S, Hennessy BT, Ng CS, Ju Z, Coombes KR, Wolf JK, et al. Perifosine plus docetaxel in patients with platinum and taxane resistant or refractory high-grade epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2012;126(1):47-53.
51. Mandai M, Konishi I, Komatsu T, Mori T, Arao S, Nomura H, et al. Mutation of the nm23 gene, loss of heterozygosity at the nm23 locus and K-ras mutation in ovarian carcinoma: correlation with tumour progression and nm23 gene expression. *Br J Cancer.* 1995; 72(3):691-695.
52. Otsuka J, Okuda T, Sekizawa A, Amemiya S, Saito H, Okai T, et al. M. Detection of p53 mutations in the plasma DNA of patients with ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2004; 14(3):459-64.
53. Kringen P, Wang Y, Dumeaux V, Nesland JM, Kristensen G, Borresen-Dale AL, et al. TP53 mutations in ovarian carcinomas from sporadic cases and carriers of two distinct BRCA1 founder mutations; relation to age at diagnosis and survival. *BMC Cancer.* 2005; 5:134.
54. Dehari R, Kurman RJ, Logani S, Shih IM. The development of high-grade serous carcinoma from atypical proliferative (borderline) serous tumors and low-grade micropapillary serous carcinoma: a morphologic and molecular genetic analysis. *Am J Surg Pathol.* 2007; 31(7):1007-12.
55. Birch AH, Arcand SL, Oros KK, Rahimi K, Watters AK, Provencher D, et al. Chromosome 3 anomalies investigated by genome wide SNP analysis of benign, low

malignant potential and low grade ovarian serous tumours. *PLoS One*. 2011; 6(12):e28250.

56. Wojnarowicz PM, Oros KK, Quinn MC, Arcand SL, Gambaro K, Madore J, et al. The genomic landscape of TP53 and p53 annotated high grade ovarian serous carcinomas from a defined founder population associated with patient outcome. *PLoS One*. 2012;7(9):e45484.

57- Sangha N, Wu R, Kuick R, Powers S, Mu D, Fiander D, et al. Neurofibromin 1 (NF1) defects are common in human ovarian serous carcinomas and co-occur with TP53 mutations. *Neoplasia*. 2008;10(12):1362-72.

58. Kinde I, Bettegowda C, Wang Y, Wu J, Agrawal N, Shih IM, et al. Evaluation of DNA from the Papanicolaou test to detect ovarian and endometrial cancers. *Sci Transl Med*. 2013; 5(167):167ra4.

59. Maruyama N, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Monden M, Noguchi S. Clinicopathologic analysis of breast cancers with PIK3CA mutations in Japanese women. *Clin Cancer Res*. 2007;13(2 Pt 1):408-14.

60. Dunlap J, Le C, Shukla A, Patterson J, Presnell A, Heinrich MC, et al. Phosphatidylinositol-3-kinase and AKT1 mutations occur early in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;120(2):409-18.

61. Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnjak M, Bhanot UK, et al. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(16):5049-59.

62. 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; 14(1):R28.

63. Loi S, Michiels S, Lambrechts D, Fumagalli D, Claes B, Kellokumpu-Lehtinen PL, et al. Somatic mutation profiling and associations with prognosis and trastuzumab benefit in early breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2013; 105(13):960-7.

64. Mangone FR, Bobrovnitchaia IG, Salaorni S, Manuli E, Nagai MA. PIK3CA exon 20 mutations are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Clinics (Sao Paulo)*. 2012; 67(11):1285-90.
65. Liedtke C, Cardone L, Tordai A, Yan K, Gomez HL, Figureoa LJ, et al. PIK3CA-activating mutations and chemotherapy sensitivity in stage II-III breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008;10(2):R27.
66. Gentile M, Bergman Jungeström M, Olsen KE, Söderkvist P, Wingren S. p53 and survival in early onset breast cancer: analysis of gene mutations, loss of heterozygosity and protein accumulation. *Eur J Cancer*. 1999; 35(8):1202-7.
67. Olivier M, Langerød A, Carrieri P, Bergh J, Kloor S, Eyfjord J, et al. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12 (4):1157-67.
68. Simão TA, Ribeiro FS, Amorim LM, Albano RM, Andrada-Serpa MJ, Cardoso LE, et al. TP53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio de Janeiro, Brazil: association with risk factors and tumor characteristics. *Int J Cancer*. 2002; 101(1):69-73.
69. Chen FM, Hou MF, Wang JY, Chen TC, Chen DC, Huang SY, et al. High frequency of G/C transversion on p53 gene alterations in breast cancers from Taiwan. *Cancer Lett*. 2004; 207(1):59-67.
70. Van Emburgh BO, Hu JJ, Levine EA, Mosley LJ, Case LD, Lin HY, et al. Polymorphisms in drug metabolism genes, smoking, and p53 mutations in breast cancer. *Mol Carcinog*. 2008; 47(2):88-99.
71. Bozhanov SS, Angelova SG, Krasteva ME, Markov TL, Christova SL, Gavrilo IG, et al. Alterations in p53, BRCA1, ATM, PIK3CA, and HER2 genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010; 136(11):1657-69.
72. Jiang YZ, Yu KD, Zuo WJ, Peng WT, Shao ZM. GATA3 mutations define a unique subtype of luminal-like breast cancer with improved survival. *Cancer*. 2014; 120(9):1329-37.

73. Boyault S, Drouet Y, Navarro C, Bachelot T, Lasset C, Treilleux I, et al. Mutational characterization of individual breast tumors: TP53 and PI3K pathway genes are frequently and distinctively mutated in different subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 132(1):29-39.
74. Fujita M, Enomoto T, Inoue M, Tanizawa O, Ozaki M, Rice JM, et al. Alteration of the p53 tumor suppressor gene occurs independently of K-ras activation and more frequently in serous adenocarcinomas than in other common epithelial tumors of the human ovary. *Jpn J Cancer Res.* 1994; 85(12):1247-56.
75. Manderson EN, Presneau N, Provencher D, Mes-Masson AM, Tonin PN. Comparative analysis of loss of heterozygosity of specific chromosome 3, 13, 17, and X loci and TP53 mutations in human epithelial ovarian cancer. *Mol Carcinog.* 2002; 34(2):78-90.
76. Ueno Y, Enomoto T, Otsuki Y, Sugita N, Nakashima R, Yoshino K, et al. Prognostic significance of p53 mutation in suboptimally resected advanced ovarian carcinoma treated with the combination chemotherapy of paclitaxel and carboplatin. *Cancer Lett.* 2006;241(2):289-300.
77. Høgdall EV, Høgdall CK, Blaakaer J, Christensen L, Bock JE, Vuust J, et al. K-ras alterations in Danish ovarian tumour patients. From the Danish "Malova" Ovarian Cancer study. *Gynecol Oncol.* 2003; 89(1):31-6.
78. Takahashi H, Behbakht K, McGovern PE, Chiu HC, Couch FJ, Weber BL, et al. Mutation analysis of the BRCA1 gene in ovarian cancers. *Cancer Res.* 1995; 55(14):2998-3002.

Figure 1 - Frequency of *PIK3CA* and *TP53* somatic mutation and ER and HER2 expression (positive and negative) according to different age groups (Pearson correlation) (*PIK3CA* n=6, after exclusion of age group < 30 y, as less than 10 patients were available)

Figure 2 - Frequency of *PIK3CA* or *TP53* somatic mutation according to expression ER or HER2 (positive and negative) according to different age groups (Pearson correlation). Age groups with less than 10 patients were excluded)

Table 1 - Studies selected in breast and serous ovarian cancer analysis

Author	Patients (n)	Gene	Methodology
Breast Cancer			
Ding et al. ¹⁷	1	All	WGS and/or exome sequencing
Yost et al. ¹⁸	2	All	WGS and/or exome sequencing
Nik-Zainal et al. ¹⁹	21	All	WGS and/or exome sequencing
Banerji et al. ²⁰	103	All	WGS and/or exome sequencing
Shah et al. ²¹	63	All	WGS and/or exome sequencing
Stephens et al. ²²	100	All	WGS and/or exome sequencing
Ellis et al. ²³	317	All	WGS and/or exome sequencing (77 patients), <i>PIK3CA</i> , <i>TP53</i> , <i>CDH1</i> and <i>GATA3</i> (240 patients)
Jiao et al. ²⁴	15	All	WGS and/or exome sequencing
Craig et al. ²⁵	14	All	WGS and/or exome sequencing
Benvenuti et al. ²⁶	85	<i>PIK3CA</i>	direct sequencing
Miron et al. ²⁷	80	<i>PIK3CA</i>	direct sequencing
Martins et al. ²⁸	75	<i>PIK3CA</i>	direct sequencing
Hernandez et al. ²⁹	13	<i>PIK3CA</i>	Sequenom MassArray - direct sequencing
Lima et al. ³⁰	1	<i>PTEN</i>	direct sequencing
Jong et al. ³¹	89	<i>TP53</i>	DHPLC - direct sequencing
Lavarino et al. ³²	31	<i>TP53</i>	SSCP- direct sequencing
Wistuba et al. ³³	2	<i>TP53</i>	SSCP- direct sequencing
Masri et al. ³⁴	19	<i>TP53</i>	direct sequencing
Lien et al. ³⁵	14	<i>TP53</i>	direct sequencing
Eachkoti et al. ³⁶	25	<i>TP53</i>	SSCP- direct sequencing
Vincent-Salomon et al. ³⁷	48	<i>TP53</i>	direct sequencing
Aceto et al. ³⁸	4	<i>TP53</i>	DHPLC - direct sequencing
Curtis et al. ³⁹	820	<i>TP53</i>	direct sequencing
Ripamonti et al. ⁴⁰	1	<i>TP53</i>	direct sequencing
Sjoblom et al. ⁴¹	36	<i>TP53/GATA3/CDH1</i>	direct sequencing
Ang et al. ⁴²	1	<i>TP53/PIK3CA</i>	Sequenom MassArray - direct sequencing
Serous Ovarian Cancer			
Bell et al. ⁴³	309	All	WGS and/or exome sequencing
Jones et al. ⁴⁴	17	All	WGS and/or exome sequencing (8 patients) and direct sequencing (<i>KRAS</i> - 9 patients)
Zhang et al. ⁴⁵	1	All	WGS and/or exome sequencing
Bashashati et al. ⁴⁶	5	All	WGS and/or exome sequencing
Merajver et al. ⁴⁷	15	<i>BRCA1</i>	SSCP - direct sequencing
Koul et al. ⁴⁸	2	<i>BRCA1</i>	PTT - SPSS - sequencing
Enomoto et al. ⁴⁹	10	<i>KRAS</i>	direct sequencing
Fu et al. ⁵⁰	10	<i>KRAS</i>	direct sequencing
Mandai et al. ⁵¹	21	<i>KRAS</i>	SSCP - direct sequencing
Otsuka et al. ⁵²	14	<i>TP53</i>	SSCP - direct sequencing
Kringen et al. ⁵³	24	<i>TP53</i>	TTGE - direct sequencing

Dehari et al. ⁵⁴	6	<i>TP53/KRAS</i>	direct sequencing
Birch et al. ⁵⁵	10	<i>TP53/KRAS</i>	direct sequencing
Wojnarowicz et al. ⁵⁶	95	<i>TP53/KRAS</i>	direct sequencing
Sangha et al. ⁵⁷	41	<i>TP53/KRAS/NF1</i>	PTT - direct sequencing
Kinde et al. ⁵⁸	18	<i>TP53/KRAS/NF1</i>	direct sequencing

WGS, Whole Genome Sequencing; DHPLC, Denaturing High Pressure Liquid Chromatography; SSCP, Single-Strand Conformation Polymorphism

Anexo M. Manuscrito 2

***BRCA1/BRCA2* germline mutations and somatic mutations in early onset breast cancer patients**

Giselly Encinas Zanetti, Eduardo Carneiro de Lyra, Veronica Sabelnykova, Simone Maistro, Maria Lucia Hirata Katayama, Ana Carolina Ribeiro Chaves de Gouvêa, Fátima Solange Pasini, Pedro Mompean Valle, Felipe Correa Geyer, Ricardo Alves Basso, Maria del Pilar Esteves Diz, João Carlos Guedes Sampaio Góes, Maria Mitzi Brentani, Paul Boutros, Roger Chammas, Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira

Introduction: Early age patients less than 36 years represent 4% of breast cancer cases and have a higher probability of being *BRCA1/2* mutation carriers. There are indications that tumors from young patients are biologically distinct from older women, however, these tumors have been less studied. Our aim was to identify somatic mutations in luminal tumors from *BRCA1/2* wild type young breast cancer patients.

Methods: Eight three unselected young patients were enrolled. *BRCA1/2* mutations were screened by Sanger sequencing and Multiplex Ligation-Dependent Probe amplification (MLPA). Tumor and blood samples from eight patients (hormone receptor positive) were selected for whole exome sequencing using Nextera Rapid Capture Enrichment in an Illumina HiSeq 1000, analyzed through SomaticSniper (v1.0.2). Somatic mutation in *PIK3CA* gene was then searched in Formaldehyde Fixed-Paraffin Embedded samples from another group of young and older breast cancer patients.

Results: Median age was 32 years (22-35) and luminal subtype was the most frequent (65.9%). Deleterious mutation in *BRCA1/2* genes was detected in 13 patients (*BRCA1*, n= 4 and *BRCA2*, n= 9). One novel mutation was detected in *BRCA1* gene: a stop codon in exon 6 (c.483T>A; p.Cys161Ter). Somatic mutations were evaluated in eight luminal samples and a median of 39 alterations/tumor was detected, varying from 17 to 74. Potential driver alterations were detected in 53 genes, such as *PIK3CA*, *PRKD1*, *PRKARIA* and *PIK3API*, that encode tyrosine kinase proteins or proteins involved in tyrosine kinases regulation; and *POLD1* gene, that encodes the catalytic subunit of DNA polymerase delta which plays a critical role in DNA replication and repair. Somatic mutation in *PIK3CA* gene was frequently detected in both young and older patients.

Conclusion: In conclusion, more than 15% of the young breast cancer patients are *BRCA1* or *BRCA2* mutation carriers. In patients with sporadic cancer somatic mutations were found in genes that encode tyrosine kinase proteins or are involved in the DNA repair. In agreement with what was observed in tumors from older patients, somatic mutation in *PIK3CA* gene is relatively frequent in tumors from young patients.

Introduction

Breast cancer mainly affects post-menopausal women, however, annual estimates indicate that 4.8-5.0% of breast cancer cases occur in young adults, aged less than 40 years, in Brazil. Even at this early age the disease can be highly fatal and in the USA, where cancer is the second leading cause of total deaths in young women, breast cancer is the leading cause of cancer deaths (Siegel et al., 2015).

There is evidence that some cancers in young adults have a differential biology, and probably etiology/pathogenesis, than the disease in older persons (Bleyer et al., 2008) however, only a few studies have explored these aspects. In breast cancer, some of these differences are already known. Germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* may support the carcinogenic process in around 20% of the young patients (Lalloo et al., 2006; Loizidou et al., 2007; Haffty et al., 2009; Carraro et al., 2013), but only in 1-4% of the post-menopausal women (Kurian, 2010). Mutations in other cancer predisposing genes such as *TP53*, *PTEN*, *CHEK2*, among others, may explain an additional 4% of the cases of early onset breast cancer (Churpek et al., 2015).

Younger age has been associated with a less favorable prognosis. This aggressiveness might be in part due to a lower proportion of luminal A and higher prevalence of triple negative and high grade tumors. However, comparing patients within each specific subtype (luminal, HER2 and triple-negative tumors), there is data indicating that women diagnosed at an early age present worse outcomes than those diagnosed at more advanced ages (Cancello et al., 2010; Azim et al., 2012). Hence, other distinct biological features than tumor subtype might be involved in a differential tumor behavior. Accordingly, gene expression analysis revealed a differential transcriptional profile in tumors arising in young women, with enrichment of biological processes related to immature mammary cell populations and growth factor signaling (Azim et al., 2012).

In breast cancer, a mutational signature correlated with advanced age was also described, characterized by prominence of C>T substitutions, consistent with the hypothesis that mutations are acquired over the lifetime of the affected persons (Alexandrov et al., 2013). Molecular signatures of breast cancer subtypes have also been examined and great differences were shown between basal-like and luminal tumors, the former presenting higher rate of genomic rearrangements than the latter (Banerji et al., 2012). In addition, numerous subtype-associated and novel gene mutations were described (Cancer Genome Atlas Network, 2012). These studies

however, have not focused on somatic mutations that may distinguish early onset breast cancer. Hence, our aim was detect *BRCA1/2* germline mutations in early onset breast cancer and to identify somatic mutations in luminal breast cancer in *BRCA1/BRCA2* wild type patients.

Patients

This study was approved by the institutional ethics committee (CEP-FMUSP and CEP-IBCC) and all patients were informed and signed an informed consent. Early onset breast cancer was defined as diagnosis before 36 years old. None of the patients had received previous medical treatment for their breast cancer before the biopsy/mastectomy procedure.

Eighty three young women treated for breast cancer at Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC) and Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), São Paulo, Brazil, from April 2012 to February 2014 were interviewed for family history suggestive of hereditary breast and ovarian cancer syndrome (BOCS), including close relatives as first, second, and third degree family members, as described by NCCN, assessed February 2012.

Median age of the patients at diagnosis was 32 years and most of them were diagnosed with IDC (89.3%), high histological grade (49.4%), Ki67 >14% (89.2%) luminal (65.9%) subtype, advanced stage disease (clinical stages III/IV; 51.4%) (Additional file 1).

Almost 23% of these women (19/83) were not able to provide detailed family history, mainly on the paternal side of the family. About 47% (30/64) of the patients with informative family history reported at least one relative with breast, ovarian, pancreatic or prostate cancer, among whom, 33% (10/30) in a first degree family member.

Seventy nine women collected a blood sample for *BRCA1/2* whole gene sequencing. Afterwards, all *BRCA1/2* deleterious mutations were confirmed in DNA material from peripheral blood collected through a second venipuncture. MLPA analysis and *CHEK2* hot spot (c.1100delC) sequencing were performed in blood samples from 66 patients, who were not considered *BRCA1/2* deleterious mutation carriers, after whole gene sequencing. Four patients did not consent on genetic testing and were excluded from further analysis.

Among the 79 women, 12 had fresh tumor samples collected during breast surgery, among whom, the first eight patients who were *BRCA1/2* wild type carriers with luminal tumors, had their samples subsequently analyzed through whole exome sequencing.

Tumor samples from 41 young patients (38 FFPE and 3 fresh samples not included in the exome analysis) were available for subsequent analysis. Among these

women, 6 were *BRCA1* or *BRCA2* mutation carriers, 11 presented triple negative and 5 HER2 positive tumors (Additional file 1).

Methods

DNA Extraction from Blood and Tumor Tissue

DNA was extracted from 8 mL of whole blood using the Kit Illustra Blond GenomicPreo Mini Spin Kit (GE/28-9042-64); and from cancer cells enriched areas (mean tumor cells was 70%, varian 30-100%, selected by a pathologist) of fresh frozen and formaldehyde fixed paraffin embedded (FFPE) samples, using the QIAamp DNA Mini Kit - Qiagen (Qiagen/51304) and QIAamp® DNA FFPE Tissue (Qiagen/ 56404), respectively, following instructions of the manufacturer.

Direct Sequencing of *BRCA1* and *BRCA2* Genes

Polymerase chain reaction (PCR) Amplification and Sanger Sequencing

The complete coding region of *BRCA1* (U14680 or NM_7294.2) and *BRCA2* (U43746 or NM_000059.1), including 50-100 bp of non-coding sequences, flanking the 5' and 3' ends of each exon, were amplified by PCR using 33 primers for *BRCA1* gene (Arnold et al., 1999; Friedman et al., 1994) and 48 primers for *BRCA2* gene (Wagner et al., 1999), using AmpliTaq Gold enzyme (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in a GeneAmp 9700 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). *BRCA2* exon 11 fragments were amplified by touchdown PCR. Primers and conditions are described in Additional file 2 (*BRCA1*) and Additional file 3 (*BRCA2*).

Each PCR product was treated with 1 µL of *illustra*™ *ExoStar*™ *1-Step* (GE Healthcare Life Sciences) and incubated at 37°C for 15 min, followed by 80°C for 15 min, using to remove unincorporated primers and dNTPs. All PCR products were sequenced in both forward and reverse directions using BigDye® Terminator v3.1 (Life Technologies or Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions, on a 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems - Hitachi). Sequences obtained were visualized by Chromas v2.33 (Technelysium Pty. Ltd.) and by Mutation Surveyor v3.20 (SoftGenetics LLC).

If a deleterious mutation was identified, a new DNA sample derived from a second venipuncture was resequenced for confirmation.

MLPA of *BRCA1* and *BRCA2* Genes

Patients negative for *BRCA1/2* mutations were investigated for deletions and duplications in these genes using the multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) commercial kits *SALSA[®] MLPA[®] P002 BRCA1 probemix* (P002 - 100R) e *SALSA[®] MLPA[®] P045 BRCA2/CHEK2 probemix* (P045 - 100R) (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) according to the manufacturer's recommendations.

***BRCA1* and *BRCA2* sequencing analysis and reporting criteria**

The variants were searched for their classification in five publicly accessible databases: *Cancer Information Core* (BIC) (Szabo et al., 2000), *Leiden Open Variation Database* (LOVD) (Fokkema et al., 2011), *Leiden Open Variation Database - International Agency for Research on Cancer* (LOVD-IARC) and *Mutation Database Universal* (UMD) (Bérout et al., 2000; Caputo et al., 2012) e ClinVar (Landrum et al., 2014), freeze July, 2015. All sequence variants were named according to the nomenclature used by the Human Genome Variation Society, HGVS (<http://www.hgvs.org>). Genes with any type of insertion or deletion or amino acid substitution resulting in premature stop codon were classified as pathogenic. All alterations were classified according Vail and collaborators (2014) for each database. After, the alterations were classified in a general classification in: pathogenic, likely pathogenic, benign, likely benign and variant uncertain significance (VUS) using criteria adapted by Richards and collaborators (2015).

The VUSs were submitted to *in silico* prediction programs, such as PolyPhen (Adzhubei et al., 2010), SIFT (Ng e Henikoff, 2001), Align-GVGD (Tavtigian et al., 2005; Mathe et al., 2006), for missense alterations and Provean (Choi et al., 2012) for in frame deletions.

Exome Sequencing

Macrodissection was performed and tumor content was estimated to be at least 70% in the selected areas. Coding fragments were enriched by exon capture (*Nextera Rapid Capture Enrichment*, Illumina, Inc., San Diego, CA. USA). Whole-exome sequencing was conducted using the Illumina HiSeq 1000 platform, targeting 201,121 exons, comprising 62 megabases (Mb) of the genome and with a median of 95.3% of targeted bases covered at least 30-fold across the sample set. Mean average sequencing depths for tumors and corresponding normal components were 35.79 and 36.29, respectively (Additional file 4).

Exome Sequencing Analysis

BWA v0.5.7 program was used to align 8 paired tumor/blood exome samples, using hg19 as the reference genome and Picard v1.92 to mark duplicates. Paired tumor/normal samples were processed together using GATK v2.4.9 for local realignment and for base quality recalibration. SAMtools v0.1.9 and Picard v1.107 were then used to process the bam headers and to index the samples, respectively.

To detect somatic single nucleotide variants (SNVs), SomaticSniper (v1.0.2) was utilized (<http://gmt.genome.wustl.edu/somaticsniper/1.0.3/documentation.html>). Default parameters were used to call SNVs, except for the mapping quality threshold, which was set to 1, as recommended by the developer. Standard, LOH, bam-readcount, false positive and lastly high confidence filters were applied using SAMtools v0.1.6 and scripts provided by the SomaticSniper package (<http://gmt.genome.wustl.edu/somaticsniper/1.0.3/documentation.html>). The final VCF file, containing high confident somatic SNVs, was used in the downstream analysis.

An in-house pipeline called recSNV was used to find recurrent mutations. Parameters were set to find genes that were mutated in at least 2 samples. At first, VCF files from the 3 SNV callers were converted to BED files, by the following Perl script: vcf2annovar.pl. This pipeline uses lists of SNPs compiled from various studies to filter out SNPs from the samples, unless they have the 'PASS' flag. Thus, all the SNPs from COSMIC should be kept as they are related to cancer information. For each SNV caller the following filters were applied: Fuentes, COSMIC v71 (coding and non-coding), dbSNP142, 1000 Genomes, AccuSNP blacklist, ENCODE (DAC and DUKE). A report was generated, providing visualizations of: a) base changes count barplot; b) heatmaps, summarizing functional mutations; c) trinucleotide barplot showing the number of SNPs in each of 96 trinucleotide context mutation types.

The "functional summary heatmap seqsig" plot, displays SeqSig barplot, which was created by considering all the filtered functional variants. To find significant variants, SeqSig assumes: a) only coding regions are considered to cause cancer; b) only base substitutions are considered, not indel or other structure variant, and c) for each patient, mutations are independent among nucleotides and homogeneous across all positions on coding regions. Usually only those genes present in at least 2 samples are plotted in the heatmap, however, if there is only one such gene, then all the functional variants are displayed. If there is a discrepancy between the number of genes found in the Excel file and that plotted it may be due to the collapsing of variants into genes.

The SeqSig barplot represents the $-10 \times (\text{fdr adjusted p-value})$ of a particular gene. The null hypothesis is that the particular gene in question is not a driver gene, thus, high scores indicate that we should reject the null hypothesis of the gene not being a driver in the direction of the alternative hypothesis (gene is a driver gene). Also, note the SeqSig is biased for exome data and works well with an abundance of samples.

Afterwards, gene mutations were analyzed through mutation function assessment algorithms such as PolyPhen and SIFT, to evaluate their causal relationship.

Direct DNA sequencing (*PIK3CA*) from FFPE tumor samples

FFPE samples from another group of patients were analysed for *PIK3CA* mutations in exons 9 and 20, using specific primers (Additional file 5). After amplification, PCR products were sequenced using *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies - 4337456) in an *Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems - Hitachi). All sequences were visualized by Chromas v2.33 (Technelysium Pty. Ltd.) and by Mutation Surveyor v3.20 (SoftGenetics LLC)..

Statistical analysis was performed using SPSS Statistics 18.0. Q-Square was used to test for associations between mutation status and clinical-pathological characteristics. Differences were considered significant when the p-value was less than 0.05.

Results

Family history suggestive of HBOCS

At first, 83 young women were evaluated for the presence of family history suggestive of hereditary breast and/or ovarian cancer syndrome (HBOCS), including first, second, and third degree relatives. Nineteen (22.9%) patients were not able to provide family history for one or both sides of the family and 30 (46.9%) out of 64 patients with informative family history reported at least one relative with breast, ovarian, pancreatic or prostate cancer (Additional file 1), among whom, 15% (10/64) in a first degree family member.

BRCA1/2 mutations in young breast cancer patients

Seventy nine patients were tested for *BRCA1/2* germline mutations through whole gene sequencing, among whom, 13 presented deleterious mutations (16.5%), representing 12 distinct types of mutations: three frameshift and one missense in *BRCA1* and four frameshift, three nonsense and one missense mutations in *BRCA2*. Only one mutation (*frameshift* mutation in *BRCA2* c.2808_2811delACAA; 3036delACAA) was detected in two different women (patients 411 and 512) and one nonsense mutation c.483T>A (C161X) on exon 6 of *BRCA2* was detected for the first time (Table 1). These specific mutations were all confirmed by sequencing another DNA sample from peripheral blood collected in a second venipuncture.

Seven out of 30 patients (23.3%) that reporting a positive familial history for cancer were *BRCA1/2* carriers and three out of 34 (9.4%) reporting a negative familial history.

In addition, 29 variants of unknown significance were detected in 22 (27.8%) patients, seven in *BRCA1* (Additional file 6) and twenty two in *BRCA2* (Additional file 7). No patients presented large deletions or amplifications in *BRCA1/2*, nor *CHEK2* mutation (c.1100delC).

In the variants of unknown significance, thirteen distinct missense alterations were identified and only c.3349A>G (I1117V) was predicted deleterious in three softwares. However, all in frame deletions detected in *BRCA1* genes were considerate deleterious in Provean (Table 2).

Gene	Exon	NT	Codon	Designation BIC	HGVS cDNA	HGVS Protein	Type	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar
<i>BRCA1</i>	2	185	22	185insA	c.66_67insA	p.Leu22_Glu23?fs	F	Yes	ND	ND	ND	Pathogenic
	5	330	71	R71G	c.211A>G	p.Arg71Gly	M	Yes	Pathogenic	ND	5- Causal	Pathogenic
	11	3450	1111	3450del4	c.3331_3334delCAAG	p.Gln1111_Glu1112?fs	F	Yes	ND	ND	5- Causal	Pathogenic
	20	5382	1755	5382insC	c.5263_5264insC	p.Ser1755?fs	F	Yes	ND	ND	ND	Pathogenic
<i>BRCA2</i>	5-6	711	161	C161X	c.483T>A	p.Cys161Ter	N	ND	ND	ND	ND	ND
	10	1366	380	1366delA	c.1138_1138delA	p.Ser380Valfs	F	Yes	ND	ND	ND	Pathogenic
	11	3036	936	3036delACAA	c.2808_2811delACAA	p.Lys936_Gln937?fs	F	Yes	ND	ND	5- Causal	Pathogenic
	11	4184	1319	4184del4	c.3956_3959delATGA	p.Asn1319_Glu1320?fs	F	Yes	ND	ND	ND	Pathogenic
	11	6884	2219	S2219X	c.6656C>G	p.Ser2219Ter	N	Yes	ND	ND	5- Causal	Pathogenic
	13	7218	2330	7218del5	c.6990_6994delTACCT	p.Ile2330_Cys2332?fs	F	Yes	ND	ND	ND	Pathogenic
	24	9382	3052	R3052W	c.9154C>T	p.Arg3052Trp	M	Unknown	Pathogenic	5 - Definitely pathogenic	3-UV	Pathogenic
	25	9610	3128	R3128X	c.9382C>T	p.Arg3128Ter	N	Yes	ND	ND	5- Causal	Pathogenic

Table 1. Pathogenic mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes. NT, nucleotide; HGVS, *Human Genome Variation Society*; F, Frameshift; ND, not determinated; BIC, Breast Cancer Information Core; LOVD, Leiden Open Variation Database; LOVD-IARC, Leiden Open Variation Database - International Agency for Research on Cancer; UMD, Mutation Database Universal; UV, unclassified variant. All mutations were detected in one patient, except c.2808_2811delACAA which was detected in two patients.

Gene	Exon	HGVS cDNA	HGVS Protein	PolyPhen	SIFT	Provean	Align GVGD	ID
<i>BRCA1</i>	11	c.1997T>C	p.Leu666Pro	Benign	Tolerated	ND	C0	498
	11	c.1846_1848delTCT	p.Ser616delSer	ND	ND	Damaging	ND	457
	23	c.5425_5430 delGTTGTG	p.Val1809_Val1810 delValVal	ND	ND	Damaging	ND	464
	24	c.5485G>A	p.Glu1829Lys	Benign	Tolerated	ND	C0	487
<i>BRCA2</i>	10	c.1105A>G	p.Asn369Ser	Benign	Tolerated	ND	C0	419
		c.2837A>G	p.Asp946Gly	Benign	Tolerated	ND	C0	452
		c.3349A>G	p.Ile1117Val	Damaging	Not Tolerated	ND	C25	453
		c.3910A>T	p.Thr1304Ser	Benign	Tolerated	ND	C0	521
	11	c.4414A>G	p.Lys1472Glu	Damaging	Tolerated	ND	C0	503
		c.4681C>A	p.His1561Asn	Benign	Tolerated	ND	C0	493
		c.5096A>G	p.Asp1699Gly	Benign	Tolerated	ND	C0	480
		c.5414A>G	p.Asn1805Ser	Damaging	Tolerada	ND	C0	453
		c.6554C>T	p.Ala2185Val	Benign	Tolerated	ND	C0	469
	14	c.7418G>A	p.Cys2473Tyr	Benign	Tolerated	ND	C0	452
	18	c.8092G>A	p.Ala2698Thr	Benigna	Tolerada	ND	C0	453

Table 2. Missense and in frame deletion of unknown significance identified in *BRCA1* and *BRCA2* genes. HGVS, *Human Genome Variation Society*; PolyPhen, *Polymorphism Phenotyping v2*; SIFT, *Sorting Intolerant From Tolerant*; Provean, *Protein Variation Effect Analyzer*; ID, identification of patient.

Somatic mutations detected through whole exome sequencing

To identify somatic mutations, eight tumor/blood paired samples were analyzed through whole exome sequencing. Samples were obtained from women who were *BRCA1/2* wild type carriers and diagnosed with luminal tumors (Additional file 8). In these tumor samples, mean total mutation rate was 1.939 per Mb with a mean non-silent mutation rate of 1.787 per Mb (Additional file 9). The most frequent events were C to T transitions (Figure 1) mainly seen in trinucleotides (Figure 2).

Figure 3. Base change of 310 single nucleotide variants

Figure 4. Trinucleotide. SNVs, single nucleotide variants

Somatic Sniper software was used to detect somatic SNVs (single nucleotide variants), which identified 310 SNVs, comprising 303 unique alterations (five SNVs present in two patients each; one present in three patients) (Additional file 10), varying

from 19 to 74 alterations per tumor sample. The predicted effects of these variations are specified in Additional file 11.

SeqSig algorithm, which was used to compute the non-synonymous mutation probability for each gene on the basis of background mutation rate, revealed 53 significantly mutated genes, with false discovery rate (FDR) < 10% (Figure 3). Fourteen specific gene alterations were further tested in the previous tumor sample tested positive by NGS and confirmed by Sanger sequencing (Additional file 12).

Figure 5. Potential alterations Driver in 53 genes. Base change of these alterations

Nonsense mutations were detected in four genes, *GRHL2*, *GRIN1*, *NOL9*, *TTC21B*, and splice donor mutations in two genes, *ANLN* and *EML5* (Figure 3). Among the 49 missense mutations, three occurred in *PIK3CA*, all the others, in different genes. Consulting COSMIC database, it was possible to identify coding mutations in all these genes, in breast cancer samples, except for *C2orf57*. In addition, the same alteration detected in genes such as *C2orf57*, *CACNA1E*, *CYP2A7*, *EPPK1*, *LONRF3*, *FLG*, *IL22*, *PIK3CA* and *TP53*, were already described in breast cancer or other cancers. Fifteen out of 49 missense mutations were predicted to be deleterious by mutation function assessment algorithms, including *CACNA1E*, *CILP2*, *GLI3*, *HECW2*, *IL22*, *NDST4*, *NES*, *OSR2*, *PIK3AP1*, *POC5*, *POLD1*, *PRICKLE2*, *PRKD1*, *RSBN1*, *TP53*, and another 11, were predicted to be damaging by PolyPhen and SIFT (Table 3).

We have then searched for somatic mutations in young patients (≤ 35 years) in previously published works. It was possible to identify data for another 14 breast cancer young patients (<35 years), through whole genome or whole exome sequencing (Yost et al., 2012; Nik-Zainal et al., 2012; Banerji et al., 2012; Stephens et al., 2012; Craig et al., 2013). Comparing our data and theirs, recurrent mutations were detected in *GRIN1*, *PIK3CA*, *POLD1*, *PRKARIA*, *STAB1*, *RNF231*, *TP53*, and *TTN* (Additional file 13).

Rank	Gene	Name Gene	Alteration	Alteration Type	PolyPhen	SIFT	ID
1	<i>PIK3CA</i>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha	p.Glu545Lys/c.1633G>A	M	Damaging	Tolerated	402
1	<i>PIK3CA</i>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha	p.His1047Arg/c.3140A>G	M	Damaging	Tolerated	406
1	<i>PIK3CA</i>	phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha	p.His1047Leu/c.3140A>T	M	Benign	Tolerated	415
2	<i>TP53</i>	tumor protein p53	p.Tyr220Cys/c.659A>G	M	Damaging	Not Tolerated	406
3	<i>IL22</i>	interleukin 22	p.Arg73Cys/c.217C>T	M	Damaging	Not Tolerated	406
4	<i>PRKARIA</i>	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha	p.Leu20Phe/c.58C>T	M	Benign	Tolerated	406
5	<i>OSR2</i>	odd-skipped related transcription factor 2	p.Gly262Glu/c.785G>A	M	Damaging	Not Tolerated	406
6	<i>POC5</i>	POC5 centriolar protein	p.Arg541Gln/c.1622G>A	M	Damaging	Not Tolerated	406
7	<i>MTHFD2</i>	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 2, methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase	p.Pro17Leu/c.50C>T	M	Benign	Tolerated	415
8	<i>C2orf57</i>	chromosome 2 open reading frame 57	p.Thr265Met/c.794C>T	M	Benign	Tolerated	406
9	<i>SEMA6D</i>	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6D	p.Glu553Ala/c.1658A>C	M	ND	Tolerated	401
10	<i>FAM96A</i>	family with sequence similarity 96, member A	p.Glu75Lys/c.223G>A	M	Benign	Tolerated	416
11	<i>AZI2</i>	5-azacytidine induced 2	p.Ile66Val/c.196A>G	M	Benign	Tolerated	417
12	<i>CALB2</i>	calbindin 2	p.Ala30Glu/c.89C>A	M	Benign	Tolerated	417
13	<i>LONRF3</i>	LON peptidase N-terminal domain and ring finger 3	p.Ala468Thr/c.1402G>A	M	Benign	Tolerated	413
14	<i>CYP2A7</i>	cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 7	p.Arg797His/c.2390G>A	M	Damaging	Tolerated	416
15	<i>NOL9</i>	nucleolar protein 9	p.Ser283*/c.848C>G	N	ND	ND	404
16	<i>ZCCHC24</i>	zinc finger, CCHC domain containing 24	p.Lys123Arg/c.368A>G	M	Benign	Tolerated	416
17	<i>GRHL2</i>	grainyhead-like 2 (Drosophila)	p.Glu32*/c.94G>T	N	ND	ND	417
18	<i>AK8</i>	adenylate kinase 8	p.Thr101Pro/c.301A>C	M	Benign	Tolerated	413
19	<i>ENCI</i>	ectodermal-neural cortex 1 (with BTB domain)	p.Pro300Ala/c.898C>G	M	ND	Tolerated	417
20	<i>ODC1</i>	ornithine decarboxylase 1	p.Tyr188Ser/c.563A>C	M	ND	Not Tolerated	413
21	<i>SLC13A1</i>	solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporter), member 1	p.Arg277Pro/c.830G>C	M	Benign	Tolerated	413
22	<i>ELMO3</i>	engulfment and cell motility 3	p.Leu251Phe/c.753G>C	M	Benign	Tolerated	404

Rank	Gene	Name Gene	Alteration	Alteration Type	PolyPhen	SIFT	ID
23	<i>RIMBP2</i>	RIMS binding protein 2	p.Ala548Asp/c.1643C>A	M	Damaging	Tolerated	404
24	<i>GLI3</i>	GLI family zinc finger 3	p.Thr943Pro/c.2827A>C	M	Damaging	Not Tolerated	401
25	<i>NDST4</i>	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 4	p.Val313Phe/c.937G>T	M	Damaging	Not Tolerated	417
26	<i>PRICKLE2</i>	prickle homolog 2 (Drosophila)	p.Pro81Leu/c.242C>T	M	Damaging	Not Tolerated	417
27	<i>EML5</i>	echinoderm microtubule associated protein like 5	c.4238G>T	Splice	ND	ND	404
28	<i>PLA2G4D</i>	phospholipase A2, group IVD (cytosolic)	p.Ser173Gly/c.517A>G	M	Benign	Tolerated	413
29	<i>ANLN</i>	anillin, actin binding protein	c.2968T>C	Splice	ND	ND	413
30	<i>FNBP1L</i>	formin binding protein 1-like	p.Lys328Asn/c.984G>T	M	Damaging	Tolerated	402
31	<i>MYO1H</i>	myosin IH	p.Glu501Gly/c.1502A>G	M	ND	Tolerated	416
32	<i>RSBN1</i>	round spermatid basic protein 1	p.Pro148Ser/c.442C>T	M	Damaging	Not Tolerated	413
33	<i>CIITA</i>	class II, major histocompatibility complex, transactivator	p.Pro443Thr/c.1327C>A	M	Damaging	Tolerated	402
34	<i>CILP2</i>	cartilage intermediate layer protein 2	p.Arg472Gly/c.1414C>G	M	Damaging	Not Tolerated	404
35	<i>EPPK1</i>	epiplakin 1	p.Arg2364Gln/c.7091G>A	M	Benign	Tolerated	401
36	<i>FAM65B</i>	family with sequence similarity 65, member B	p.Glu718Asp/c.2154G>C	M	ND	Tolerated	402
37	<i>GRIN1</i>	glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1	p.Gln910*/c.2728C>T	N	ND	ND	416
38	<i>LRRC66</i>	leucine rich repeat containing 66	p.His434Asn/c.1300C>A	M	Benign	Tolerated	401
39	<i>MAMLD1</i>	mastermind-like domain containing 1	p.Ala775Val/c.2324C>T	M	ND	Tolerated	401
40	<i>PIK3AP1</i>	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1	p.Gln285Lys/c.853C>A	M	Damaging	Not Tolerated	415
41	<i>POLD1</i>	polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit	p.Pro146Arg/c.437C>G	M	Damaging	Not Tolerated	413
42	<i>PRKD1</i>	protein kinase D1	p.Tyr800Cys/c.2399A>G	M	Damaging	Not Tolerated	415
43	<i>RNF213</i>	ring finger protein 213	p.Gln2801Lys/c.8401C>A	M	ND	Not Tolerated	401
44	<i>SMURF2</i>	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	p.Ser193Cys/c.578C>G	M	Benign	Not Tolerated	402
45	<i>TTC21B</i>	tetratricopeptide repeat domain 21B	p.Arg898*/c.2692C>T	N	ND	ND	415
46	<i>ZNF33A</i>	zinc finger protein 33A	p.Gly183Val/c.548G>T	M	ND	ND	413
47	<i>HECW2</i>	HECT, C2 and WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 2	p.Asp265Gly/c.794A>G	M	Damaging	Not Tolerated	402

Rank	Gene	Name Gene	Alteration	Alteration Type	PolyPhen	SIFT	ID
48	<i>CACNA1E</i>	calcium channel, voltage-dependent, R type, alpha 1E subunit	p.Arg590Trp/c.1768C>T	M	Damaging	Not Tolerated	402
49	<i>FLG</i>	filaggrin	p.Arg1166Cys/c.3496C>T	M	ND	Not Tolerated	416
50	<i>NES</i>	nestin	p.Glu340Val/c.1019A>T	M	Damaging	Not Tolerated	402
51	<i>STAB1</i>	stabilin 1	p.Gly1381Arg/c.4141G>A	M	Damaging	Tolerated	402
52	<i>ZNF462</i>	zinc finger protein 462	p.Gly2426Cys/c.7276G>T	M	Damaging	Tolerated	402
53	<i>TTN</i>	titin	p.Leu6228Ser/c.18683T>C	M	Damaging	ND	416

Table 3. Somatic alterations observed in young breast cancer patients. Analysis in silico using PolyPhen and SIFT. PolyPhen, *Polymorphism Phenotyping v2*; SIFT, *Sorting Intolerant From Tolerant*; M, missense; N, nonsense; ID, identification of patient.

Somatic mutations in *PIK3CA* gene

PIK3CA mutation was the most frequent alteration found in these samples of early onset breast cancer patients. Hence, tumor samples from another 41 young women (38 FFPE and 3 fresh samples) were checked for mutations in exons 9 and 20. Among these women, 6 were *BRCA1* or *BRCA2* mutation carriers, 11 presented triple negative and 5 HER2 positive tumors (Additional file 1).

PIK3CA somatic mutations were detected in tumor samples from 12 women. One patient (480) presented two mutations, one in exon 9 and another in exon 20, both of them considered deleterious. Two patients were detected with different mutations in the same exon: patient 457, who presented two deleterious mutations in exon 9 and patient 478, who presented one missense and one synonymous mutation in exon 20. None of the patients, who were *BRCA1/2* mutation carriers, presented *PIK3CA* somatic mutations (Table 4).

ID	Exon	Alteration	Alteration Type	Polyphen	SIFT	ID COSMIC
455	9	c.1558G>A (D520N)	M	Benign	Not Tolerated	COSM29096
484	9	c.1593C>A (L531L)	Syn	ND	Tolerated	ND
457	9	c.1615C>T (P539S)	M	Damaging	Not Tolerated	COSM249880
		c.1664G>A (R555K)	M	Damaging	Not Tolerated	COSM1716158
518	9	c.1615C>T (P539S)	M	Damaging	Not Tolerated	COSM249880
477	9	c.1634A>C (E545A)	M	Damaging	Not Tolerated	COSM12458
480*	9	c.1634A>C (E545A)	M	Damaging	Not Tolerated	COSM12458
483	9	c.1634A>C (E545A)	M	Damaging	Not Tolerated	COSM12458
468	9	c.1656G>A (W552X)	N	ND	ND	COSM37025
452	20	c.3130A>G (N1044D)	M	Damaging	Not Tolerated	COSM27134
454	20	c.3146G>A (G1049D)	M	Damaging	Not Tolerated	COSM308548
478	20	c.3165G>A (M1055I)	M	Benign	Not Tolerated	ND
		c.3201G>A (L1067L)	Syn	ND	Tolerated	ND
503	20	c.3150C>T (G1050G)	Syn	ND	Tolerated	ND
480*	20	c.3203A>C (N1068T)	M	Damaging	Not Tolerated	ND

Table 4. Mutations present in Exon 9 and 20 *PIK3CA* gene and in silico analysis using PolyPhen and SIFT. ID, identification of patients; M, missense; Syn, synonymous; PolyPhen, *Polymorphism Phenotyping v2*; SIFT, *Sorting Intolerant From Tolerant*; ND, not determined; ID COSMIC, identification of COSMIC.

If we add up results from the other 8 patients with WES, 49 patients were evaluated for *PIK3CA* mutations, among whom, 15 presented SNVs: 9 in exon 9 (7 missense, one nonsense, one synonymous) and 6 in exon 20 (4 missense, 2 synonymous). The most of missense alteration were considerate deleterious in Polyphen

or Not tolerated in SIFT. In this group of patients, there was no difference in age at diagnosis and no association between *PIK3CA* mutation and histological type and grade, Ki67 expression, molecular subtype and clinical stage (Table 5). Excluding two patients who presented only one synonymous variant, all the other 13, presented missense or nonsense *PIK3CA* mutations.

Clinico-Patological Characteristics	<i>PIK3CA</i>		<i>p-value</i>
	Mut (n=15)	wt (n=34)	
Median age at diagnosis	32 y (23 - 25 y)	33 y (27 - 35 y)	
Histological Type (n /%)			0.459
IDC	13 (86.7)	32 (94.1)	
ILC	1 (6.7)	0 (0)	
Other	1 (6.7)	2 (5.9)	
Grade (n /%)			0.146
1	2 (13.3)	0 (0)	
2	7 (46.7)	17 (51.5)	
3	6 (40)	16 (48.5)	
missing		1	
Ki67 (n /%)			0.062
≤14%	3 (21.4)	1 (3.3)	
>14%	11 (78.6)	29 (96.7)	
missing	1	4	
Molecular Subtype (n /%)			0.621
Luminal	11 (73.3)	21 (63.6)	
HER2	2 (13.3)	3 (9.1)	
Triplo negative	2 (13.3)	9 (23.7)	
missing		1	
Clinical Stage (n /%)			0.234
I/II	10 (76.9)	16 (53.6)	
III/IV	3 (23.1)	14 (46.7)	
missing	2	4	

Table 5. Clinico-Patological Characteristics and *PIK3CA* exons 9 and 20 status. IDC, invasive ductal carcinoma; ILC, invasive lobular carcinoma; mut, mutated; wt, wild type.

Discussion

This was a prospective study to characterize germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes and to identify somatic mutations in early onset breast cancer patients. Almost 23% of the patients were not able to provide information about their family history, but among those who were able, 47% reported at least one family member, until third degree, with breast, ovarian, pancreatic or prostate cancer. These results indicate that a high proportion of early onset breast cancer patients present a close relative (until 3rd degree) with cancers characteristic of HBOCS, higher than the average population of breast cancer patients.

Germline *BRCA1* or *BRCA2* mutations were detected in 16% (13/79) of the patients, however no founder mutations were identified, in accordance with previous works in our population (Carraro et al., 2013, Silva et al., 2014) and corroborating the genetic heterogeneity of the Brazilian people. In addition, 29 VUS were detected in the absence of a pathogenic mutation, which is a high rate, as compared with populations where a great number of individuals have undergone testing for HBOC (Eggington et al., 2013). These results indicate that efforts directed at determining the pathogenicity of variants are needed.

We have then evaluated somatic mutations in luminal breast cancer from *BRCA1/2* wild type carriers. Comparing overall mutation rate in samples from this group of early age patients (1.93 per Mb) with luminal samples from post menopausal women (1.18 per Mb) (Ellis et al., 2012) and breast cancer, irrespective of subtype or age (1.66 per Mb) (Banerji et al., 2012), evaluated by other authors, we may speculate that there is a trend towards increased mutation rate in young patients. We have also detected through whole exome sequencing, a predominance of C>T substitutions, a signature previously associated with advancing age, indicating that these alterations also occur in early onset breast cancer (Alexandrov et al., 2013).

In the present series, somatic mutations were detected in 53 genes, all of them already reported in COSMIC database, as somatically mutated in cancer. Somatic mutations in *PIK3CA* and *TP53*, which are the most prevalent in breast cancer, irrespective of the subtype, were also detected in this group of luminal early onset breast cancer. However, comparing lists of genes somatically mutated in luminal tumors from young (present data) and post-menopausal women (from Ellis et al., 2012), excluding the former two genes, no further overlaps were found. On the other hand, comparing the present series with tumors from young patients evaluated by other authors, some genes

were commonly mutated, including *GRIN1* and *STAB1* (each found mutated in one triple negative tumor) and *POLD1*, *PRKARIA*, and *TTN* (each found mutated in one additional luminal sample) (Yost et al., 2012; Nik-Zainal et al., 2012; Banerji et al., 2012; Stephens et al., 2012; Craig et al., 2013). In the addition, in our series, somatic mutations were also detected in genes coding for some protein kinases, such as *PRKARIA*, *PRKD1*, *EPPK1*, and some genes were predicted deleterious by both PolyPhen and SIFT such as *CACNA1E*, *GLI3*, *IL22*, *PIK3AP1*, *POLD1*, *PRKD1*. Furthermore, nonsense mutations were observed in four genes from four different patients: *NOL9*, *GRHL2*, *GRIN1*, *TTC21B*.

NOL9, codes for nucleolar protein 9, required for rRNA processing and *TTC21B* encodes a tetratricopeptide repeat domain 21B, localized to the cilium axoneme. Both genes were not related with cancer to the present moment (Heindl and Martinez, 2010; Davis et al., 2011)

GRHL2, grainyhead-like transcription factor 2, is a transcription factor that regulates the epithelial mesenchymal transition (EMT) process. It was shown that *GRHL2* down regulation leads to EMT while stable *GRHL2* expression suppress EMT, decreases tumor frequency and sensitizes tumor cells to the effects of chemotherapeutic drugs (Cieply et al., 2013). *GRHL2* nonsense mutation in the present breast cancer sample is likely pathogenic, as it occurred in the very beginning of the gene, giving rise to small truncated protein.

GRIN1 also called *NMDAR1*, codes for glutamate receptor, a subunit of N-methyl-D-aspartate receptors, that forms a ligand-gated ion channel, which inhibition is associated with growth impairment in breast cancer cell lines and melanoma cells (North et al., 2010; Prickett et al., 2014). In one of our patients, a nonsense mutation in *GRIN1* occurred in the cytoplasmic region, near the carboxi terminus of the protein, so it is difficult to evaluate its pathogenicity due to protein malfunction.

POLD1 encodes the 125-kDa catalytic subunit of DNA polymerase delta, which possesses both polymerase and 3' to 5' exonuclease activity and plays a role in DNA replication and repair. In our patient, *POLD1* mutation occurred in the exonuclease domain and was considered damaging in both prediction models of pathogenicity. Accordingly, germline mutations in the exonuclease domain of *POLD1* were found to confer a high risk of multiple colorectal adenomas and carcinoma (CRC) as well as

endometrial cancer and both the germline and the somatic DNA polymerase mutations are expected to cause an ultramutated phenotype (Briggs et al., 2014).

PRKARIA protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha, 1A codes for the regulatory subunit of a cAMP-dependent protein kinase (also called PKA). The inactive enzyme is a tetramer composed of two regulatory and two catalytic subunits, that are activated by cAMP. Defects in *PRKRIA* are thought to cause hyper-activation of PKA signalling, which drives neoplastic transformation, and *PRKRIA* is therefore considered a tumour suppressor (Almeida et al., 2011). In the present study, a missense mutation occurred near the N terminal region of the protein, just before the RIIa Regulatory subunit and was considered tolerated in PolyPhen and SIFT prediction models.

EPPK1 encodes a protein that belongs to the plakin family of proteins, which play a role in the organization of cytoskeletal architecture, probably by maintaining the integrity of keratin intermediate filament networks in epithelial cells. *EPPK1* was recently found to be a potential cancer driver gene in intrahepatic cholangiocarcinoma. (Zou et al., 2014).

CACNA1E encodes the alpha-1E subunit of the R-type calcium channels, involved in a variety of calcium-dependent processes, including muscle contraction, hormone or neurotransmitter release, gene expression, cell motility, cell division and cell death. An abnormal nuclear localization of *CACNA1E* in Wilms' tumor was correlated with a reduced relapse-free survival and transfection of *CACNA1E* in HEK293 cells revealed up-regulation of the immediate early response genes *EGR1/EGR2/EGR3* and *FOS/FOSB*, mediated by activation of the MEK/ERK5/Nur77 pathway. *CACNA1E* mutation was considered pathogenic in both prediction models and a similar mutation in *CACNA1E* was detected in cancers from the central nervous system, pancreas, large intestine and hematopoietic cells (COSMIC data) (Natrajan et al., 2006).

GLI3 encodes a transcription factor which belongs to the C2H2-type zinc finger protein subclass of the Gli family that are mediators of Sonic hedgehog (Shh) signaling. The protein encoded by this gene localizes in the cytoplasm and activates patched *Drosophila* homolog (PTCH) gene expression. *GLI3* missense mutations C-terminal to the zinc finger, in the same region that was presently found, have been described in gastric cancers, mainly those that are MSS mismatch repair stable (Wang et al., 2014).

PRKDI is a serine/threonine kinase that regulates a variety of cellular functions, including membrane receptor signaling, transport at the Golgi, protection from oxidative stress at the mitochondria, gene transcription, and regulation of cell shape, motility, and adhesion. In our patient, *PRKDI* mutation was located on the distal region of the kinase domain and predicted to be pathogenic by both mutation function assessment algorithms. Mutations all over the gene were described in various types of cancer and a recurrent mutation in the kinase domain in polymorphous low grade adenocarcinoma of salivary glands, even though likely activating in a transfection cell model, was associated with improved metastasis free survival (Weinreb et al 2014).

PIK3API, phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1, is involved in the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) pathway, which regulates various cellular processes, such as cell growth, proliferation, apoptosis, motility, differentiation, survival, and intracellular trafficking. In the present study, *PIK3API* mutation in the distal region of DBB (Dof, BCAP, and BANK) motif, which was considered damaging in mutation function prediction models, occurred in a tumor already harboring a mutation in exon 20 of *PIK3CA*, considered tolerated in the same prediction models. We may suppose that regulation of the PI3K/AKT signaling axis may take place through different ways in early onset breast cancer. Accordingly, a meta-analysis of genome wide association studies has previously suggested that the *PIK3API* gene region deserves further investigation (Politopoulos et al., 2011).

PIK3CA mutation was the most frequent alteration found in early onset breast cancer patients. However, this pathway seems deranged independent of age of cancer onset as in a recent meta-analysis we found no differences between the *PIK3CA* mutation rate in younger (<36 years) and older (>35years) patients. In the present series, none of the *BRCA1/2* mutation carriers presented *PIK3CA* somatic mutations.

In summary, *PIK3CA* somatic mutation is relatively frequent in young patients, who are *BRCA1/2* wild type carriers. In our study of early onset breast cancer, somatic mutations were identified in genes encoding protein kinases as *PRKDI*, genes involved in protein kinase regulation, as *PRKARIA* and *PIK3API*, DNA replication and repair, as *POLD1*, and epithelial mesenchymal transition, as *GNRHL1*. Further studies dedicated to this age group may clarify their potential involvement with tumorigenesis and cancer aggressiveness.

References

- Siegel R, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 2015;65:5-29.
- Bleyer A, Viny A, Barr R. Cancer in 15- to 29-year-olds by primary site. *Oncologist*. 2006;11(6):590-601.
- Lalloo F, Varley J, Moran A, Ellis D, O'dair L, Pharoah P, et al. BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. *Eur J Cancer*. 2006;42(8):1143-50.
- Loizidou M, Marcou Y, Anastasiadou V, Newbold R, Hadjisavvas A, Kyriacou K. Contribution of BRCA1 and BRCA2 germLine mutations to the incidence of early-onset breast cancer in Cyprus. *Clin Genet*. 2007;71(2):165-70.
- Haffty BG, Choi DH, Goyal S, Silber A, Ranieri K, Matloff E, et al. Breast cancer in young women (YBC): prevalence of BRCA1/2 mutations and risk of secondary malignancies across diverse racial groups. *Ann Oncol*. 2009;20(10):1653-9.
- Carraro DM, Koike Folgueira MA, Garcia Lisboa BC, Ribeiro Olivieri EH, Vitorino Krepischi AC, 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.
- Kurian AW. BRCA1 and BRCA2 mutations across race and ethnicity: distribution and clinical implications. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2010;22(1):72-8.
- Churpek JE, Walsh T, Zheng Y, Moton Z, Thornton AM, Lee MK, et al. Inherited predisposition to breast cancer among African American women. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;149(1):31-9.
- Cancello G, Maisonneuve P, Mazza M, Montagna E, Rotmensz N, Viale G, et al. Pathological features and survival outcomes of very young patients with early breast cancer: how much is "very young"? *Breast*. 2013;22(6):1046-51.
- Azim HA Jr, Michiels S, Bedard PL, Singhal SK, Criscitiello C, Ignatiadis M, et al. Elucidating prognosis and biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling. *Clin Cancer Res*. 2012;18(5):1341-51.

Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*. 2013;500(7463):415-21.

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;486(7403):405-9.

Arnold N, Gross E, Schwarz-Boeger U, Pfisterer J, Jonat W, Kiechle M. A highly sensitive, fast, and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers. *Hum Mutat*. 1999;14(4):333-9.

Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, et al. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet*. 1994;8(4):399-404.

Wagner TM, Hirtenlehner K, Shen P, Moeslinger R, Muhr D, Fleischmann E, et al. Global sequence diversity of BRCA2: analysis of 71 breast cancer families and 95 control individuals of worldwide populations. *Hum Mol Genet*. 1999;8(3):413-23.

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.

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;32(5):557-63.

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.

Caputo S, Benboudjema L, Sinilnikova O, Rouleau E, Bérout C, Lidereau R; French BRCA GGC Consortium. Description and analysis of genetic variants in French hereditary breast and ovarian cancer families recorded in the UMD-BRCA1/BRCA2 databases. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(Database issue):D992-1002.

Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(Database issue):D980-5.

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;17(5):405-24.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010;7(4):248-9.

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

Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L, Judkins T, Scholl T, Samollow PB, et al. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J Med Genet*. 2006;43(4):295-305.

Mathe E, Olivier M, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Tavtigian SV. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(5):1317-25.

Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*. 2012;7(10):e46688.

Yost SE, Smith EN, Schwab RB, Bao L, Jung H, Wang X, et al. Identification of high-confidence somatic mutations in whole genome sequence of formalin-fixed breast cancer specimens. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(14):e107.

Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Van Loo P, Greenman CD, Raine K, et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell*. 2012;149(5):979-93.

Stephens PJ, McBride DJ, Lin ML, Varela I, Pleasance ED, Simpson JT, et al. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature*. 2009;462(7276):1005-10.

Craig DW, O'Shaughnessy JA, Kiefer JA, Aldrich J, Sinari S, Moses TM, et al. Genome and transcriptome sequencing in prospective metastatic triple-negative breast cancer uncovers therapeutic vulnerabilities. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(1):104-16.

Silva FC, Lisboa BC, Figueiredo MC, Torrezan GT, Santos EM, Krepischi AC, Rossi BM, Achatz MI, Carraro DM. Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. *BMC Med Genet.* 2014;15:55.

Egginton JM, Bowles KR, Moyes K, Manley S, Esterling L, Sizemore S, et al. A comprehensive laboratory-based program for classification of variants of uncertain significance in hereditary cancer genes. *Clin Genet.* 2014;86(3):229-37.

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;486(7403):353-60.

Heindl K, Martinez J. Nol9 is a novel polynucleotide 5'-kinase involved in ribosomal RNA processing. *EMBO J.* 2010;29(24):4161-71.

Davis EE, Zhang Q, Liu Q, Diplas BH, Davey LM, Hartley J, et al. TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum. *Nat Genet.* 2011;43(3):189-96.

Cieply B, Farris J, Denvir J, Ford HL, Frisch SM. Epithelial-mesenchymal transition and tumor suppression are controlled by a reciprocal feedback loop between ZEB1 and Grainyhead-like-2. *Cancer Res.* 2013 Oct 15;73(20):6299-309.

North WG, Gao G, Memoli VA, Pang RH, Lynch L. Breast cancer expresses functional NMDA receptors. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122(2):307-14.

Prickett TD, Zerlanko BJ, Hill VK, Gartner JJ, Qutob N, Jiang J, et al. Somatic mutation of GRIN2A in malignant melanoma results in loss of tumor suppressor activity via aberrant NMDAR complex formation. *J Invest Dermatol.* 2014;134(9):2390-8.

Briggs S, Tomlinson I. Germline and somatic polymerase ϵ and δ mutations define a new class of hypermutated colorectal and endometrial cancers. *J Pathol.* 2013;230(2):148-53.

Almeida MQ, Stratakis CA. How does cAMP/protein kinase A signaling lead to tumors in the adrenal cortex and other tissues? *Mol Cell Endocrinol*. 2011;336(1-2):162-8.

Zou S, Li J, Zhou H, Frech C, Jiang X, Chu JS, et al. Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun*. 2014;5:5696.

Natrajan R, Little SE, Reis-Filho JS, Hing L, Messahel B, Grundy PE, et al. Amplification and overexpression of CACNA1E correlates with relapse in favorable histology Wilms' tumors. *Clin Cancer Res*. 2006;12(24):7284-93.

Wang K, Yuen ST, Xu J, Lee SP, Yan HH, Shi ST, et al. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet*. 2014;46(6):573-82.

Weinreb I, Piscuoglio S, Martelotto LG, Waggott D, Ng CK, Perez-Ordóñez B, et al. Hotspot activating PRKD1 somatic mutations in polymorphous low-grade adenocarcinomas of the salivary glands. *Nat Genet*. 2014;46(11):1166-9.

Politopoulos I, Gibson J, Tapper W, Ennis S, Eccles D, Collins A. Composite likelihood-based meta-analysis of breast cancer association studies. *J Hum Genet*. 2011;56(5):377-82.

Additional Files

ID	Age Years	HT	HG	ER (%)	PR (%)	HER2	Ki67 (%)	MS	CS	HF	Seq.		MLPA	Boadicea %		Tumor Sample	Tumor Analysis	% Tum. Cells
											B1	B2		B1	B2			
401	24	IDC	2	60	80	Neg	35	LB	II	Yes	wt	wt	Neg	3.4	13	Fresh	Exome	80
402	27	ILC	2	40	60	Neg	30	LB	III	Lim	wt	wt	Neg	1.6	5.8	Fresh	Exome	70
403	32	IDC	2	Neg	Neg	Neg	20	TN	III	Yes	wt	wt	Neg	24.7	2.2	Fresh	<i>PIK3CA</i>	80
404	28	IDC	3	60	60	Neg	50	LB	III	Lim	wt	wt	Neg	1.5	5.6	Fresh	Exome	75
406	33	IDC	2	50	40	Neg	10	LA	I	No	wt	wt	Neg	1.2	4.5	Fresh	Exome	90
409	34	IDC	2	30	20	Neg	90	LB	III	Yes	wt	wt	Neg	0.2	1.2	None	None	ND
411	33	ILC	3	Neg	<1	Neg	50	LB	III	Yes	wt	mut	ND	60.4	40.1	Fresh	None	ND
413	35	IDC	3	70	<5	Neg	35	LB	III	Yes	wt	wt	Neg	0.1	0.8	Fresh	Exome	95
415	32	IDC	2	70	30	Neg	40	LB	IV	No	wt	wt	Neg	0.9	3.5	Fresh	Exome	70
416	27	IDC	2	90	20	Neg	20	LB	II	No	wt	wt	Neg	1.2	4.7	Fresh	Exome	65
417	32	IDC	2	90	90	Neg	5	LA	I	Yes	wt	wt	Neg	2.9	7.6	Fresh	Exome	95
418	32	IDC	2	100	60	Neg	70	LB	II	No	wt	wt	Neg	0.7	0.3	Fresh	<i>PIK3CA</i>	75
419	35	IDC	3	Neg	Neg	Neg	40	TN	II	Yes	wt	wt	Neg	8.7	1.6	Fresh	<i>PIK3CA</i>	90
450	27	IDC	3	Neg	Neg	Neg	30	TN	III	Yes	wt	wt	Neg	33.9	0.8	None	None	ND
451	33	IDC	2	70	70	Neg	20	LB	II	Yes	wt	wt	Neg	0.7	3	FFPE	<i>PIK3CA</i>	90
452	34	IDC	3	66	10	Pos	55	LB	I	Lim	wt	wt	Neg	0.3	1.3	FFPE	<i>PIK3CA</i>	80
453	29	IDC	3	Neg	Neg	Neg	40	TN	I	Lim	wt	wt	Neg	7.3	1.2	None	None	90
454	34	Other	1	10	Neg	Neg	ND	LX	II	No	wt	wt	Neg	1	3	FFPE	<i>PIK3CA</i>	70
455	28	IDC	3	100	100	Pos	70	LB	II	Lim	wt	wt	Neg	4.1	0.8	FFPE	<i>PIK3CA</i>	80
456	35	IDC	2	100	80	Neg	18	LB	II	Lim	wt	wt	Neg	0.6	2.2	FFPE	<i>PIK3CA</i>	90
457	33	IDC	2	90	Neg	Neg	22	LB	I	No	wt	wt	Neg	0.4	1.9	FFPE	<i>PIK3CA</i>	60

ID	Age Years	HT	HG	ER (%)	PR (%)	HER2	Ki67 (%)	MS	CS	HF	Seq.		MLPA	Boadicea %		Tumor Sample	Tumor Analysis	% Tum. Cells
											B1	B2		B1	B2			
458	34	Other	3	Pos	Pos	Neg	ND	LX	0	No	wt	wt	Neg	0.2	1.4	FFPE	PIK3CA	70
459	27	IDC	3	Neg	Neg	Neg	65	TN	II	No	wt	wt	Neg	5.5	1	FFPE	PIK3CA	70
460	34	IDC	1	Pos	Pos	Neg	ND	LX	I	Yes	wt	wt	Neg	1.1	4.6	None	None	ND
461	34	IDC	3	Neg	Neg	Neg	40	TN	II	Yes	mut	wt	ND	83	12.2	None	None	ND
463	28	IDC	3	50	70	Neg	40	LB	III	Lim	wt	wt	Neg	0.9	4.3	FFPE	PIK3CA	60
464	32	IDC	3	Neg	Neg	Neg	30	TN	III	Yes	wt	wt	Neg	33.8	5	None	None	ND
465	33	IDC	2	66	33	Neg	38	LB	III	Yes	wt	mut	ND	0.4	2.6	None	None	ND
466	31	IDC	3	Neg	1	Neg	30	LB	III	Yes	mut	wt	ND	19.8	4.8	FFPE	PIK3CA	40
467	34	IDC	3	Neg	Neg	Neg	30	TN	II	No	mut	wt	ND	3.7	0.8	FFPE	PIK3CA	70
468	33	IDC	1	95%	95%	Neg	1%	LA	ND	No	wt	wt	Neg	1.2	1.2	FFPE	PIK3CA	60
469	34	IDC	3	Pos	Pos	Neg	ND	LX	I	Yes	wt	wt	Neg	0.4	1.9	None	None	ND
470	35	IDC	3	Pos	Pos	Pos	ND	LX	III	No	wt	wt	Neg	2.6	0.6	None	None	ND
471	32	IDC	3	Neg	Neg	Pos	30	HER2	II	Yes	wt	wt	Neg	1.7	1.1	FFPE	PIK3CA	100
472	32	IDC	2	90	40	Neg	40	LB	III	Lim	wt	wt	Neg	0.3	1.5	None	None	ND
473	34	IDC	3	50	50	Neg	30	LB	II	Lim	wt	mut	ND	0.6	2.5	FFPE	PIK3CA	70
474	35	IDC	2	Neg	Neg	Pos	ND	HER2	II	Lim	wt	mut	ND	1.9	0.8	FFPE	PIK3CA	70
475	30	IDC	2	Neg	Neg	Neg	50	TN	III	Yes	wt	wt	Neg	11	1.8	FFPE	PIK3CA	30
476	35	IDC	3	Neg	Neg	Neg	60	TN	III	Lim	wt	wt	Neg	9.9	1.8	FFPE	PIK3CA	100
477	27	IDC	3	Neg	Neg	Neg	35	TN	ND	Lim	wt	wt	Neg	8.4	1.6	FFPE	PIK3CA	90
478	29	IDC	3	Neg	Neg	Pos	40	HER2	III	Yes	wt	wt	Neg	2	1	FFPE	PIK3CA	50
479	31	IDC	2	40	70	Neg	20	LB	I	No	wt	wt	Neg	0.9	3.4	FFPE	PIK3CA	80
480	31	IDC	3	Neg	Neg	Neg	70	TN	II	No	wt	wt	Neg	7.3	1.5	FFPE	PIK3CA	30
481	29	IDC	2	70	30	Pos	15	LB	I	Yes	wt	wt	Neg	7.2	88.9	FFPE	PIK3CA	70
482	32	IDC	2	10	15	Neg	16	LB	II	Lim	wt	wt	Neg	1.1	4.3	FFPE	PIK3CA	80

ID	Age Years	HT	HG	ER (%)	PR (%)	HER2	Ki67 (%)	MS	CS	HF	Seq.		MLPA	Boadicea %		Tumor Sample	Tumor Analysis	% Tum. Cells
											B1	B2		B1	B2			
483	35	IDC	3	Neg	1	Neg	70	LB	II	Yes	wt	wt	Neg	3.4	1.5	FFPE	PIK3CA	70
484	35	IDC	2	100	80	Neg	10	LA	II	No	wt	wt	Neg	0.6	2.5	FFPE	PIK3CA	90
485	35	IDC	3	Neg	Neg	Neg	80	TN	III	No	wt	wt	Neg	6.4	1.1	FFPE	PIK3CA	90
486	32	IDC	3	66	66	Neg	30	LB	II	No	wt	mut	ND	0.8	2.4	None	None	ND
487	35	Other	2	66	33	Pos	20	LB	III	No	wt	wt	Neg	0.6	2.9	None	None	ND
488	35	Other	2	Neg	Neg	Pos	ND	HER2	ND	Lim	wt	wt	Neg	0.5	0.3	None	None	ND
489	30	IDC	3	Neg	Neg	Pos	30	HER2	III	Lim	ND	ND	ND	5	1	None	None	ND
490	29	IDC	3	50	20	Neg	ND	LX	II	No	wt	wt	Neg	0.8	3.3	None	None	ND
491	30	IDC	3	Neg	Neg	Neg	ND	TN	II	No	wt	wt	Neg	8.5	2.2	None	None	ND
492	34	Other	ND	Pos	Pos	Neg	≤14	LA	0	Lim	ND	ND	ND	1.9	1.6	None	None	ND
493	33	IDC	3	Neg	Neg	Neg	>14	TN	III	No	wt	wt	Neg	9.7	1.7	FFPE	PIK3CA	40
494	32	IDC	2	Pos	Pos	Pos	>14	LB	IV	No	wt	wt	Neg	0.2	1.7	FFPE	PIK3CA	80
495	31	IDC	3	Pos	Pos	Neg	>14	LB	ND	No	wt	wt	Neg	13.1	43.3	FFPE	PIK3CA	60
496	24	IDC	3	Neg	Neg	Neg	>14	TN	IIIB	No	wt	wt	Neg	6.6	1.3	None	None	ND
497	34	IDC	2	Pos	Pos	Neg	>14	LB	IIIB	Yes	wt	wt	Neg	0.6	3.7	FFPE	PIK3CA	40
498	24	IDC	2	Pos	Pos	Neg	≤14	LA	III	No	wt	wt	Neg	1	4.8	None	None	ND
499	29	IDC	2	Pos	Pos	Neg	>14	LB	III	No	wt	wt	Neg	1	4	None	None	ND
500	32	IDC	2	Neg	Neg	Neg	ND	TN	III	No	wt	wt	Neg	6.8	1.2	None	None	ND
501	29	IDC	ND	Neg	Pos	Pos	ND	LX	IV	No	ND	ND	ND	1.4	0.6	None	None	ND
502	31	IDC	3	Neg	Neg	Neg	ND	TN	III	No	wt	wt	Neg	0.6	0.2	FFPE	PIK3CA	60
503	35	IDC	2	Neg	Neg	Pos	>14	HER2	II	Lim	wt	wt	Neg	0.8	0.4	FFPE	PIK3CA	60
504	35	IDC	2	Pos	Pos	Neg	>14	LB	IIIA	No	wt	wt	Neg	0.5	2.3	None	None	ND
505	26	IDC	2	Pos	Pos	Neg	ND	LX	II	No	wt	wt	Neg	0.6	3.1	FFPE	PIK3CA	60
506	23	Other	ND	Neg	Neg	ND	30	ND	ND	Yes	wt	wt	Neg	3.3	4.8	FFPE	PIK3CA	70

ID	Age Years	HT	HG	ER (%)	PR (%)	HER2	Ki67 (%)	MS	CS	HF	Seq.		MLPA	Boadicea %		Tumor Sample	Tumor Analysis	% Tum. Cells
											B1	B2		B1	B2			
507	32	IDC	2	100	80	Neg	20	LB	ND	Yes	wt	wt	Neg	2.7	2.8	None	None	ND
508	32	IDC	2	Pos	Pos	Pos	50	HER2	ND	Yes	wt	wt	Neg	15.3	15.2	FFPE	<i>PIK3CA</i>	70
509	31	IDC	3	Pos	Pos	Neg	ND	LX	0	Yes	wt	mut	ND	19.2	32.7	None	None	ND
510	28	ILC	3	Neg	Neg	Neg	ND	TN	III	No	ND	ND	Neg	6.5	1	None	None	ND
511	28	IDC	3	Pos	Pos	Neg	ND	LX	ND	Yes	wt	wt	Neg	4.4	16.3	None	None	ND
512	31	IDC	2	Pos	Pos	Pos	>14	LB	III	No	wt	mut	ND	0.3	1.8	FFPE	<i>PIK3CA</i>	70
513	33	IDC	2	Pos	Pos	Neg	>14	LB	III	No	wt	wt	Neg	0.5	2.2	None	None	ND
514	33	IDC	3	Neg	Neg	Pos	>14	HER2	III	Lim	wt	wt	Neg	1.2	0.6	None	None	ND
516	32	IDC	3	Pos	Pos	Neg	>14	LB	I	Yes	wt	mut	ND	31.9	42	FFPE	<i>PIK3CA</i>	70
517	25	IDC	3	Pos	Pos	Neg	ND	LX	III	Yes	wt	wt	Neg	1.9	8.1	None	None	ND
518	31	IDC	2	Pos	Pos	Neg	>14	LB	II	Yes	wt	wt	Neg	9	4.8	FFPE	<i>PIK3CA</i>	80
519	25	IDC	2	66	30	Neg	>14	LB	III	Yes	wt	mut	ND	1.2	12.3	None	None	ND
520	22	IDC	ND	Neg	Neg	Neg	ND	TN	ND	Lim	mut	wt	ND	7.9	1.7	None	None	ND
521	32	IDC	2	90	90	Neg	10%	LA	II	No	wt	wt	Neg	3.3	5.1	None	None	80

Additional file 1. Clinico pathological characteristics, *BRCA* sequencing and MLPA, familial history. ID: identification of patients; HT, histological tumor; HG, histological grade; IDC: invasive ductal carcinoma; ILC: invasive lobular carcinoma; MS, molecular subtype; LA, luminal A; LB, luminal B; LX, luminal; TN, triplo negative; CS, clinical stage; HF, familial history; Lim, limited; ND: not determined; Seq, Sequencing; *B1*, *BRCA1*; *B2*, *BRCA2*; mut, muted; wt, wild type; FFPE, Formaldehyde Fixed-Paraffin Embedded (tissue).

Exon	Oligonucleotídeos Forward (F) e Reverso (R)	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho
2	F: 5' GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT 3' R: 5' TGTCTTTTCTTCCCTAGTATG 3'	56	250
3	F: 5' TCCTGACACAGCAGACATTTA 3' R: 5' TTGGATTTTTCGTTCTCAC TTA 3'	56	340
5	F: 5' GC TTGTAATTCACCTGCCAT 3' R: 5' TTCCTACTGTGGTGGCTTCC 3'	56	270
6	F: 5' AGGTTTCTACTGTTGCTGCAT 3' R: 5' AAAAGGCTTATCACCACGTCA 3'	66	308
7	F: 5' GGGTTTCTCTTGGTTTCTTTG 3' R: 5' GGAGGACTGCTTC TAGCC TG 3'	66	329
8	F: 5' AAGCACAGAACTGGCCAACAA 3' R: 5' CACTTCCC AAAGC TGC TAC 3'	66	274
9	F: 5' TGC CACAGTAGATGCTCAGT 3' R: 5' CACATACATCC CTGAACCTAAA 3'	64	292
10	F: 5' TTGGTCAGCTTTCTGTAATCG 3' R: 5' CCATACCACGACATTTGACA 3'	62	348
11A	F: 5' TAGCCAGTTGGTTGATTTC 3' R: 5' CCCATCTGTTATGTTGGCTC 3'	64	394
11B	F: 5' CCATGTGGCACAATACTCA 3' R: 5' TGATTGAGACTCCC CATCAT 3'	64	399
11C	F: 5' GAAACTGCCATGCTCAGAGA 3' R: 5' ATTTATTTGTGAGGGGACGC 3'	64	437
11D	F: 5' TCCCCAACTTAAGCATGTA 3' R: 5' AGAAGACTTCCTCTCAGCC 3'	64	437
11E	F: 5' TTCAAACGAAAGCTGAACC 3' R: 5' TTGGAAGGCTAGGATTGACA 3'	64	444
11F	F: 5' GGTAAAGAACCTGCAACTGG 3' R: 5' TCAAATGCTGCACACTGACT 3'	64	416
11G	F: 5' GAAAGGGTTTGCACAACTGA 3' R: 5' TTCTCTTTC TGCATTTCTG 3'	64	381
11H	F: 5' TTTCTGTTGCTCTGAACTGA 3' R: 5' AACCACAGTCGGGAAACA 3'	64	376
11I	F: 5' CTCAGGTTGCAAAACCCCTA 3' R: 5' ATCAC TGCAGGCTTTCC TGT 3'	64	507
11J	F: 5' ACTAATGAAGTGGCTCCAG 3' R: 5' CCAAATGTGTATGGGTGAAA 3'	64	445
11K	F: 5' GATGTTCTGAGATGCC TTTG 3' R: 5' TGATGACCTGTTAGATGATGG 3'	64	401
11L	F: 5' ACCGTTGCTACCGAGTGCT 3' R: 5' GTGCTCCCAAAAGCATAAA 3'	64	438
12	F: 5' GTCCTGCCAATGAGAAGAAAAG 3' R: 5' TGTCAACAACTAAGAATGT 3'	64	267
13	F: 5' AATGGAAGCTTCTCAAAAGTA 3' R: 5' ATGTTGAGCTAGGTCCCTTAC 3'	66	322
14	F: 5' TGTGATCATAGATTGATGC TTTG 3' R: 5' GCAATAAAGTGTATAAATGCCTGT 3'	60	360
15	F: 5' TTGC CAGTCATTTCTGATCT 3' R: 5' AAACCTTGATTAACTTTGAGC 3'	60	484
16	F: 5' AATTCTTAACAGAGACCAGAAC 3' R: 5' AAAAC TCTTCCAGAATGTTGT 3'	60	452
17	F: 5' GTGTAGAAGCTGCAGGATTG 3' R: 5' TCGCCTCATGTGGTTTAA 3'	56	265
18	F: 5' GGCTC TTTAGCTTC TTAGGAC 3' R: 5' GAGACCCATTTTCC CAGCATC 3'	62	354
19	F: 5' CTGTCAATCTTCTGTGCTC 3' R: 5' CATTGTTAAGGAAAGTGGTGC 3'	62	250
20	F: 5' TGACGTGCTGCTCCACTTC 3' R: 5' GGTGGGATGGAAGAGTGAA 3'	62	322
21	F: 5' CAGGTGGTGAACAGAAGAAA 3' R: 5' ACATTTCAACCACTGAGGA 3'	62	300
22	F: 5' CATCCGGAGAGGTAGGGTA 3' R: 5' CATCCATAGGGAC TGACAGG 3'	58	240
23	F: 5' CCTGTCTCAAAACAACA 3' R: 5' CAAGCACCAGGTAATGAGTG 3'	60	235
24	F: 5' TGGAGTCGATTGATTAGAGC 3' R: 5' AGCCAGGACAGTAGAAGAAC 3'	58	301

F = sentido (forward) e R = antissenso (reverse)

Additional file 2. Oligonucleotide used in *BRCA1* gene sequencing.

Exon	Oligonucleotídeos Forward (F) e Reverso (R)	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho	Exon	Oligonucleotídeos Forward (F) e Reverso (R)	Temperatura de anelamento (°C)	Tamanho
2	F: 5' CCAGGAGATGGGACTGAATTAG 3' R: 5' CTGTGACGTACTGGGTTTTAGC 3'	64	311	11 M	F: 5' GCCAGTATTGAAGAAATGTTGAAGATC 3' R: 5' AAACCTTATGTGAATGCGTGCTAC 3'	68-61/61	443
3	F: 5' TTCTTATGATCTTTAACTGTTCTG 3' R: 5' GCTAAGATTTTAACACAGGTTTGC 3'	64	406	11 N	F: 5' AACGAAAATTATGGCAGGTTGTTAC 3' R: 5' GCTTTCCACTTGCTGACTAAATCC 3'	68-61/61	436
4	F: 5' AGAATGCAAAATTTATAATCCAGAGTA 3' R: 5' AATCAGATTGATCTTTATAGAACAAA 3'	62	249	11 O	F: 5' CCAGCTCACAAGAGAAGAAATCTG 3' R: 5' TTACGTTTTAGGTGAAGCCTGTTCT 3'	68-61/61	503
5 + 6	F: 5' TTCCAACAATTTATATGAATGAGAATC 3' R: 5' CTCAGGGCAAAGGTATAACGC 3'	62	362	11 P	F: 5' AAACCCAGAGCACTGTGTAACCTC 3' R: 5' TCTCCTCTCTTTTCCAATCTTG 3'	68-61/61	487
7	F: 5' CCTTAATGATCAGGGCATTTC 3' R: 5' CAACCTCATCTGCTCTTTCTTG 3'	64	214	11 Q	F: 5' TACAGATTCTAACTGCCAAGTCATG 3' R: 5' TAACCATACTCCCCAACTGAC 3'	68-61/61	265
8	F: 5' GTAGATGTGCTTTTGTGCTGAC 3' R: 5' GAGAGACAGCAGAGTTTCACAGG 3'	64	315	12	F: 5' AATTGACATTGAAGACTGACTTTACTC 3' R: 5' AGCACTTTGGAGAGGCGAGG 3'	64	370
9	F: 5' CAGATAACTGAAATCACCAAAAGTG 3' R: 5' ACAACAACAAAAACCTGTAGTTC 3'	62	262	13	F: 5' GCATCCGTTACATTCACTGAAA 3' R: 5' ACGGGAAGTGTAACTTCTTAACG 3'	64	310
10 A	F: 5' TATAAAATATTATGTGCTTCTGTT 3' R: 5' AAAGGGCTTCTGATTTGCTAC 3'	54	374	14 A	F: 5' ACCATGTAGCAAAATGAGGCTCT 3' R: 5' GCTTTTGTCTGTTTCTCTCAA 3'	62	391
10 B	F: 5' ATCTGAAGTGGAAACCAATGATAC 3' R: 5' ACGTGGCAAAGAATCTCTGAAGTAA 3'	64	280	14 B	F: 5' CACAGAGTTGAACAGTGTGTTAGG 3' R: 5' GGCTTTAAATTAACCACTCC 3'	62	297
10 C	F: 5' TTTCAAGAAAGACCTATTAGACA 3' R: 5' CTTTTGATACCTGAAATGAAGAG 3'	62	242	15	F: 5' GGCCAGGGGTTGTGCTTTT 3' R: 5' ATTTCAATCATCCATTCTGC 3'	60	369
10 D	F: 5' TAAAGCAGGCAATATCTGGAACCTCT 3' R: 5' GTGGATATTAACCTGCATTCTCAA 3'	60	295	16	F: 5' TTTGTAAATTCAGTTTGTGTTG 3' R: 5' AGCCAATTTTATGTTGAGAG 3'	60	396
10 E	F: 5' TTTAATTGATAATGGAGCTGG 3' R: 5' TTACAAAAAAGACAGAGGT 3'	56	268	17	F: 5' CAGAGAATAGTTGAGTTGTTGAA 3' R: 5' AGAAACCTTAACCCATCTGC 3'	62	306
11 A	F: 5' TTGTGAGATTTAACTTTTTGGAAG 3' R: 5' CAACCTGGACACTTTCTTTCAG 3'	63-56/56	342	18 A	F: 5' TCAGTTTTATTCTCAGTTATTCAAGT 3' R: 5' GCATACCACCCATCTGTAAGTT 3'	62	298
11 B	F: 5' GCTCAAGAGCATGTCATGG 3' R: 5' TATGAAACCCCAACAGAGTAGGT 3'	63-56/56	394	18 B	F: 5' TGTTTCTGACATAATTTCAATGAGC 3' R: 5' AAACCTTAACCTGCTGAAGATATGC 3'	62	420
11 C	F: 5' GAAAGAAAGTGTCCAGTTG 3' R: 5' ACCACAGTCTCAATAGAAACAAGG 3'	63-56/56	360	19	F: 5' CTTATTACTGTCTTACTAATCTTCCT 3' R: 5' GACCGAACTCCATCTCAAC 3'	64	389
11 D	F: 5' TAGTCACAGTTCCTCAACGA 3' R: 5' TGAGACCATTTGAGATCACAGC 3'	63-56/56	709	20	F: 5' GGTGATCCACTAATCTCAGCCTC 3' R: 5' GTCCCTGTTGCTATTCTTTGTCT 3'	66	451
11 E	F: 5' TGATTGATGGTACTTTAATTTTGTAC 3' R: 5' AGCCAAGACTCTCTTTTATATCTG 3'	63-56/56	338	21	F: 5' GGGTGTGTTTATGCTTGTTCT 3' R: 5' CATTTCAACATATCTTCTCTG 3'	58	303
11 F	F: 5' AAGCTGATTCTCTGTCATGCTG 3' R: 5' GATTTGTGTTTGTGTTGAATTGTACC 3'	63-56/56	456	22	F: 5' AACCAACCTTAAGATGAGC 3' R: 5' GGGCATTAGTAGTGGATTTTGC 3'	62	455
11 G	F: 5' AAAATACATGAGAGTAGCATCAC 3' R: 5' AAATCTTTTAAATTGACACTTGG 3'	63-56/56	330	23	F: 5' ACTTCTTCCATTGCATCTTCTCA 3' R: 5' AAAACAAAACAAAATTCACATA 3'	58	290
11 H	F: 5' CGAACCCATTTTCAAGAACTCTACCA 3' R: 5' TGTAATCATTTTCTG 3'	63-56/56	215	24	F: 5' GCAGCGACAAAAAACTCA 3' R: 5' ATTTGCCAACTGGTAGCTCC 3'	64	365
11 I	F: 5' TTGTTTATGTTCTTGCAAGAGAG 3' R: 5' CCTTTTGCTAGGTGTTAAATTATGG 3'	63-56/56	487	25	F: 5' GCTTTCGCCAAATTCAGCTA 3' R: 5' TACCAAAATGTGTGATGATGC 3'	58	427
11 J	F: 5' TGGCATTAGATAATCAAAGAACTG 3' R: 5' CCTAAACCCCACTTCATTTCTATC 3'	63-56/56	500	26	F: 5' GTCCCAACTTTTCTTTCTGC 3' R: 5' GGAGCCACATAACAACACA 3'	64	379
11 K	F: 5' TGAATCACTGCCATCAAATCTAA 3' R: 5' GAAATTAACGGAGTTTGTG 3'	63-56/56	465	27 A	F: 5' CTGTGTGTAATTTGCGTCT 3' R: 5' GCAAGTCTTCTGCTAGCTATTG 3'	62	495
11 L	F: 5' AATGACTACTGGCACTTTTGTG 3' R: 5' CACTTGCAGTCTGAAAAATGTATC 3'	63-56/56	401	27 B	F: 5' GAATTCCTCTCAGATGACTCCA 3' R: 5' TCTTGTCTATTGTCAACA 3'	62	417

F = senso (forward) e R = antisenso (reverse)

Sample	ID	Average	Stdev
Tumor	402	29,2838	24,5808
	413	35,2194	27,5934
	406	36,5737	29,7472
	416	37,6557	31,5998
	401	37,4398	30,2831
	404	38,9684	31,2011
	415	29,5658	26,5644
	417	41,6143	32,7913
	Mean	35,7901125	29,2951375
Normal	402	41,629	32,3451
	413	31,8173	24,804
	406	20,9754	17,2859
	416	44,3717	33,9972
	401	36,545	28,6825
	404	38,3545	30,0327
	415	34,2078	26,1965
	417	42,46	32,3717
	Mean	36,2950875	28,21445

Additional file 4. Sequencing Depths of tumors and normal samples

Gene	Primer	°C	NM	pb
<i>C2orf57</i>	F: CCTGCAGACTTGGTTCTTCC R: GGACCACACCAGGATGTCTG	62	152614	205
<i>FAM96A</i>	F: CTGGAAGTGGTCTCGGAAAG R: AGTCGCCAAAGAGCAATGAG	60	1289108	108
<i>GRHL2</i>	F: TGACCCTCCATTCAATACCC R: CAGCACTGTCCTCATCACCA	60	24915	128
<i>IL22</i>	F: tgctcaatgtccagaccctta R: caggtggaagggaacagaa	60	20525	219
<i>MTHFD2</i>	F: TGGCTGCGACTTCTCTAATG R: ggagatgttcgggaaggact	60	6636	209
<i>OSR2</i>	F: attgaaaagggtgcagtgg R: CAGATCACAGTTTCGCCTGA	60	1286841	203
<i>PIK3CA</i>	F: GGGAAAAATATGACAAAGAAAGC R: CTGAGATCAGCCAAATTCAGTT	62	6218	220
<i>PIK3CA</i>	F: CTCAATGATGCTTGGCTCTG R: TGGAATCCAGAGTGAGCTTTC	62	6218	198
<i>POC5</i>	F: tgcttcaactccactcattgc R: GGGTGTGAGCTGATCTGGTT	60	1099271	242
<i>PRKAR1A</i>	F: AGTACCGCCGCCAGTGAG R: tcacaatcacctcatcatctcc	62	1276290	203
<i>SEMA6D</i>	F: gtgttcttggttctgctctgg R: cttacCATGGCAGTCCCCTA	60	20858	150
<i>TP53</i>	F: agagacgacagggtggttg R: cttaacccctctcccagag	60	546	216
<i>TTC21B</i>	F: AGATGCAGTTCCTGCACAGA R: tctgaggaaattagaagacatctgg	60	24753	200

Additional file 5. Primers to exons 9 and 20 from *PIK3CA* and other alteration to confirm exome sequencing by Sanger sequencing. F, forward; R, reverse

Exon	NT	Codon	Designation BIC	HGVS cDNA	HGVS Protein	Typo	Global MAF	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar	General	n
2	140	7	140C>T	c.21C>T	p.Arg7=	Syn	A=0.0016/8	ND	ND	ND	1-Neutral	Benign	Benign	1
3	200-65	-	IVS2-65G>C	c.81-65G>C	-	IVS	ND	Unknown	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Uncertain	Benign	1
3	233	38	233G>A	c.114G>A	p.Lys38=	Syn	T=0.0126/63	No	Unknown	ND	2-Likely Neutral	Benign	Benign	1
5	331+23	-	IVS5+23T>A	c.212+23T>A	-	IVS	T=0.0106/53	ND	Unknown	ND	1-Neutral	Benign	Benign	2
6	420+12	-	IVS+12A>C	c.301+12A>C	-	IVS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
7	441+36	-	c.441+36del14	c.441+36del14	-	IVS	ND	ND	ND	ND	1-Neutral	ND	Likely Benign	45
7	441+51	-	IVS7+51delT	c.441+51delT	-	IVS	ND	ND	ND	ND	1-Neutral	ND	Likely Benign	34
9	667-80	-	IVS8-80T>C	c.548-80T>C	-	IVS	ND	ND	ND	ND	1-Neutral	ND	VUS	1
9	667-58	-	IVS8-58delT	c.548-58_548-58delT	-	IVS	-=0.3349/1677	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	36
9	710	197	710C>T	c.591C>T	p.Cys197=	Syn	A=0.0004/2	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	1
10	713-67	-	IVS9-67G>T	c.594-67G>T	-	IVS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
11	1186	356	Q356R	c.1067A>G	p.Gln356Arg	M	C=0.0218/109	Unknown	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	Benign	Benign	9
11	1965	616	S616del	c.1846_1848delTCT	p.Ser616delSer	IFD	-=0.0012/6	Unknown	ND	ND	1-Neutral	Benign	Benign	1
11	2090	657	2090A>G	c.1971A>G	p.Gln657=	Syn	C=0.0064/32	No	ND	ND	1-Neutral	Benign	Benign	1
11	2116	666	2116T>C	c.1997T>C	p.Leu666Pro	M	ND	ND	ND	ND	3-UV	ND	VUS	1
11	2196	693	D693N	c.2077G>A	p.Asp693Asn	M	T=0.0335/168	No	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	Benign	Benign	9
11	2201	694	2201C>T	c.2082C>T	p.Ser694=	Syn	A=0.3365/1685	No	Unknown	ND	1-Neutral	Benign	Benign	45
11	2430	771	L771L	c.2311T>C	p.Leu771=	Syn	G=0.3353/1679	No	Unknown	ND	1-Neutral	Benign	Benign	42
11	2577	820	K820E	c.2458A>G	p.Lys820Glu	M	C=0.0104/52	Unknown	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	Benign	Benign	3
11	2731	871	P871L	c.2612C>T	p.Pro871Leu	M	G=0.4561/2284	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	60

Exon	NT	Codon	Designation BIC	HGVS cDNA	HGVS Protein	Typo	Global MAF	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar	General	n
11	2933	938	2933A>G	c.2814A>G	p.Pro938=	Syn	C=0.0022/11	No	ND	ND	3-UV	Benign	Benign	2
11	3232	1038	E1038G	c.3113A>G	p.Glu1038Gly	M	C=0.3357/1681	No	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	Benign	Benign	43
11	3238	1040	S1040N	c.3119G>A	p.Ser1040Asn	M	T=0.0098/49	Unknown	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	Benign	Benign	3
11	3537	1140	S1140G	c.3418A>G	p.Ser1140Gly	M	C=0.0100/50	Unknown	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	Benign	Benign	2
11	3667	1183	K1183R	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	M	C=0.3526/1766	No	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	Benign	Benign	45
11	3858	1247	V1247I	c.3739G>A	p.Val1247Ile	M	T=0.0006/3	Unknown	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	Benign	Benign	1
13	4427	1436	4427T>C	c.4308T>C	p.Ser1436=	Syn	G=0.3363/1684	No	Unknown	ND	1-Neutral	Benign	Benign	43
13	4466	1449	4466A>G	c.4347A>G	p.Thr1449=	Syn	C=0.0002/1	No	ND	ND	ND	Benign	Benign	1
14	4603+14	-	IVS14+14A>G	c.4484+14A>G	-	IVS	C=0.0022/11	No	No known pathogenicity	ND	2-Likely Neutral	Benign	Benign	1
15	4604-64	-	IVS14-64C>G	c.4485-64C>G	-	IVS	ND	Unknown	ND	ND	ND	ND	Likely Benign	45
16	4956	1613	S1613G	c.4837A>G	p.Ser1613Gly	M	C=0.3558/1782	No	No known pathogenicity	No	1-Neutral	Benign	Benign	45
16	5075	1652	M1652I	c.4956G>A	p.Met1652Ile	M	T=0.0112/56	Unknown	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	Benign	Benign	1
17	5106-92	-	IVS16-92 A>G	c.4987-92A>G	-	IVS	C=0.3546/1776	Unknown	ND	ND	1-Neutral	ND	Likely Benign	44
17	5106-68	-	IVS16-68 A>G	c.4987-68A>G	-	IVS	C=0.3546/1776	No	Unknown	ND	1-Neutral	ND	Benign	44
17	5106-20	-	IVS16-20A>G	c.4987-20A>G	-	IVS	C=0.0024/12	Unknown	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	1
18	5194-53	-	IVS17-53C>T	c.5075-53C>T	-	IVS	A=0.0110/55	No	ND	ND	1-Neutral	Uncertain	Benign	3
18	5271+66	-	IVS18+66 G>A	c.5152+66G>A	-	IVS	T=0.3425/1715	No	Unknown	ND	1-Neutral	ND	Benign	42
18	5271+85	-	IVS18+85 delT	c.5152+85_5152+85delT	-	IVS	ND	Unknown	Unknown	ND	1-Neutral	ND	Likely Benign	4
23	5544	1809	VV1809del	c.5425_5430 delGTTGTG	p.Val1809_Val1810 delValVal	IFD	ND	Unknown	ND	ND	ND	Uncertain	VUS	1
24	5606	1829	E1829K	c.5485G>A	p.Glu1829Lys	M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1

Exon	NT	Codon	Designation BIC	HGVS cDNA	HGVS Protein	Typo	Global MAF	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar	General	n
24	5592+36	-	IVS24+36C>G	c.5592+36C>G	-	IVS	ND	No	ND	ND	ND	ND	VUS	2

Additional file 6. *BRCA1* gene alterations. NT, nucleotide; HGVS, Human Genome Variation Society; Syn, Synonymous; F, Frameshift; IVS, Intervening Sequence; M, Missense; IFD, In Frame Deletion; ND, not determinated; MAF, minor allele frequency; BIC, Breast Cancer Information Core; LOVD, Leiden Open Variation Database; LOVD-IARC, Leiden Open Variation Database - International Agency for Research on Cancer; UMD, Mutation Database Universal; UV, unclassified variant; VUS, variant of uncertain significance; n, number of patients with alteration.

Exon	NT	Codon	Designation BIC	HGVS cDNA	HGVS Protein	Type	Global MAF	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar	General	n
2	203	-	203G>A	c.-26G>A	-	5'UTR	A=0.2093 /1048	No	No known pathogenicity	ND	ND	Benign	Benign	28
2	218	-	218C>T	c.-11C>T	-	5'UTR	T=0.0044/22	No	Unknown	ND	ND	Benign	Benign	1
3	296-38	-	IVS2-38A>G	c.68-38A>G	-	IVS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Likely Benign	26
3	353	42	Y42C	c.125A>G	p.Tyr42Cys	M	G=0.0008/4	Unknown	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	Benign	Benign	1
5-6	516+21	-	IVS6+21A>T	c.516+21A>T	-	IVS	T=0.0090/45	ND	ND	ND	1-Neutral	Likely Benign	Benign	2
7	745-4	-	IVS6-4C>G	c.517-4C>G	-	IVS	G=?/0	Unknown	No known pathogenicity	ND	ND	Uncertain	VUS	1
8	909+56	-	IVS8+56C>T	c.681+56C>T	-	IVS	T=0.1859/931	ND	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Uncertain	Benign	27
10	1093	289	N289H	c.865A>C	p.Asn289His	M	C=0.0737/369	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	10
10		369	N369S	c.1105A>G	p.Asn369Ser	M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
10	1342	372	H372N	c.1114C>A	p.Asn372=	M	C=0.2494/1249	No	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	ND	Benign	27
10	1503	425	E425E	c.1275A>G	p.Glu425=	Syn	G=0.0066/33	No	ND	ND	3-UV	Benign	Benign	1
10	1593	455	1593A>G	c.1365A>G	p.Ser455=	Syn	G=0.0737/369	No	No known pathogenicity	ND	Polymorfism	Benign	Benign	11
11	2457	743	2457T>C	c.2229T>C	p.His743=	Syn	C=0.0735/368	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	10
11	3014	929	L929S	c.2786T>C	p.Leu929Ser	M	C=0.0020/10	No	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	Benign	Benign	1
11	3065	946	D946G	c.2837A>G	p.Asp946Gly	M	ND	Unknown	ND	ND	3-UV	Uncertain	VUS	1
11	3188	987	N987I	c.2960A>T	p.Asn987Ile	M	T=0.0020/10	No	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	Benign	Benign	1
11	3199	991	N991D	c.2971A>G	p.Asn991Asp	M	G=0.0801/401	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	11
11		1078	V1078V	c.3234T>C	p.Val1078Val	Syn	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
11	3492	1088	3492T>C	c.3264T>C	p.Pro1088=	Syn	C=0.0068/34	No	ND	ND	1-Neutral	Benign	Benign	1
11		1117	I1117V	c.3349A>G	p.Ile117Val	M	ND	ND	ND	ND	ND	Uncertain	VUS	1

Exon	NT	Codon	Designation BIC	HGVS cDNA	HGVS Protein	Type	Global MAF	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar	General	n
11	3624	1132	3624A>G	c.3396A>G	p.Lys1132=	Syn	G=0.2668/1336	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	34
11	4035	1269	4035T>C	c.3807T>C	p.Val1269=	Syn	C=0.1681/842	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	26
11	4138	1304	T1304S	c.3910A>T	p.Thr1304Ser	M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
11	4318	1364	I1364L	c.4090A>C	p.Ile1364Leu	M	C=0.0044/22	No	ND	ND	1-Neutral	Benign	Benign	1
11	4415	1396	Q1396R	c.4187A>G	p.Gln1396Arg	M	G=0.0020/10	Unknown	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	Likely Benign	Benign	1
11	4469	1414	T1414M	c.4241C>T	p.Thr1414Met	M	T=0.0024/12	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	1
11	4476	1416	1416A>C	c.4248A>G	p.Gln1416=	Syn	ND	ND	ND	ND	ND	Likely Benign	VUS	1
11	4486	1420	D1420Y	c.4258G>T	p.Asp1420Tyr	M	T=0.0040/20	No	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	Benign	Benign	2
11		1472	K1472E	c.4414A>G	p.Lys1472Glu	M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
11	4791	1521	4791G>A	c.4563G>A	p.Leu1521=	Syn	A=0.0260/130	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	79
11	4909	1561	H1561N	c.4681C>A	p.His1561Asn	M	A=0.0016/8	Unknown	ND	ND	3-UV	Benign	VUS	1
11	5324	1699	D1699G	c.5096A>G	p.Asp1699Gly	M	G=0.0002/1	Unknown	ND	ND	3-UV	Uncertain	VUS	1
11	5642	1805	N1805S	c.5414A>G	p.Asn1805Ser	M	G=?/0	Unknown	No known pathogenicity	ND	ND	Uncertain	VUS	1
11	5646	1806	5646A>G	c.5418A>G	p.Glu1806=	Syn	G=0.0068/34	No	ND	ND	1-Neutral	Benign	Benign	1
11	5932	1902	D1902N	c.5704G>A	p.Asp1902Asn	M	A=0.0062/31	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	1
11	5972	1915	T1915M	c.5744C>T	p.Thr1915Met	M	T=0.0086/43	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	5
11		2026	T2026T	c.6078A>C	p.Thr2026Thr	Syn	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
11	6448	2074	H2074N	c.6220C>A	p.His2074Asn	M	A=0.0028/14	Unknown	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	2-Likely Neutral	Benign	Benign	1
11	6551	2108	R2108H	c.6323G>A	p.Arg2108His	M	A=0.0038/19	Unknown	No known pathogenicity	1-Not pathogenic	1-Neutral	Benign	Benign	1
11	6640	2138	V2138F	c.6412G>T	p.Val2138Phe	M	T=0.0016/8	Unknown	No known pathogenicity	ND	3-UV	Benign	Benign	2

Exon	NT	Codon	Designation BIC	HGVS cDNA	HGVS Protein	Type	Global MAF	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVan	General	n
11	6741	2171	V2171V	c.6513C>G	p.Val2171=	Syn	G=0.0260/130	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	79
11	6782	2185	A2185V	c.6554C>T	p.Ala2185Val	M	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
11	7069+80	-	IVS11+80delTTAA	c.6841+80_6841+83delTTAA	-	IVS	ND	Unknown	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Uncertain	Benign	36
12	770-73	-	IVS12-73T>A	c.6842-73T>A	-	IVS	ND	ND	ND	ND	Desconhecida	ND	VUS	2
14	7245	2339	K2339N	c.7017G>C	p.Lys2339Asn	M	C=0.0068/34	No	ND	ND	2-Likely Neutral	Benign	Benign	1
14	7470	2414	7470A>G	c.7242A>G	p.Ser2414=	Syn	G=0.2326/1165	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	27
14	7547	2440	H2440R	c.7319A>G	p.His2440Arg	M	G=0.0104/52	No	ND	ND	1-Neutral	Benign	Benign	1
14	7625	2466	A2466V	c.7397C>T	p.Ala2466Val	M	T=0.0242/121	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	79
14	7646	2473	C2473Y	c.7418G>A	p.Cys2473Tyr	M	ND	Unknown	ND	ND	ND	Uncertain	VUS	1
14	7663+53	-	IVS14+53C>T	c.7435+53C>T	-	IVS	T=0.0725/363	Unknown	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	ND	Benign	10
15	7697	2490	I2490T	c.7469T>C	p.Ile2490Thr	M	C=0.0160/80	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	4
16	8033+6	-	IVS16+6C>G	c.7805+6C>G	-	IVS	G=0.0016/8	Unknown	ND	ND	2-Likely Neutral	Benign	Benign	1
17	8034-14	-	IVS16-14T>C	c.7806-14T>C	-	IVS	T=0.4685/2346	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	32
18	8320	2698	A2698H	c.8092G>A	p.Ala2698Thr	M	A=?/0	Unknown	No known pathogenicity	ND	ND	Uncertain	VUS	1
19	8560-66	-	IVS18-66T>C	c.8332-66T>C	-	IVS	C=0.0014/7	Unknown	No known pathogenicity	ND	3-UV	Uncertain	VUS	1
19	8715+19	-	IVS19+19A>G	c.8487+19A>G	-	IVS	G=0.0102/51	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	1
19	8715+47	-	IVS19+47C>T	c.8487+47C>T	-	IVS	T=0.0162/81	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Uncertain	Benign	2
20	8488-52	-	IVS19-52A>G	c.8488-52A>G	-	IVS	ND	ND	ND	ND	3-UV	ND	VUS	1
22	8983-50	-	IVS21-50A>G	c.8755-50A>G	-	IVS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1

Exon	NT	Codon	Designation BIC	HGVS cDNA	HGVS Protein	Type	Global MAF	BIC	LOVD	LOVD IARC	UMD	ClinVar	General	n
22	8983-66	-	IVS21-66T>C	c.8755-66T>C	-	IVS	C=0.4884/2446	No	ND	ND	1-Neutral	ND	Benign	58
22	9079	2951	A2951T	c.8851G>A	p.Ala2951Thr	M	A=0.0100/50	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	4
25	9485-83	-	IVS24-83G>A	c.9257-83G>A	-	IVS	A=0.0505/253	No	Unknown	ND	1-Neutral	Uncertain	Benign	8
26	9876+4 1	-	IVS26+41T>A	c.9648+41T>A	-	IVS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
26	9876+5 4	-	IVS26+54G>A	c.9648+54G>A	-	IVS	A=0.0018/9	Unknown	No known pathogenicity	ND	3-UV	Uncertain	VUS	1
26	9876+1 06	-	IVS26+106delT	c.9648+106_964 8+ 106delT	-	IVS	ND	Unknown	No known pathogenicity	ND	2-Likely Neutral	ND	Benign	2
27	9877-68	-	IVS26-68G>A	c.9649-68G>A	-	IVS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	VUS	1
27	9958	3244	V3244I	c.9730G>A	p.Val3244Ile	M	ND	No	ND	ND	3-UV	Benign	Benign	1
27	10338	3370	R3370R	c.10110G>A	p.Arg3370=	Syn	A=0.0008/4	Unknown	Unknown	ND	1-Neutral	Benign	Benign	7
27	10462	3412	I3412V	c.10234A>G	p.Ile3412Val	M	G=0.0449/225	No	No known pathogenicity	ND	1-Neutral	Benign	Benign	8

Additional file 7. BRCA2 gene alterations . NT, nucleotide; HGVS, *Human Genome Variation Society*; Syn, Synonymous; F, Frameshift; IVS, Intervening Sequence; M, Missense; ND, not determined; MAF, minor allele frequency; BIC, Breast Cancer Information Core; LOVD, Leiden Open Variation Database; LOVD-IARC, Leiden Open Variation Database - International Agency for Research on Cancer; UMD, Mutation Database Universal; UV, unclassified variant; VUS, variant of uncertain significance; n, number of patients with alteration.

ID	Age Years	Histol.	HG	ER	PR	HER2	Ki67	Lum.	Stage	FH	Relapse	Died
402	27	ILC	2	pos	pos	neg	30%	B	IIA	Limited	No	No
413	35	IDC	3	pos	pos	neg	35%	B	IIA	Yes	No	No
406	33	IDC	2	pos	pos	neg	10%	A	I	No	No	No
416	27	IDC	2	pos	pos	neg	20%	B	IIA	No	No	No
401	24	IDC	2	pos	pos	neg	35%	B	IIA	Yes	Yes	Yes
404	28	IDC	3	pos	pos	neg	50%	B	IIIA	Limited	No	No
415	32	IDC	2	pos	pos	neg	40%	B	IV	Limited	Yes	No
417	34	IDC	2	pos	pos	neg	5%	A	IA	No	No	No

Additional file 8. Characteristic of exoma sequencing patients. ID, identification of patient; IDC, invasive ductal carcinoma; ILC, invasive lobular carcinoma; HG, histological grade; Lum, luminal; FH, familial history.

Function:	NA	nonsynonymous	stopgain	synonymous	unknown	TOTAL	!synonymous
Min.	1	0,1351	0	0,08108	0	1,324	1,216
1st Qu.	1,149	0,2095	0	0,08108	0	1,635	1,554
Median	1,405	0,2838	0,01351	0,09459	0	1,824	1,676
Mean	1,483	0,2838	0,01351	0,152	0,006757	1,939	1,787
3rd Qu.	1,608	0,3311	0,02703	0,1554	0,006757	2,115	1,946
Max.	2,541	0,4865	0,02703	0,4324	0,02703	3,054	2,919

Additional file 9. Mutation Rates per Megabase observed in tumors. !synonymous means the mutation rates were calculated for all SNVs whose Function was labeled as anything except synonymous.

ID Patient	Gene Symbol	Predicted effects for this variant	Amino Acid Change	Exon
417	ADD3	3_prime_UTR_variant	c.*1516C>T	14
402	AFF3	3_prime_UTR_variant	c.*1567G>A	24
402	BACH2	3_prime_UTR_variant	c.*197G>T	7
416	BAGE2	3_prime_UTR_variant	c.*739A>T	6
417	BAGE2	3_prime_UTR_variant	c.*739A>T	6
402	BAGE2	3_prime_UTR_variant	c.*381A>G	5
413	BCL2L13	3_prime_UTR_variant	c.*1436C>A	4
417	CACNB4	3_prime_UTR_variant	c.*3830G>A	14
406	CDK6	3_prime_UTR_variant	c.*5114C>T	8
417	CDK9	3_prime_UTR_variant	c.*544A>T	7
415	CIAO1	3_prime_UTR_variant	c.*76A>G	7
404	COL14A1	3_prime_UTR_variant	c.*471G>A	48
404	FCHO2	3_prime_UTR_variant	c.*1202G>A	25
402	FGF23	3_prime_UTR_variant	c.*1963G>A	3
417	FKBP5	3_prime_UTR_variant	c.*5977A>G	7
404	GADL1	3_prime_UTR_variant	c.*818T>C	15
402	GPRIN1	3_prime_UTR_variant	c.*587C>A	2
406	HBEGF	3_prime_UTR_variant	c.*311A>C	6
402	HSPE1	3_prime_UTR_variant	c.*49G>A	4
417	IFNW1	3_prime_UTR_variant	c.*64G>A	1
401	KIAA2022	3_prime_UTR_variant	c.*6499C>G	4
406	LILRA1	3_prime_UTR_variant	c.*274A>C	8
402	LIN28B	3_prime_UTR_variant	c.*4028G>A	4
402	LRBA	3_prime_UTR_variant	c.*275T>A	57
416	LRRC20	3_prime_UTR_variant	c.*694C>T	5
415	LRRC55	3_prime_UTR_variant	c.*2996G>C	2
416	LYSMD3	3_prime_UTR_variant	c.*737T>G	3
415	MAGT1	3_prime_UTR_variant	c.*2843T>A	10
416	NBPF14	3_prime_UTR_variant	c.*159C>T	5
416	NBPF14	3_prime_UTR_variant	c.*1351T>G	25
402	NID2	3_prime_UTR_variant	c.*105C>T	22
402	OGN	3_prime_UTR_variant	c.*1334G>A	7
402	OPRK1	3_prime_UTR_variant	c.*1026C>G	4
413	PAIP2B	3_prime_UTR_variant	c.*2771A>C	4
413	PECR	3_prime_UTR_variant	c.*657C>A	8
416	PLA2G5	3_prime_UTR_variant	c.*2C>T	5
413	PLAGL2	3_prime_UTR_variant	c.*3343A>G	3
417	PRRG1	3_prime_UTR_variant	c.*2835G>C	5
415	PTPRT	3_prime_UTR_variant	c.*966G>T	31
404	RMND5A	3_prime_UTR_variant	c.*3134C>T	9
415	RXRA	3_prime_UTR_variant	c.*2930G>T	10
401	SKP1	3_prime_UTR_variant	c.*371C>A	5

ID Patient	Gene Symbol	Predicted effects for this variant	Amino Acid Change	Exon
404	SLC2A4	3_prime_UTR_variant	c.*1130G>C	11
402	SOX11	3_prime_UTR_variant	c.*1319C>T	1
401	SP1	3_prime_UTR_variant	c.*24C>T	6
402	SPEN	3_prime_UTR_variant	c.*902C>T	15
404	SPPL2B	3_prime_UTR_variant	c.*709C>A	15
401	STRBP	3_prime_UTR_variant	c.*328G>C	19
404	TEP1	3_prime_UTR_variant	c.*443G>A	55
416	TGFBR2	3_prime_UTR_variant	c.*1747C>A	8
402	TMEM242	3_prime_UTR_variant	c.*1027A>T	4
416	TPD52	3_prime_UTR_variant	c.*885C>A	6
417	USP24	3_prime_UTR_variant	c.*2532G>T	68
415	VPS53	3_prime_UTR_variant	c.*4680G>C	22
416	VPS53	3_prime_UTR_variant	c.*4680G>C	22
415	VPS53	3_prime_UTR_variant	c.*4679G>A	22
406	VTI1A	3_prime_UTR_variant	c.*571C>G	8
415	ZDHHC11	3_prime_UTR_variant	c.*695C>T	13
413	VSTM2L	5_prime_UTR_premature_start_codon_gain_variant		1
413	ESR1	5_prime_UTR_premature_start_codon_gain_variant		1
402	CEACAM8	5_prime_UTR_variant	c.-73G>T	1
415	ERCC6	5_prime_UTR_variant	c.-155C>T	1
413	PLXNA2	5_prime_UTR_variant	c.-363G>T	1
402	POLR1C	5_prime_UTR_variant	c.-59G>T	1
404	ZNF91	5_prime_UTR_variant	c.-93C>T	1
401	CYBA	downstream_gene_variant		
415	FAM66B	downstream_gene_variant		
416	LOC100288778	downstream_gene_variant		
404	LOC100506990	downstream_gene_variant		
404	LOC100507412	downstream_gene_variant		
416	LOC100507412	downstream_gene_variant		
413	LOC100507412	downstream_gene_variant		
416	LOC100507412	downstream_gene_variant		
415	LOC100507412	downstream_gene_variant		
417	LOC100507412	downstream_gene_variant		
402	LOC100507412	downstream_gene_variant		
413	MGC70870	downstream_gene_variant		
402	REXO1L1	downstream_gene_variant		
417	RNA45S5	downstream_gene_variant		
404	RNA45S5	downstream_gene_variant		
417	RNA45S5	downstream_gene_variant		
402	WHSC1	downstream_gene_variant		
415	ZBTB48	downstream_gene_variant		
413	CNTN3	intergenic_region		

ID Patient	Gene Symbol	Predicted effects for this variant	Amino Acid Change	Exon
402	LOC100132257	intergenic_region		
404	N/A	intergenic_region		
416	N/A	intergenic_region		
417	N/A	intergenic_region		
402	N/A	intergenic_region		
402	N/A	intergenic_region		
416	N/A	intergenic_region		
402	N/A	intergenic_region		
401	N/A	intergenic_region		
413	N/A	intergenic_region		
402	N/A	intergenic_region		
415	N/A	intergenic_region		
402		intergenic_region		
417		intergenic_region		
402		intergenic_region		
402		intergenic_region		
402		intergenic_region		
416		intergenic_region		
413	.	intergenic_region		
413	.	intergenic_region		
401	.	intergenic_region		
413	.	intergenic_region		
402	.	intergenic_region		
402	.	intergenic_region		
404	.	intergenic_region		
406	.	intergenic_region		
402	.	intergenic_region		
402	.	intergenic_region		
404	.	intergenic_region		
402	.	intergenic_region		
417	.	intergenic_region		
402	.	intergenic_region		
417	.	intergenic_region		
413	.	intergenic_region		
413	.	intergenic_region		
401	.	intergenic_region		
416	.	intergenic_region		
413	.	intergenic_region		
415	.	intergenic_region		
417	.	intergenic_region		
417	.	intergenic_region		
417	.	intergenic_region		
417	.	intergenic_region		

ID Patient	Gene Symbol	Predicted effects for this variant	Amino Acid Change	Exon
416	.	intergenic_region		
416	.	intergenic_region		
416	.	intergenic_region		
404	.	intergenic_region		
404	.	intergenic_region		
416	.	intergenic_region		
406	.	intergenic_region		
415	.	intergenic_region		
415	.	intergenic_region		
402	.	intergenic_region		
415	.	intergenic_region		
402	.	intergenic_region		
402	.	intergenic_region		
402	.	intergenic_region		
402	.	intergenic_region		
413	.	intergenic_region		
404	.	intergenic_region		
404	.	intergenic_region		
402	.	intergenic_region		
416	.	intergenic_region		
413	ABCC1	intron_variant	c.2735+11G>A	20
402	ADAM2	intron_variant	c.133-53C>G	2
402	ATP6V1A	intron_variant	c.1291-115G>C	11
402	C1orf105	intron_variant	c.311+24A>T	3
416	CCDC53	intron_variant	c.216+29A>G	3
402	CFLAR	intron_variant	c.606+23G>T	5
402	CFTR	intron_variant	c.1209+83T>G	9
404	CHD1	intron_variant	c.4525-48G>T	32
413	COL4A1	intron_variant	c.2096-58C>T	28
416	COL6A2	intron_variant	c.927+43C>A	8
413	CRIL	intron_variant	c.1415-2148T>C	10
402	CROCCP2	intron_variant	n.724-2221A>G	5
416	CYB561	intron_variant	c.203-19C>T	2
401	ELOVL2	intron_variant	c.67+33G>T	2
415	GALP	intron_variant	c.*18+48G>T	3
402	GPR98	intron_variant	c.14837-64A>T	72
406	HSD17B3	intron_variant	c.454-37C>A	5
406	HSPB1	intron_variant	c.365-17C>T	1
402	LEMD1	intron_variant	c.82+1010G>C	2
404	LOC100507412	intron_variant	n.1815-155T>C	5
416	LOC283788	intron_variant	n.714-2286C>G	3
402	MAFIP	intron_variant	n.148-17750G>C	2
413	MAFIP	intron_variant	n.148-17750G>C	2

ID Patient	Gene Symbol	Predicted effects for this variant	Amino Acid Change	Exon
413	MAFIP	intron_variant	n.148-17779G>A	2
402	MAFIP	intron_variant	n.148-17780C>T	2
416	MGAM	intron_variant	c.3949-25C>A	32
402	MGC39584	intron_variant	n.177-1788G>A	1
417	MGC39584	intron_variant	n.177-1794G>A	1
402	MGC39584	intron_variant	n.177-2072G>A	1
413	MGC39584	intron_variant	n.177-2184C>G	1
417	NBPF1	intron_variant	c.-387-53T>C	3
415	PAGE2B	intron_variant	c.-8-145C>T	1
415	PPAP2A	intron_variant	c.58+2191A>G	1
402	PPL	intron_variant	c.876+90G>C	8
413	PRKG1	intron_variant	c.795+45G>T	6
416	RAD17	intron_variant	c.1423-11T>G	14
417	RNU6-76P	intron_variant	n.35-37420C>T	1
417	STK31	intron_variant	c.1225-25G>A	10
402	TMEM38B	intron_variant	c.660+10119C>G	5
415	TPTE	intron_variant	c.863-306C>T	15
415	TPTE	intron_variant	c.443-225A>G	10
402	WDFY3	intron_variant	c.4850-21A>C	30
413	YBX3	intron_variant	c.327-32C>A	2
413	ZNF419	intron_variant	c.-151-72G>C	1
406	.	intron_variant	n.148-17750G>C	2
413	AK8	missense_variant	p.Thr101Pro/c.301A>C	4
417	AZI2	missense_variant	p.Ile66Val/c.196A>G	2
406	C2orf57	missense_variant	p.Thr265Met/c.794C>T	1
402	CACNA1E	missense_variant	p.Arg590Trp/c.1768C>T	14
417	CALB2	missense_variant	p.Ala30Glu/c.89C>A	1
402	CIITA	missense_variant	p.Pro443Thr/c.1327C>A	11
404	CILP2	missense_variant	p.Arg472Gly/c.1414C>G	8
404	CYP2A7	missense_variant	p.Ser153Ala/c.457T>G	3
404	ELMO3	missense_variant	p.Leu251Phe/c.753G>C	7
417	ENC1	missense_variant	p.Pro300Ala/c.898C>G	2
401	EPPK1	missense_variant	p.Arg2364Gln/c.7091G>A	2
402	FAM65B	missense_variant	p.Glu718Asp/c.2154G>C	15
416	FAM96A	missense_variant	p.Glu75Lys/c.223G>A	2
416	FLG	missense_variant	p.Arg1166Cys/c.3496C>T	3
402	FNBP1L	missense_variant	p.Lys328Asn/c.984G>T	9
401	GLI3	missense_variant	p.Thr943Pro/c.2827A>C	15
402	HECW2	missense_variant	p.Asp265Gly/c.794A>G	7
406	IL22	missense_variant	p.Arg73Cys/c.217C>T	2
401	LONRF3	missense_variant	p.Ala468Thr/c.1402G>A	5
415	LRRC66	missense_variant	p.His434Asn/c.1300C>A	4
415	MAMLD1	missense_variant	p.Ala775Val/c.2324C>T	5

ID Patient	Gene Symbol	Predicted effects for this variant	Amino Acid Change	Exon
401	MTHFD2	missense_variant	p.Pro17Leu/c.50C>T	1
416	MYO1H	missense_variant	p.Glu501Gly/c.1502A>G	14
417	NDST4	missense_variant	p.Val313Phe/c.937G>T	2
402	NES	missense_variant	p.Glu340Val/c.1019A>T	4
413	ODC1	missense_variant	p.Tyr188Ser/c.563A>C	10
406	OSR2	missense_variant	p.Gly262Glu/c.785G>A	4
415	PIK3AP1	missense_variant	p.Gln285Lys/c.853C>A	5
402	PIK3CA	missense_variant	p.Glu545Lys/c.1633G>A	10
406	PIK3CA	missense_variant	p.His1047Arg/c.3140A>G	21
415	PIK3CA	missense_variant	p.His1047Leu/c.3140A>T	21
413	PLA2G4D	missense_variant	p.Ser173Gly/c.517A>G	7
406	POC5	missense_variant	p.Arg541Gln/c.1622G>A	12
413	POLD1	missense_variant	p.Pro146Arg/c.437C>G	4
417	PRICKLE2	missense_variant	p.Pro81Leu/c.242C>T	3
406	PRKAR1A	missense_variant	p.Leu20Phe/c.58C>T	3
415	PRKD1	missense_variant	p.Tyr800Cys/c.2399A>G	16
404	RIMBP2	missense_variant	p.Ala548Asp/c.1643C>A	10
401	RNF213	missense_variant	p.Gln2801Lys/c.8401C>A	29
413	RSBN1	missense_variant	p.Pro148Ser/c.442C>T	1
401	SEMA6D	missense_variant	p.Glu553Ala/c.1658A>C	19
413	SLC13A1	missense_variant	p.Arg277Pro/c.830G>C	8
402	SMURF2	missense_variant	p.Ser193Cys/c.578C>G	8
416	SPATA13	missense_variant	p.Asp797Gly/c.2390A>G	6
402	STAB1	missense_variant	p.Gly1381Arg/c.4141G>A	38
406	TP53	missense_variant	p.Tyr220Cys/c.659A>G	6
416	TTN	missense_variant	p.Leu6228Ser/c.18683T>C	65
416	ZCCHC24	missense_variant	p.Lys123Arg/c.368A>G	2
413	ZNF33A	missense_variant	p.Gly183Val/c.548G>T	6
402	ZNF462	missense_variant	p.Gly2426Cys/c.7276G>T	12
415	FRMD8P1	non_coding_exon_variant	n.327G>A	1
416	LINC00998	non_coding_exon_variant	n.901T>A	3
417	LOC283788	non_coding_exon_variant	n.1004A>T	6
416	LOC441666	non_coding_exon_variant	n.433G>T	3
415	MGC70870	non_coding_exon_variant	n.317G>T	1
401	MGC70870	non_coding_exon_variant	n.390C>A	1
415	MGC70870	non_coding_exon_variant	n.535G>C	1
417	MGC70870	non_coding_exon_variant	n.623C>T	1
415	MGC70870	non_coding_exon_variant	n.627C>T	1
415	MGC70870	non_coding_exon_variant	n.1035G>T	1
402	MGC70870	non_coding_exon_variant	n.1265C>T	1
402	MGC70870	non_coding_exon_variant	n.1332C>A	1
402	MGC70870	non_coding_exon_variant	n.1386G>A	1
416	MGC70870	non_coding_exon_variant	n.1405C>A	1

ID Patient	Gene Symbol	Predicted effects for this variant	Amino Acid Change	Exon
401	MGC70870	non_coding_exon_variant	n.1426G>C	1
413	MGC70870	non_coding_exon_variant	n.1443G>A	1
417	N/A	non_coding_exon_variant	n.281C>A	1
401	N/A	non_coding_exon_variant	n.452C>T	4
406	.	non_coding_exon_variant	n.1048G>A	1
413	ANLN	splice_donor_variant	c.2968T>C	21
404	EML5	splice_donor_variant	c.4238G>T	30
406	ACAP3	splice_region_variant	c.2361C>A	23
404	ASB14	splice_region_variant	c.1432C>G	8
401	HELZ	splice_region_variant	c.558G>T	9
416	IL7R	splice_region_variant	c.801T>G	6
404	MLIP	splice_region_variant	c.2323C>T	6
413	PPP2R5D	splice_region_variant	c.927G>T	12
415	RFX3	splice_region_variant	c.216G>T	3
413	RPL23AP53	splice_region_variant	n.423A>C	3
416	ZNF280D	splice_region_variant	c.2019T>G	16
413	ZNF625	splice_region_variant	c.192G>T	3
417	GRHL2	stop_gained	p.Glu32*/c.94G>T	2
416	GRIN1	stop_gained	p.Gln910*/c.2728C>T	20
404	NOL9	stop_gained	p.Ser283*/c.848C>G	4
415	TTC21B	stop_gained	p.Arg898*/c.2692C>T	20
415	APOB	synonymous_variant	p.Pro1301Pro/c.3903T>G	25
415	ATP2B4	synonymous_variant	p.Ile1011Ile/c.3033C>T	19
415	BMPR1B	synonymous_variant	p.Gly121Gly/c.363A>C	7
406	C5orf52	synonymous_variant	p.Ile93Ile/c.279T>A	2
415	CNTN6	synonymous_variant	p.Val141Val/c.423G>T	5
401	CPEB1	synonymous_variant	p.Val401Val/c.1203G>A	9
404	EIF3J	synonymous_variant	p.Asp199Asp/c.597C>T	7
417	ELN	synonymous_variant	p.Leu625Leu/c.1875C>T	26
415	FGA	synonymous_variant	p.Pro234Pro/c.702C>T	5
415	FPGS	synonymous_variant	p.Leu262Leu/c.786G>T	10
401	GABRA4	synonymous_variant	p.Pro286Pro/c.858C>A	7
415	GEN1	synonymous_variant	p.Gly76Gly/c.228G>A	3
415	JMY	synonymous_variant	p.Tyr576Tyr/c.1728C>T	6
404	KDM4C	synonymous_variant	p.Phe628Phe/c.1884C>T	13
415	MAGEA11	synonymous_variant	p.Ser187Ser/c.561C>A	5
402	MUC6	synonymous_variant	p.Thr1992Thr/c.5976C>T	31
415	NOX4	synonymous_variant	p.Leu56Leu/c.166C>T	3
404	PIK3IP1	synonymous_variant	p.Leu44Leu/c.132C>T	2
416	RUNX1	synonymous_variant	p.Gly95Gly/c.285G>T	2
402	SHOC2	synonymous_variant	p.Pro488Pro/c.1464C>A	7
415	SMC3	synonymous_variant	p.Leu291Leu/c.873T>A	11
402	TACC2	synonymous_variant	p.Glu773Glu/c.2319A>G	4

ID Patient	Gene Symbol	Predicted effects for this variant	Amino Acid Change	Exon
401	TWF2	synonymous_variant	p.Leu178Leu/c.534C>T	6
402	ZNF43	synonymous_variant	p.Tyr125Tyr/c.375T>C	7
402	ACVR2B	upstream_gene_variant		
415	C3	upstream_gene_variant		
416	CD1D	upstream_gene_variant		
401	CSF3R	upstream_gene_variant		
417	LOC101927079	upstream_gene_variant		
413	MAGEA12	upstream_gene_variant		
417	N/A	upstream_gene_variant		
416	ORM2	upstream_gene_variant		
402	ZNF569	upstream_gene_variant		

Additional file 10. Single nucleotide variants of exome sequencing.

Type of alteration	ID								Total
	402	413	406	416	401	404	415	417	
3_prime_UTR_variant	14	4	4	9	4	7	8	8	58
5_prime_UTR_premature_start_codon_gain_variant	0	2	0	0	0	0	0	0	2
5_prime_UTR_variant	2	1	0	0	0	1	1	0	5
downstream_gene_variant	3	2	0	3	1	3	3	3	18
intergenic_region	21	9	2	9	3	7	5	8	64
intron_variant	15	9	3	6	1	2	5	4	45
missense_variant	10	7	7	6	6	4	5	5	50
non_coding_exon_variant	3	1	1	3	3	0	5	3	19
splice_region_variant	0	3	1	2	1	2	1	0	10
splice_donor_variant	0	1	0	0	0	1	0	0	2
stop_gained	0	0	0	1	0	1	1	1	4
synonymous_variant	4	0	1	1	3	3	11	1	24
upstream_gene_variant	2	1	0	2	1	0	1	2	9
Total	74	40	19	42	23	31	46	35	310

Additional file 11. Single nucleotide variants observed in exome sequencing. ID, identification of patient.

Rank	Gene	Alteration	Normal	Tumour	ID
1	<i>PIK3CA</i>	p.Glu545Lys/c.1633G>A	Absent	Present	402
1	<i>PIK3CA</i>	p.His1047Arg/c.3140A>G	Absent	Present	406
1	<i>PIK3CA</i>	p.His1047Leu/c.3140A>T	Absent	Present	415
2	<i>TP53</i>	p.Tyr220Cys/c.659A>G	Absent	Present	406
3	<i>IL22</i>	p.Arg73Cys/c.217C>T	Absent	Present	406
4	<i>PRKARIA</i>	p.Leu20Phe/c.58C>T	Absent	Present	406
5	<i>OSR2</i>	p.Gly262Glu/c.785G>A	Absent	Present	406
6	<i>POC5</i>	p.Arg541Gln/c.1622G>A	Absent	Present	406
7	<i>MTHFD2</i>	p.Pro17Leu/c.50C>T	Absent	Present	401
8	<i>C2orf57</i>	p.Thr265Met/c.794C>T	Absent	Present	406
9	<i>SEMA6D</i>	p.Glu553Ala/c.1658A>C	Absent	Present	401
10	<i>FAM96A</i>	p.Glu75Lys / c.223G>A	Absent	Present	416
17	<i>GRHL2</i>	p.Glu32*/c.94G>T	Absent	Present	417
45	<i>TTC21B</i>	p.Arg898*/c.2692C>T	Absent	Present	415

Additional file 12. Analysis of the alterations detected in exome sequencing by Sanger sequencing. ID, identification of patient

<i>PCNT</i>	M							M														
<i>PIK3CA</i>						M									M		M		M			
<i>PKHD1</i>		Syn	Syn																			
<i>POLD1</i>								M										M				
<i>PRKAR1A</i>											M						M					
<i>PTK6</i>	M					Syn																
<i>RCBTB2</i>										M		N										
<i>RNF149</i>	M							M														
<i>RNF213</i>				M													M					
<i>RYR2</i>						M						M										
<i>STAB1</i>		N														M						
<i>SYNE1</i>		M	M																			
<i>TCIRG1</i>	M											M										
<i>TOP2A</i>				S								N										
<i>TP53</i>	M			F				M									M					
<i>TTN</i>								M													M	
<i>UBR5</i>	M											M										
<i>USH2A</i>											Syn	M										
<i>ZFHX4</i>	M							M														

Additional file 13. Mutated genes in young breast cancer samples analysed in a other articles and our data. ID paper: 237, Yost et al., 2012; 325, Nik-Zainal et al., 2012; 405, Banerji et al., 2012; Stephens et al., 2012; 729, Craig et al., 2013; Mol. Sub. molecular subtype; TN, triplo negative; lum, luminal; nor, normal; NA, não available; M, missense; N, nonsense; F, Frameshift; Syn, synonymous; S, splice site.

8. REFERÊNCIAS

Aceto GM, Solano AR, Neuman MI, Veschi S, Morgano A, Malatesta S, Chacon RD, Pupareli C, Lombardi M, Battista P, Marchetti A, Mariani-Costantini R, Podestà EJ. High-risk human papilloma virus infection, tumor pathophenotypes, and BRCA1/2 and TP53 status in juvenile breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;122(3):671-83.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7(4):248-9.

Afzelius P, Zedeler K, Sommer H, Mouridsen HT, Blichert Toft M. Patient's and doctor's delay in primary breast cancer. Prognostic implications. *Acta Oncol.* 1994;33:345-351.

Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SA, Behjati S, Biankin AV, Bignell GR, Bolli N, Borg A, Børresen-Dale AL, Boyault S, Burkhardt B, Butler AP, Caldas C, Davies HR, Desmedt C, Eils R, Eyfjörd JE, Foekens JA, Greaves M, Hosoda F, Hutter B, Ilcic T, Imbeaud S, Imielinski M, Jäger N, Jones DT, Jones D, Knappskog S, Kool M, Lakhani SR, López-Otín C, Martin S, Munshi NC, Nakamura H, Northcott PA, Pajic M, Papaemmanuil E, Paradiso A, Pearson JV, Puente XS, Raine K, Ramakrishna M, Richardson AL, Richter J, Rosenstiel P, Schlesner M, Schumacher TN, Span PN, Teague JW, Totoki Y, Tutt AN, Valdés-Mas R, van Buuren MM, van 't Veer L, Vincent-Salomon A, Waddell N, Yates LR; Australian Pancreatic Cancer Genome Initiative; ICGC Breast Cancer Consortium; ICGC MMML-Seq Consortium; ICGC PedBrain, Zucman-Rossi J, Futreal PA, McDermott U, Lichter P, Meyerson M, Grimmond SM, Siebert R, Campo E, Shibata T, Pfister SM, Campbell PJ, Stratton MR. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature.* 2013;500(7463):415-21.

Almeida MQ, Stratakis CA. How does cAMP/protein kinase A signaling lead to tumors in the adrenal cortex and other tissues? *Mol Cell Endocrinol.* 2011;336(1-2):162-8.

Althuis MD, Brogan DR, Coates RJ, Daling JR, Gammon MD, Malone KE, Schoenberg JB, Brinton LA. Hormonal content and potency of oral contraceptives and breast cancer risk among young women. *Br J Cancer*. 2003;88(1):50-7.

Anders CK, Acharya CR, Hsu DS, Broadwater G, Garman K, Foekens JA, Zhang Y, Wang Y, Marcom K, Marks JR, Mukherjee S, Nevins JR, Blackwell KL, Potti A. Age-specific differences in oncogenic pathway deregulation seen in human breast tumors. *PLoS One*. 2008;3(1):e1373. (a).

Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, Wang Y, Marcom PK, Marks JR, Febbo PG, Nevins JR, Potti A, Blackwell KL. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol*. 2008;26(20):3324-30. (b).

Ang D, VanSandt AM, Beadling C, Warrick A, West RB, Corless CL, Troxell ML. Biphasic papillary and lobular breast carcinoma with PIK3CA and IDH1 mutations. *Diagn Mol Pathol*. 2012;21(4):221-4.

Antoniou AC, Hardy R, Walker L, Evans DG, Shenton A, Eeles R, Shanley S, Pichert G, Izatt L, Rose S, Douglas F, Eccles D, Morrison PJ, Scott J, Zimmern RL, Easton DF, Pharoah PD. Predicting the likelihood of carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation: validation of BOADICEA, BRCAPRO, IBIS, Myriad and the Manchester scoring system using data from UK genetics clinics. *J Med Genet*. 2008;45(7):425-31.

Arnold N, Gross E, Schwarz-Boeger U, Pfisterer J, Jonat W, Kiechle M. A highly sensitive, fast, and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers. *Hum Mutat*. 1999;14(4):333-9.

Azim HA Jr, Michiels S, Bedard PL, Singhal SK, Criscitiello C, Ignatiadis M, Haibe-Kains B, Piccart MJ, Sotiriou C, Loi S. Elucidating prognosis and biology of breast cancer arising in young women using gene expression profiling. *Clin Cancer Res*. 2012;18(5):1341-51.

Bacchi LM, Corpa M, Santos PP, Bacchi CE, Carvalho FM. Estrogen receptor-positive breast carcinomas in younger women are different from those of older women: a pathological and immunohistochemical study. *Breast*. 2010;19(2):137-41.

Banco de Dados RHC. Incidência de câncer de mama de 2000 a 2011. São Paulo, 2012. Available from <http://www.fosp.saude.sp.gov.br/html/tabnet.html>.

Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, Brown KK, Carter SL, Frederick AM, Lawrence MS, Sivachenko AY, Sougnez C, Zou L, Cortes ML, Fernandez-Lopez JC, Peng S, Ardlie KG, Auclair D, Bautista-Piña V, Duke F, Francis J, Jung J, Maffuz-Aziz A, Onofrio RC, Parkin M, Pho NH, Quintanar-Jurado V, Ramos AH, Rebollar-Vega R, Rodriguez-Cuevas S, Romero-Cordoba SL, Schumacher SE, Stransky N, Thompson KM, Uribe-Figueroa L, Baselga J, Beroukhim R, Polyak K, Sgroi DC, Richardson AL, Jimenez-Sanchez G, Lander ES, Gabriel SB, Garraway LA, Golub TR, Melendez-Zajgla J, Toker A, Getz G, Hidalgo-Miranda A, Meyerson M. Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature*. 2012;486(7403):405-9.

Bastien RR, Rodríguez-Lescure Á, Ebbert MT, Prat A, Munárriz B, Rowe L, Miller P, Ruiz-Borrego M, Anderson D, Lyons B, Álvarez I, Dowell T, Wall D, Seguí MÁ, Barley L, Boucher KM, Alba E, Pappas L, Davis CA, Aranda I, Fauron C, Stijleman IJ, Palacios J, Antón A, Carrasco E, Caballero R, Ellis MJ, Nielsen TO, Perou CM, Astill M, Bernard PS, Martín M. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Med Genomics*. 2012;5:44.

Bastos EP, Brentani H, Pasini FS, Silva AR, Torres CH, Puga RD, Ribeiro Olivieri EH, Piovezani AR, Pereira CA, Machado-Lima A, Carraro DM, Brentani MM. MicroRNAs discriminate familial from sporadic non-BRCA1/2 breast carcinoma arising in patients ≤ 35 years. *PLoS One*. 2014;9(7):e101656.

Benvenuti S, Frattini M, Arena S, Zanon C, Cappelletti V, Coradini D, Daidone MG, Pilotti S, Pierotti MA, Bardelli A. PIK3CA cancer mutations display gender and tissue specificity patterns. *Hum Mutat*. 2008;29(2):284-8.

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.

Bharat A, Aft RL, Gao F, Margenthaler JA. Patient and tumor characteristics associated with increased mortality in young women ($< \text{or} = 40$ years) with breast cancer. *J Surg Oncol*. 2009;100:248–51.

Bilimoria MM, Morrow M. The woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. *CA Cancer J Clin*. 1995;45(5):263-278.

Blay P, Santamaría I, Pitiot AS, Luque M, Alvarado MG, Lastra A, Fernández Y, Paredes A, Freije JM, Balbín M. Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast and ovarian cancer families from Asturias (Northern Spain). *BMC Cancer*. 2013;13:243.

Blesa JR, Garcia JA, Ochoa E: Frequency of germ-line BRCA1 mutations among Spanish families from a Mediterranean area. *Hum Mutat*. 2000;15(4):381-382.

Bleyer A, Viny A, Barr R. Cancer in 15- to 29-year-olds by primary site. *Oncologist*. 2006;11(6):590-601.

Boglev Y, Wilanowski T, Caddy J, Parekh V, Auden A, Darido C, Hislop NR, Cangkrama M, Ting SB, Jane SM. The unique and cooperative roles of the Grainy head-like transcription factors in epidermal development reflect unexpected target gene specificity. *Developmental biology*. 2011;349(2):512-522.

Bonifaci N, Górski B, Masojć B, Wokołorczyk D, Jakubowska A, Dębniak T, Berenguer A, Serra Musach J, Brunet J, Dopazo J, Narod SA, Lubiński J, Lázaro C, Cybulski C, Pujana MA. Exploring the link between germLine and somatic genetic alterations in breast carcinogenesis. *PLoS One*. 2010;5(11):e14078.

Boyd NF, Jensen HM, Cooke G, Han HL. Relationship between mammographic and histological risk factors for breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1992;84(15):1170-9.

Bozhanov SS, Angelova SG, Krasteva ME, Markov TL, Christova SL, Gavrillov IG, Georgieva EI. Alterations in p53, BRCA1, ATM, PIK3CA, and HER2 genes and their effect in modifying clinicopathological characteristics and overall survival of Bulgarian patients with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(11):1657-69.

Brennan M, French J, Houssami N, Kirk J, Boyages J. Breast cancer in young women. *Aust Fam Physician*. 2005;34(10):851-855.

Brennan P, McKay J, Moore L, Zaridze D, Mukeria A, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Rudnai P, Fabianova E, Mates D, Bencko V, Foretova L, Janout V, Chow WH, Rothman N, Chabrier A, Gaborieau V, Odefrey F, Southey M, Hashibe M, Hall J,

Boffetta P, Peto J, Peto R, Hung RJ. Uncommon CHEK2 mis-sense variant and reduced risk of tobacco-related cancers: case control study. *Hum Mol Genet.* 2007;16(15):1794-801.

Buyse M, Loi S, van't Veer L, Viale G, Delorenzi M, Glas AM, d'Assignies MS, Bergh J, Lidereau R, Ellis P, Harris A, Bogaerts J, Therasse P, Floore A, Amakrane M, Piette F, Rutgers E, Sotiriou C, Cardoso F, Piccart MJ; TRANSBIG Consortium. Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(17):1183-92.

Cancello G, Maisonneuve P, Mazza M, Montagna E, Rotmensz N, Viale G, Pruneri G, Veronesi P, Luini A, Gentilini O, Goldhirsch A, Colleoni M. Pathological features and survival outcomes of very young patients with early breast cancer: how much is "very young"? *Breast.* 2013;22(6):1046-51.

Caputo S, Benboudjema L, Sinilnikova O, Rouleau E, Bérout C, Lidereau R; French BRCA GGC Consortium. Description and analysis of genetic variants in French hereditary breast and ovarian cancer families recorded in the UMD-BRCA1/BRCA2 databases. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40(Database issue):D992-1002.

Carraro DM, Koike Folgueira MA, Garcia Lisboa BC, Ribeiro Olivieri EH, Vitorino Krepischi AC, de Carvalho AF, de Carvalho Mota LD, Puga RD, do Socorro Maciel M, Michelli RA, de Lyra EC, Grosso SH, Soares FA, Achatz MI, Brentani H, Moreira-Filho CA, Brentani MM. 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.

Carvalho LV, Pereira EM, Frappart L, Boniol M, Bernardo WM, Tarricone V, Tavtigian S, Southey MC. Molecular characterization of breast cancer in young brazilian women. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56(3): 278-87.

Cauley JA, Song J, Dowsett SA, Mershon JL, Cummings SR. Risk factors for breast cancer in older women: the relative contribution of bone mineral density and other established risk factors. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;102(2):181-8.

Chen FM, Hou MF, Wang JY, Chen TC, Chen DC, Huang SY, Chung YS, Lin SR. High frequency of G/C transversion on p53 gene alterations in breast cancers from Taiwan. *Cancer Lett.* 2004;207(1):59-67.

Cheng L, Wang P, Yang S, Yang Y, Zhang Q, Zhang W, Xiao H, Gao H, Zhang Q. Identification of genes with a correlation between copy number and expression in gastric cancer. *BMC medical genomics.* 2012;5:14.

Church DN, Briggs SE, Palles C, Domingo E, Kearsley SJ, Grimes JM, Gorman M, Martin L, Howarth KM, Hodgson SV; NSECG Collaborators, Kaur K, Taylor J, Tomlinson IP. DNA polymerase ϵ and δ exonuclease domain mutations in endometrial cancer. *Hum Mol Genet.* 2013;22(14):2820-8.

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

Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One.* 2012;7(10):e46688.

Colleoni M, Rotmensz N, Robertson C, Orlando L, Viale G, Renne G, Luini A, Veronesi P, Intra M, Orecchia R, Catalano G, Galimberti V, Nolè F, Martinelli G, Goldhirsch A. Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation. *Ann Oncol.* 2002;13(2):273-9.

Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, Olson JE, Godwin AK, Pankratz VS, Olswold C, Slettedahl S, Hallberg E, Guidugli L, Davila JJ, Beckmann MW, Janni W, Rack B, Ekici AB, Slamon DJ, Konstantopoulou I, Fostira F, Vratimos A, Fountzilas G, Pelttari LM, Tapper WJ, Durcan L, Cross SS, Pilarski R, Shapiro CL, Klemp J, Yao S, Garber J, Cox A, Brauch H, Ambrosone C, Nevanlinna H, Yannoukakos D, Slager SL, Vachon CM, Eccles DM, Fasching PA. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *J Clin Oncol.* 2015;33(4):304-11.

Craig DW, O'Shaughnessy JA, Kiefer JA, Aldrich J, Sinari S, Moses TM, Wong S, Dinh J, Christoforides A, Blum JL, Aitelli CL, Osborne CR, Izatt T, Kurdoglu A, Baker A, Koeman J, Barbacioru C, Sakarya O, De La Vega FM, Siddiqui A, Hoang L, Billings

PR, Salhia B, Tolcher AW, Trent JM, Mousses S, Von Hoff D, Carpten JD. Genome and transcriptome sequencing in prospective metastatic triple-negative breast cancer uncovers therapeutic vulnerabilities. *Mol Cancer Ther.* 2013;12(1):104-16.

Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, Speed D, Lynch AG, Samarajiwa S, Yuan Y, Gräf S, Ha G, Haffari G, Bashashati A, Russell R, McKinney S; METABRIC Group, Langerød A, Green A, Provenzano E, Wishart G, Pinder S, Watson P, Markowetz F, Murphy L, Ellis I, Purushotham A, Børresen-Dale AL, Brenton JD, Tavaré S, Caldas C, Aparicio S. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature.* 2012;486(7403):346-52.

Cybulski C, Górski B, Huzarski T, Masojć B, Mierzejewski M, Debniak T, Teodorczyk U, Byrski T, Gronwald J, Matyjasik J, Zlowocka E, Lenner M, Grabowska E, Nej K, Castaneda J, Medrek K, Szymańska A, Szymańska J, Kurzawski G, Suchy J, Oszurek O, Witek A, Narod SA, Lubiński J. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet.* 2004;75(6):1131-5.

Dawood S. Triple-Negative Breast Cancer Epidemiology and Management Options. *Drugs.* 2010;70 (17):2247-2258. Review. (a)

Dawood S, Broglio K, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Giordano SH. Prognosis of women with metastatic breast cancer by HER2 status and trastuzumab treatment: an institutional-based review. *J Clin Oncol.* 2010;28(1):92-8. (b)

Diez O, Gutiérrez-Enríquez S, Balmaña J. Heterogeneous prevalence of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Spain according to the geographical area: implications for genetic testing. *Fam Cancer.* 2010;9(2):187-91.

Diez O, Osorio A, Durán M, Martínez-Ferrandis JI, de la Hoya M, Salazar R, Vega A, Campos B, Rodríguez-López R, Velasco E, Chaves J, Díaz-Rubio E, Jesús Cruz J, Torres M, Esteban E, Cervantes A, Alonso C, San Román JM, González-Sarmiento R, Miner C, Carracedo A, Eugenia Armengod M, Caldés T, Benítez J, Baiget M. 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;22(4):301-12.

Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW, Harris CC, McLellan MD, Fulton RS, Fulton LL, Abbott RM, Hoog J, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Kalicki J, Zhang Q, Chen L, Lin L, Wendl MC, McMichael JF, Magrini VJ, Cook L, McGrath SD, Vickery TL, Appelbaum E, Deschryver K, Davies S, Guintoli T, Lin L, Crowder R, Tao Y, Snider JE, Smith SM, Dukes AF, Sanderson GE, Pohl CS, Delehaunty KD, Fronick CC, Pape KA, Reed JS, Robinson JS, Hodges JS, Schierding W, Dees ND, Shen D, Locke DP, Wiechert ME, Eldred JM, Peck JB, Oberkfell BJ, Lolofie JT, Du F, Hawkins AE, O'Laughlin MD, Bernard KE, Cunningham M, Elliott G, Mason MD, Thompson DM Jr, Ivanovich JL, Goodfellow PJ, Perou CM, Weinstock GM, Aft R, Watson M, Ley TJ, Wilson RK, Mardis ER. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature*. 2010;464(7291):999-1005.

Dolle JM, Daling JR, White E, Brinton LA, Doody DR, Porter PL, Malone KE. Risk factors for triple-negative breast cancer in women under the age of 45 years. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(4):1157-66.

Dufloth RM, Carvalho S, Heinrich JK, Shinzato JY, dos Santos CC, Zeferino LC, Schmitt F. 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.

Dunlap J, Le C, Shukla A, Patterson J, Presnell A, Heinrich MC, Corless CL, Troxell ML. Phosphatidylinositol-3-kinase and AKT1 mutations occur early in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;120(2):409-18.

Duran M, Esteban-Cardenosa E, Velasco E, Infante M, Miner C. Mutational analysis of BRCA2 in Spanish breast cancer patients from Castilla-Leon: identification of four novel truncating mutations. *Hum Mutat*. 2003;21(4):448.

Durocher F, Tonin P, Shattuck-Eidens D, Skolnick M, Narod SA, Simard J: Mutation analysis of the BRCA1 gene in 23 families with cases of cancer of the breast, ovary, and multiple other sites. *J Med Genet*. 1996;33(10):814-819.

Dutra MC, Rezende MA, de Andrade VP, Soares FA, Ribeiro MV, de Paula EC, Gobbi H. [Immunophenotype and evolution of breast carcinomas: a comparison between very young and postmenopausal women]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009;31(2):54-60.

Eachkoti R, Hussain I, Afroze D, Aejazaziz S, Jan M, Shah ZA, Das BC, Siddiqi MA. BRCA1 and TP53 mutation spectrum of breast carcinoma in an ethnic population of Kashmir, an emerging high-risk area. *Cancer Lett.* 2007;248(2):308-20.

El Saghir NS, Seoud M, Khalil MK, Charafeddine M, Salem ZK, Geara FB, Shamseddine AI. Effects of young age at presentation on survival in breast cancer. *BMC Cancer.* 2006;6:194.

Ellis MJ, Ding L, Shen D, Luo J, Suman VJ, Wallis JW, Van Tine BA, Hoog J, Goiffon RJ, Goldstein TC, Ng S, Lin L, Crowder R, Snider J, Ballman K, Weber J, Chen K, Koboldt DC, Kandoth C, Schierding WS, McMichael JF, Miller CA, Lu C, Harris CC, McLellan MD, Wendl MC, DeSchryver K, Allred DC, Esserman L, Unzeitig G, Margenthaler J, Babiera GV, Marcom PK, Guenther JM, Leitch M, Hunt K, Olson J, Tao Y, Maher CA, Fulton LL, Fulton RS, Harrison M, Oberkfell B, Du F, Demeter R, Vickery TL, Elhammali A, Piwnica-Worms H, McDonald S, Watson M, Dooling DJ, Ota D, Chang LW, Bose R, Ley TJ, Piwnica-Worms D, Stuart JM, Wilson RK, Mardis ER. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature.* 2012;486(7403):353-60.

Ellis MJ, Perou CM. The genomic landscape of breast cancer as a therapeutic roadmap. *Cancer Discov.* 2013;3(1):27-34.

Enger SM, Ross RK, Henderson B, Bernstein L. Breastfeeding history, pregnancy experience and risk of breast cancer. *Br J Cancer.* 1997;76(1):118-23.

Esteban Cardenosa E, Bolufer Gilabert P, Palanca Suela S, Barragan Gonzalez E, Oltra Soler S, Chirivella Gonzalez I, Segura Huerta A, Guillen Ponce C, Martinez de Duenas E, Cuevas Cuerda D: [BRCA1 and BRCA2 mutations in families studied in the program of genetic counselling in cancer of the Valencian community (Spain)]. *Med Clin (Barc).* 2008;130(4):121-126.

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;32(5):557-63.

Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, Leung K, Bindal N, Boutselakis H, Ding M, Bamford S, Cole C, Ward S, Kok CY, Jia M, De T, Teague JW, Stratton MR,

McDermott U, Campbell PJ. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D805-11.

Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King MC. Confirmation of BRCA1 by analysis of germLine mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet.* 1994;8(4):399-404.

Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer.* 2004; 4(3):177-183.

Farrugia, D. J., Agarwal, M. K., Pankratz, V. S., Deffenbaugh, A. M., Pruss, D., Frye, C., Wadum, L., Johnson, K., Mentlick, J., Tavtigian, S. V., Goldgar, D. E., and Couch, F. J. Functional assays for classification of BRCA2 variants of uncertain significance. *Cancer Res.* 2008;68: 3523-3531.

Gao Q, Adebamowo CA, Fackenthal J, Das S, Sveen L, Falusi AG, Olopade OI. Protein truncating BRCA1 and BRCA2 mutations in African women with pre-menopausal breast cancer. *Hum Genet.* 2000;107(2):192-4.

Gentile M, Bergman Jungeström M, Olsen KE, Söderkvist P, Wingren S. p53 and survival in early onset breast cancer: analysis of gene mutations, loss of heterozygosity and protein accumulation. *Eur J Cancer.* 1999; 35(8):1202-7.

Gomez García EB, Oosterwijk JC, Timmermans M, van Asperen CJ, Hogervorst FB, Hoogerbrugge N, Oldenburg R, Verhoef S, Dommering CJ, Ausems MG, van Os TA, van der Hout AH, Ligtenberg M, van den Ouweland A, van der Luijt RB, Wijnen JT, Gille JJ, Lindsey PJ, Devilee P, Blok MJ, Vreeswijk MP. A method to assess the clinical significance of unclassified variants in the BRCA1 and BRCA2 genes based on cancer family history. *Breast Cancer Res.* 2009;11(1):R8.

Gonzalez-Angulo AM, Broglio K, Kau SW, Eralp Y, Erlichman J, Valero V, Theriault R, Booser D, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Arun B. Women age < or = 35 years with primary breast carcinoma: disease features at presentation. *Cancer.* 2005;103(12):2466-72.

Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S,

Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 2007;446(7132):153-8.

Grodstein F, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Joffe M, Rosner B, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ, Hennekens CH, Speizer FE. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *N Engl J Med*. 1997;336(25):1769-75.

Habel LA, Shak S, Jacobs MK, Capra A, Alexander C, Pho M, Baker J, Walker M, Watson D, Hackett J, Blick NT, Greenberg D, Fehrenbacher L, Langholz B, Quesenberry CP. A population-based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. *Breast Cancer Res*. 2006;8(3):R25.

Haffty BG, Choi DH, Goyal S, Silber A, Ranieri K, Matloff E, Lee MH, Nissenblatt M, Toppmeyer D, Moran MS. Breast cancer in young women (YBC): prevalence of BRCA1/2 mutations and risk of secondary malignancies across diverse racial groups. *Ann Oncol*. 2009;20(10):1653-9.

Hamel N, Feng BJ, Foretova L, Stoppa-Lyonnet D, Narod SA, Imyanitov E, Sinilnikova O, Tihomirova L, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Hansen Tv, Nielsen FC, Thomassen M, Yannoukakos D, Konstantopoulou I, Zajac V, Ciernikova S, Couch FJ, Greenwood CM, Goldgar DE, Foulkes WD. On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations. *Eur J Hum Genet*. 2011;19(3):300-6.

Hernandez L, Wilkerson PM, Lambros MB, Campion-Flora A, Rodrigues DN, Gauthier A, Cabral C, Pawar V, Mackay A, A'hern R, Marchiò C, Palacios J, Natrajan R, Weigelt B, Reis-Filho JS. Genomic and mutational profiling of ductal carcinomas in situ and matched adjacent invasive breast cancers reveals intra-tumour genetic heterogeneity and clonal selection. *J Pathol*. 2012;227(1):42-52.

Holli K, Isola J. Effect of age on the survival of breast cancer patients. *Eur J Cancer*. 1997;33:425-428.

Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*. 2001;38(1):103-1.

Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. *Maturitas*. 2008;61(1-2):203-13.

Hunter DJ, Colditz GA, Hankinson SE, Malspeis S, Spiegelman D, Chen W, Stampfer MJ, Willett WC. Oral contraceptive use and breast cancer: a prospective study of young women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;19(10):2496-502.

INCA. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/tabelaestados.asp?UF=BR>.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. *Cancer statistics, 2010*. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(5):277-300.

Jiao X, Hooper SD, Djureinovic T, Larsson C, Wärnberg F, Tellgren-Roth C, Botling J, Sjöblom T. Gene rearrangements in hormone receptor negative breast cancers revealed by mate pair sequencing. *BMC Genomics*. 2013;14:165.

Jong YJ, Li LH, Tsou MH, Chen YJ, Cheng SH, Wang-Wuu S, Tsai SF, Chen CM, Huang AT, Hsu MT, Lin CH. Chromosomal comparative genomic hybridization abnormalities in early- and late-onset human breast cancers: correlation with disease progression and TP53 mutations. *Cancer Genet Cytogenet*. 2004;148(1):55-65.

Kahlenborn C, Modugno F, Potter DM, Severs WB. Oral contraceptive use as a risk factor for premenopausal breast cancer: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(10):1290-302.

Kalinsky K, Jacks LM, Heguy A, Patil S, Drobnjak M, Bhanot UK, Hedvat CV, Traina TA, Solit D, Gerald W, Moynahan ME. PIK3CA mutation associates with improved outcome in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(16):5049-59.

Kang X, Chen W, Kim RH, Kang MK, Park NH. Regulation of the hTERT promoter activity by MSH2, the hnRNPs K and D, and GRHL2 in human oral squamous cell carcinoma cells. *Oncogene*. 2009;28(4):565-574.

Karami F, Mehdipour P. A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. *Biomed Res Int*. 2013;2013:928562.

- Keegan TH, Derouen MC, Press DJ, Kurian AW, Clarke CA. Occurrence of breast cancer subtypes in adolescent and young adult women. *Breast Cancer Res.* 2012;14(2):R55.
- Kim N, Hong Y, Kwon D, Yoon S. Somatic mutome profile in human cancer tissues. *Genomics Inform.* 2013;11(4):239-44.
- Klauber-DeMore N. Tumor biology of breast cancer in young women. *Breast Dis.* 2005-2006; 23:9-15.
- Kollias J, Elston CW, Ellis IO, Robertson JF, Blamey RW. Early-onset breast cancer—histopathological and prognostic considerations. *Br J Cancer.* 1997;75:1318-1323.
- Kroman N, Jensen MB, Wohlfahrt J, Mouridsen HT, Andersen PK, Melbye M. Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study. *BMJ.* 2000;320(7233):474-478.
- Kurian AW. BRCA1 and BRCA2 mutations across race and ethnicity: distribution and clinical implications. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010;22(1):72-8.
- Kutznetsov SG, Liu P, Sharan SK. Mouse embryonic stem cell based functional assay to evaluate mutations in BRCA2. *Nat. Med.* 2008;1: 875- 881.
- Labeit S, Kolmerer B, Linke WA. The giant protein titin. Emerging roles in physiology and pathophysiology. *Circ Res.* 1997;80(2):290-4.
- Lalloo F, Varley J, Moran A, Ellis D, O'dair L, Pharoah P, Antoniou A, Hartley R, Shenton A, Seal S, Bulman B, Howell A, Evans DG. BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. *Eur J Cancer.* 2006;42(8):1143-50.
- Lamkanfi M, Kanneganti TD. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(1):21-24.
- Landrum MJ, Lee JM, Riley GR, Jang W, Rubinstein WS, Church DM, Maglott DR. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D980-5.

Lavarino C, Corletto V, Mezzelani A, Della Torre G, Bartoli C, Riva C, Pierotti MA, Rilke F, Pilotti S. Detection of TP53 mutation, loss of heterozygosity and DNA content in fine-needle aspirates of breast carcinoma. *Br J Cancer*. 1998;77(1):125-30.

Leary RJ, Lin JC, Cummins J, Boca S, Wood LD, Parsons DW, Jones S, Sjöblom T, Park BH, Parsons R, Willis J, Dawson D, Willson JK, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Kopelovich L, Papadopoulos N, Pennacchio LA, Wang TL, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Integrated analysis of homozygous deletions, focal amplifications, and sequence alterations in breast and colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(42):16224-9.

Lee AJ, Cunningham AP, Kuchenbaecker KB, Mavaddat N, Easton DF, Antoniou AC. Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2; Breast Cancer Association Consortium. BOADICEA breast cancer risk prediction model: updates to cancer incidences, tumour pathology and web interface. *Br J Cancer*. 2014;110(2):535-45.

Liedtke C, Cardone L, Tordai A, Yan K, Gomez HL, Figureoa LJ, Hubbard RE, Valero V, Souchon EA, Symmans WF, Hortobagyi GN, Bardelli A, Pusztai L. PIK3CA-activating mutations and chemotherapy sensitivity in stage II-III breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008;10(2):R27.

Lien HC, Lin CW, Mao TL, Kuo SH, Hsiao CH, Huang CS. p53 overexpression and mutation in metaplastic carcinoma of the breast: genetic evidence for a monoclonal origin of both the carcinomatous and the heterogeneous sarcomatous components. *J Pathol*. 2004;204(2):131-9.

Lima EU, Soares IC, Danilovic DL, Marui S. New mutation in the PTEN gene in a Brazilian patient with Cowden's syndrome. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2012;56(8):592-6.

Loi S, Michiels S, Lambrechts D, Fumagalli D, Claes B, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Kataja V, Piccart MJ, Joensuu H, Sotiriou C. Somatic mutation profiling and associations with prognosis and trastuzumab benefit in early breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(13):960-7.

Loizidou M, Marcou Y, Anastasiadou V, Newbold R, Hadjisavvas A, Kyriacou K. Contribution of BRCA1 and BRCA2 germLine mutations to the incidence of early-onset breast cancer in Cyprus. *Clin Genet*. 2007;71(2):165-70.

Madigan MP, Ziegler RG, Benichou J, Byrne C, Hoover RN. Proportion of breast cancer cases in the United States explained by well-established risk factors. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(22):1681-5.

Mangone FR, Bobrovnitchaia IG, Salaorni S, Manuli E, Nagai MA. PIK3CA exon 20 mutations are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Clinics* (Sao Paulo). 2012; 67(11):1285-90.

Marrett LD, Froid J, Nishri D, Ugnat AM. Cancer in Young Adults in Canada (CYAC) Working Group. Cancer incidence in young adults in Canada: preliminary results of a cancer surveillance project. *Chronic Dis Can*. 2002;23(2):58-64.

Martins FC, De S, Almendro V, Gönen M, Park SY, Blum JL, Herlihy W, Ethington G, Schnitt SJ, Tung N, Garber JE, Fette K, Michor F, Polyak K. Evolutionary pathways in BRCA1-associated breast tumors. *Cancer Discov*. 2012;2(6):503-11.

Masri MA, Abdel Seed NM, Fahal AH, Romano M, Baralle F, El Hassam AM, Ibrahim ME. Minor role for BRCA2 (exon11) and p53 (exon 5-9) among Sudanese breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2002;71(2):145-7.

Maruyama N, Miyoshi Y, Taguchi T, Tamaki Y, Monden M, Noguchi S. Clinicopathologic analysis of breast cancers with PIK3CA mutations in Japanese women. *Clin Cancer Res*. 2007;13(2 Pt 1):408-14.

Mathe E, Olivier M, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Tavtigian SV. Computational approaches for predicting the biological effect of p53 missense mutations: a comparison of three sequence analysis based methods. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(5):1317-25.

McKean-Cowdin R1, Spencer Feigelson H, Xia LY, Pearce CL, Thomas DC, Stram DO, Henderson BE. BRCA1 variants in a family study of African-American and Latina women. *Hum Genet*. 2005;116(6):497-506.

Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second generation sequencing. *Nat Rev Genet*. 2010;11(10):658-96.

Miron A, Varadi M, Carrasco D, Li H, Luongo L, Kim HJ, Park SY, Cho EY, Lewis G, Kehoe S, Iglehart JD, Dillon D, Allred DC, Macconnaill L, Gelman R, Polyak K. PIK3CA mutations in in situ and invasive breast carcinomas. *Cancer Res.* 2010;70(14):5674-8.

Mohammadi L, Vreeswijk MP, Oldenburg R, van den Ouweland A, Oosterwijk JC, van der Hout AH, Hoogerbrugge N, Ligtenberg M, Ausems MG, van der Luijt RB, Dommering CJ, Gille JJ, Verhoef S, Hogervorst FB, van Os TA, Gómez García E, Blok MJ, Wijnen JT, Helmer Q, Devilee P, van Asperen CJ, van Houwelingen HC. A simple method for co-segregation analysis to evaluate the pathogenicity of unclassified variants; BRCA1 and BRCA2 as an example. *BMC Cancer.* 2009;9:211.

Narod SA. Breast cancer in young women. *Nat Rev Clin Oncol.* 2012;9(8):460-70.

Natrajan R, Little SE, Reis-Filho JS, Hing L, Messahel B, Grundy PE, Dome JS, Schneider T, Vujanic GM, Pritchard-Jones K, Jones C. Amplification and overexpression of CACNA1E correlates with relapse in favorable histology Wilms' tumors. *Clin Cancer Res.* 2006;12(24):7284-93.

Neuhausen SL, Godwin AK, Gershoni-Baruch R, Schubert E, Garber J, Stoppa-Lyonnet D, Olah E, Csokay B, Serova O, Lalloo F, Osorio A, Stratton M, Offit K, Boyd J, Caligo MA, Scott RJ, Schofield A, Teugels E, Schwab M, Cannon-Albright L, Bishop T, Easton D, Benitez J, King MC, Ponder BA, Weber B, Devilee P, Borg A, Narod SA, Goldgar D. Haplotype and phenotype analysis of nine recurrent BRCA2 mutations in 111 families: results of an international study. *Am J Hum Genet.* 1998;62(6):1381-8.

Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc D, Ebbert M, Vickery T, Davies SR, Snider J, Stijleman IJ, Reed J, Cheang MC, Mardis ER, Perou CM, Bernard PS, Ellis MJ. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2010;16(21):5222-32.

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

Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Van Loo P, Greenman CD, Raine K, Jones D, Hinton J, Marshall J, Stebbings LA, Menzies A, Martin S, Leung K, Chen L, Leroy

C, Ramakrishna M, Rance R, Lau KW, Mudie LJ, Varela I, McBride DJ, Bignell GR, Cooke SL, Shlien A, Gamble J, Whitmore I, Maddison M, Tarpey PS, Davies HR, Papaemmanuil E, Stephens PJ, McLaren S, Butler AP, Teague JW, Jönsson G, Garber JE, Silver D, Miron P, Fatima A, Boyault S, Langerød A, Tutt A, Martens JW, Aparicio SA, Borg Å, Salomon AV, Thomas G, Børresen-Dale AL, Richardson AL, Neuberger MS, Futreal PA, Campbell PJ, Stratton MR; Breast Cancer Working Group of the International Cancer Genome Consortium. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell*. 2012;149(5):979-93.

Okasha M, McCarron P, Gunnell D, Smith GD. Exposures in childhood, adolescence and early adulthood and breast cancer risk: a systematic review of the literature. *Breast Cancer Res Treat*. 2003;78(2):223-76. Review.

Olivier M, Langerød A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bièche I, Varley J, Bignon Y, Uhrhammer N, Winqvist R, Jukkola-Vuorinen A, Niederacher D, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Børresen-Dale AL. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(4):1157-67.68.

Opitz CA, Kulke M, Leake MC, Neagoe C, Hinssen H, Hajjar RJ, Linke WA. Damped elastic recoil of the titin spring in myofibrils of human myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(22):12688-93.

Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, Davies S, Fauron C, He X, Hu Z, Quackenbush JF, Stijleman IJ, Palazzo J, Marron JS, Nobel AB, Mardis E, Nielsen TO, Ellis MJ, Perou CM, Bernard PS. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160-7.

Paik S, Tang G, Shak S, Kim C, Baker J, Kim W, Cronin M, Baehner FL, Watson D, Bryant J, Costantino JP, Geyer CE Jr, Wickerham DL, Wolmark N. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24(23):3726-34.

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER, Wickerham DL, Bryant J, Wolmark N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(27):2817-26.

Parkin DM, Ferlay J, Curado MP, Bray F, Edwards B, Shin HR, Forman D. Fifty years of cancer incidence: CI5 I-IX. *Int J Cancer*. 2010; 127(12):2918-2927.

Peng R, Wang S, Shi Y, Liu D, Teng X, Qin T, Zeng Y, Yuan Z. Patients 35 years old or younger with operable breast cancer are more at risk for relapse and survival: a retrospective matched case-control study. *Breast*. 2011;20(6):568-73.

Perou CM, Sorlie 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;406(6797):747-52.

Pestka S, Krause CD, Sarkar D, Walter MR, Shi Y, Fisher PB. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:929-79. Review.]

Prickett TD, Zerlanko BJ, Hill VK, Gartner JJ, Qutob N, Jiang J, Simaan M, Wunderlich J, Gutkind JS, Rosenberg SA, Samuels Y. Somatic mutation of GRIN2A in malignant melanoma results in loss of tumor suppressor activity via aberrant NMDAR complex formation. *J Invest Dermatol*. 2014;134(9):2390-8.

Ravert PK, Huffaker C. Breast cancer screening in women: An integrative literature review. *J Am Acad Nurse Pract*. 2010;22(12):668-673.

Rebora P, Czene K, Reilly M. Timing of familial breast cancer in sisters. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(10):721-7.

Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Clegg L, Horner MJ, Howlader N, Eisner MP, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/, based on November 2006 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2007. (<http://seer.cancer.gov/stafacts/html/breast.html>).

Ripamonti CB, Colombo M, Mondini P, Siranoush M, Peissel B, Bernard L, Radice P, Carcangiu ML. First description of an acinic cell carcinoma of the breast in a BRCA1 mutation carrier: a case report. *BMC Cancer*. 2013;13:46.

Salazar R, Cruz-Hernandez JJ, Sanchez-Valdivieso E, Rodriguez CA, Gomez-Bernal A, Barco E, Fonseca E, Portugal T, Gonzalez-Sarmiento R. BRCA1-2 mutations in breast

cancer: identification of nine new variants of BRCA1-2 genes in a population from central Western Spain. *Cancer Lett.* 2006;233(1):172-7.

Santarpia L, Qi Y, Stemke-Hale K, Wang B, Young EJ, Booser DJ, Holmes FA, O'Shaughnessy J, Hellerstedt B, Pippen J, Vidaurre T, Gomez H, Valero V, Hortobagyi GN, Symmans WF, Bottai G, Di Leo A, Gonzalez-Angulo AM, Pusztai L. Mutation profiling identifies numerous rare drug targets and distinct mutation patterns in different clinical subtypes of breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2012;134(1):333-43.

Senga K, Mostov KE, Mitaka T, Miyajima A, Tanimizu N. Grainyhead-like 2 regulates epithelial morphogenesis by establishing functional tight junctions through the organization of a molecular network among claudin3, claudin4, and Rab25. *Molecular biology of the cell.* 2012;23(15):2845-2855.

Seppälä EH, Ikonen T, Mononen N, Autio V, Rökman A, Matikainen MP, Tammela TL, Schleutker J. CHEK2 variants associate with hereditary prostate cancer. *Br J Cancer.* 2003;89(10):1966-70.

Shah SP, Morin RD, Khattra J, Prentice L, Pugh T, Burleigh A, Delaney A, Gelmon K, Guliany R, Senz J, Steidl C, Holt RA, Jones S, Sun M, Leung G, Moore R, Severson T, Taylor GA, Teschendorff AE, Tse K, Turashvili G, Varhol R, Warren RL, Watson P, Zhao Y, Caldas C, Huntsman D, Hirst M, Marra MA, Aparicio S. Mutational evolution in a lobular breast tumour profiled at single nucleotide resolution. *Nature.* 2009;461(7265):809-13.

Sidoni A, Cavaliere A, Bellezza G, Scheibel M, Bucciarelli E. Breast cancer in young women: clinicopathological features and biological specificity. *Breast.* 2003;12(4):247-250.

Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin.* 2011;61(4):212-236.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012 Jan-Feb;62(1):10-29.

Siegel R, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:5-29.

Simão TA, Ribeiro FS, Amorim LM, Albano RM, Andrada-Serpa MJ, Cardoso LE, Mendonça GA, de Moura-Gallo CV. TP53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio de Janeiro, Brazil: association with risk factors and tumor characteristics. *Int J Cancer*. 2002;101(1):69-73.

Simon R, Zhang X. On the dynamics of breast tumor development in women carrying germline BRCA1 and BRCA2 mutations. *Int J Cancer*. 2008;122(8):1916-7.

Sjöblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Buckhaults P, Farrell C, Meeh P, Markowitz SD, Willis J, Dawson D, Willson JK, Gazdar AF, Hartigan J, Wu L, Liu C, Parmigiani G, Park BH, Bachman KE, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW, Velculescu VE. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science*. 2006;314(5797):268-74.

Sobol H, Stoppa-Lyonnet D, Bressac-de-Paillerets B, Peyrat JP, Kerangueven F, Janin N, Noguchi T, Eisinger F, Guinebretiere JM, Jacquemier J, Birnbaum D. Truncation at conserved terminal regions of BRCA1 protein is associated with highly proliferating hereditary breast cancers. *Cancer Res*. 1996;56(14):3216-9.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-74.

Stadler ZK, Thom P, Robson ME, Weitzel JN, Kauff ND, Hurley KE, Devlin V, Gold B, Klein RJ, Offit K. Genome-wide association studies of cancer. *J Clin Oncol*. 2010;28(27):4255-67.

Stephens PJ, McBride DJ, Lin ML, Varela I, Pleasance ED, Simpson JT, Stebbings LA, Leroy C, Edkins S, Mudie LJ, Greenman CD, Jia M, Latimer C, Teague JW, Lau KW, Burton J, Quail MA, Swerdlow H, Churcher C, Natrajan R, Sieuwerts AM, Martens JW, Silver DP, Langerød A, Russnes HE, Foekens JA, Reis-Filho JS, van 't Veer L, Richardson AL, Børresen-Dale AL, Campbell PJ, Futreal PA, Stratton MR. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature*. 2009;462(7276):1005-10.

Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, Van Loo P, Greenman C, Wedge DC, Nik-Zainal S, Martin S, Varela I, Bignell GR, Yates LR, Papaemmanuil E, Beare D, Butler A, Cheverton A, Gamble J, Hinton J, Jia M, Jayakumar A, Jones D, Latimer C, Lau KW, McLaren S, McBride DJ, Menzies A, Mudie L, Raine K, Rad R, Chapman MS, Teague J, Easton D, Langerød A; Oslo Breast Cancer Consortium (OSBREAC), Lee MT, Shen CY, Tee BT, Huimin BW, Broeks A, Vargas AC, Turashvili G, Martens J, Fatima A, Miron P, Chin SF, Thomas G, Boyault S, Mariani O, Lakhani SR, van de Vijver M, van 't Veer L, Foekens J, Desmedt C, Sotiriou C, Tutt A, Caldas C, Reis-Filho JS, Aparicio SA, Salomon AV, Børresen-Dale AL, Richardson AL, Campbell PJ, Futreal PA, Stratton MR. The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*. 2012;486(7403):400-4.

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

Stuart DI, Jones EY, Harlos K, Esnouf RM, Love CA. "Structure determination of human semaphorin 4D as an example of the use of MAD in non-optimal cases". *Acta Crystallogr*. 2006;D 62 (Pt 1): 108–15.

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.

Tanaka Y, Kanai F, Tada M, Tateishi R, Sanada M, Nannya Y, Ohta M, Asaoka Y, Seto M, Shiina S, Yoshida H, Kawabe T, Yokosuka O, Ogawa S, Omata M. Gain of GRHL2 is associated with early recurrence of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2008;49(5):746-57.

Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L, Judkins T, Scholl T, Samollow PB, de Silva D, Zharkikh A, Thomas A. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J Med Genet*. 2006;43(4):295-305.

Toniolo P, Koenig KL, Pasternack BS, Banerjee S, Rosenberg C, Shore RE, Strax P, Levitz M. Reliability of measurements of total, protein-bound, and unbound estradiol in serum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3(1):47-50.

Torres D, Rashid MU, Gil F, Umana A, Ramelli G, Robledo JF, Tawil M, Torregrosa L, Briceno I, Hamann U: High proportion of BRCA1/2 founder mutations in Hispanic

breast/ovarian cancer families from Colombia. *Breast Cancer Res Treat.* 2007;103(2):225-232.

Ursin G, Wu AH, Hoover RN, West DW, Nomura AM, Kolonel LN, Pike MC, Ziegler RG. Breast cancer and oral contraceptive use in Asian-American women. *Am J Epidemiol.* 1999;150(6):561-7.

Vail PJ, Morris B, van Kan A, Burdett BC, Moyes K, Theisen A, Kerr ID, Wenstrup RJ, Eggington JM. Comparison of locus-specific databases for BRCA1 and BRCA2 variants reveals disparity in variant classification within and among databases. *J Community Genet.* 2015 Mar 18. [Epub ahead of print] PubMed PMID:25782689.

van der Luijt RB, van Zon PH, Jansen RP, van der Sijs-Bos CJ, Wárlám-Rodenhuis CC, Ausems MG. De novo recurrent germLine mutation of the BRCA2 gene in a patient with early onset breast cancer. *J Med Genet.* 2001;38(2):102-5.

Van Emburgh BO, Hu JJ, Levine EA, Mosley LJ, Case LD, Lin HY, Knight SN, Perrier ND, Rubin P, Sherrill GB, Shaw CS, Carey LA, Sawyer LR, Allen GO, Milikowski C, Willingham MC, Miller MS. Polymorphisms in drug metabolism genes, smoking, and p53 mutations in breast cancer. *Mol Carcinog.* 2008;47(2):88-99.

Vega A, Campos B, Bressac-De-Paillerets B, Bond PM, Janin N, Douglas FS, Domenech M, Baena M, Pericay C, Alonso C. The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. *Hum Mutat.* 2001;17(6):520-521.

Vega A, Torres M, Martinez JI, Ruiz-Ponte C, Barros F, Carracedo A. Analysis of BRCA1 and BRCA2 in breast and breast/ovarian cancer families shows population substructure in the Iberian peninsula. *Ann Hum Genet.* 2002;66(Pt 1):29-36.

Villarreal-Garza C, Weitzel JN, Llacuachqui M, Sifuentes E, Magallanes-Hoyos MC, Gallardo L, Alvarez-Gómez RM, Herzog J, Castillo D, Royer R, Akbari M, Lara-Medina F, Herrera LA, Mohar A, Narod SA. The prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations among young Mexican women with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2015;150(2):389-94.

Vincent-Salomon A, Gruel N, Lucchesi C, MacGrogan G, Dendale R, Sigal-Zafrani B, Longy M, Raynal V, Pierron G, de Mascarel I, Taris C, Stoppa-Lyonnet D, Pierga

JY, Salmon R, Sastre-Garau X, Fourquet A, Delattre O, de Cremoux P, Aurias A. Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Res.* 2007;9(2):R24.

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

Xiang X, Deng Z, Zhuang X, Ju S, Mu J, Jiang H, Zhang L, Yan J, Miller D, Zhang HG. Correction: grhl2 determines the epithelial phenotype of breast cancers and promotes tumor progression. *PloS one.* 2013 8(4).

Wagner TM, Hirtenlehner K, Shen P, Moeslinger R, Muhr D, Fleischmann E, Concin H, Doeller W, Haid A, Lang AH, Mayer P, Petru E, Ropp E, Langbauer G, Kubista E, Scheiner O, Underhill P, Mountain J, Stierer M, Zielinski C, Oefner P. Global sequence diversity of BRCA2: analysis of 71 breast cancer families and 95 control individuals of worldwide populations. *Hum Mol Genet.* 1999;8(3):413-23.

Walker LC, Krause L, Spurdle AB, Waddell N. GermLine copy number variants are not associated with globally acquired copy number changes in familial breast tumours. *Breast Cancer Res Treat.* 2012. [Epub ahead of print].

Walker LC, Whiley PJ, Couch FJ, Farrugia DJ, Healey S, Eccles DM, Lin F, Butler SA, Goff SA, Thompson BA, Lakhani SR, Da Silva LM; kConFab Investigators, Tavtigian SV, Goldgar DE, Brown MA, Spurdle AB. Detection of splicing aberrations caused by BRCA1 and BRCA2 sequence variants encoding missense substitutions: implications for prediction of pathogenicity. *Hum Mutat.* 2010;31(6):E1484-505.

Wang K, Yuen ST, Xu J, Lee SP, Yan HH, Shi ST, Siu HC, Deng S, Chu KM, Law S, Chan KH, Chan AS, Tsui WY, Ho SL, Chan AK, Man JL, Foglizzo V, Ng MK, Chan AS, Ching YP, Cheng GH, Xie T, Fernandez J, Li VS, Clevers H, Rejto PA, Mao M, Leung SY. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet.* 2014;46(6):573-82.

Weinreb I, Piscuoglio S, Martelotto LG, Waggott D, Ng CK, Perez-Ordóñez B, Harding NJ, Alfaro J, Chu KC, Viale A, Fusco N, da Cruz Paula A, Marchio C, Sakr RA, Lim R, Thompson LD, Chiosea SI, Seethala RR, Skalova A, Stelow EB, Fonseca I, Assaad A,

How C, Wang J, de Borja R, Chan-Seng-Yue M, Howlett CJ, Nichols AC, Wen YH, Katabi N, Buchner N, Mullen L, Kislinger T, Wouters BG, Liu FF, Norton L, McPherson JD, Rubin BP, Clarke BA, Weigelt B, Boutros PC, Reis-Filho JS. Hotspot activating PRKD1 somatic mutations in polymorphous low-grade adenocarcinomas of the salivary glands. *Nat Genet.* 2014;46(11):1166-9.

Werth M, Walentin K, Aue A, Schönheit J, Wuebken A, Pode-Shakked N, Vilianovitch L, Erdmann B, Dekel B, Bader M, Barasch J, Rosenbauer F, Luft FC, Schmidt-Ott KM. The transcription factor grainyhead-like 2 regulates the molecular composition of the epithelial apical junctional complex. *Development.* 2010;137(22):3835-45.

Wistuba II, Tomlinson GE, Behrens C, Virmani A, Geradts J, Blum JL, Minna JD, Gazdar AF. Two identical triplet sisters carrying a germline BRCA1 gene mutation acquire very similar breast cancer somatic mutations at multiple other sites throughout the genome. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000;28(4):359-69.

Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2007;318(5853):1108-13.

Yang X, Vasudevan P, Parekh V, Penev A, Cunningham JM. Bridging cancer biology with the clinic: relative expression of a GRHL2-mediated gene-set pair predicts breast cancer metastasis. *PloS one.* 2013;8(2):e56195.

Yost SE, Smith EN, Schwab RB, Bao L, Jung H, Wang X, Voest E, Pierce JP, Messer K, Parker BA, Harismendy O, Frazer KA. Identification of high-confidence somatic mutations in whole genome sequence of formalin-fixed breast cancer specimens. *Nucleic Acids Res.* 2012;40(14):e107.

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

Zhou W, Wang Z, Shen N, Pi W, Jiang W, Huang J, Hu Y, Li X, Sun L. Knockdown of ANLN by lentivirus inhibits cell growth and migration in human breast cancer. *Mol Cell Biochem.* 2015;398(1-2):11-9.

Zou S, Li J, Zhou H, Frech C, Jiang X, Chu JS, Zhao X, Li Y, Li Q, Wang H, Hu J, Kong G, Wu M, Ding C, Chen N, Hu H. Mutational landscape of intrahepatic cholangiocarcinoma. *Nat Commun.* 2014;5:5696.