



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biologia Departamento de Genética

PRICILA DA SILVA SPÍNOLA

**Estudos de múltiplos genes da via de reparo relacionados ao câncer de
mama**

Orientadora: Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

Rio de Janeiro-2022



UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO DE JANEIRO

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Biologia Departamento de Genética

PRICILA DA SILVA SPÍNOLA

**Estudos de múltiplos genes da via de reparo relacionados ao câncer de
mama**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Orientadora: Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

Rio de Janeiro-2022

Estudos de múltiplos genes da via de reparo relacionados ao câncer de mama

Pricila da Silva Spínola

Orientadora: Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Genética).

Aprovada por:

Presidente, Prof. Dra. Cynthia Chester Cardoso/ UFRJ

Prof. Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino / INCA (orientadora)

Prof. Dra. Cíntia Barros Santos Rebouças / UERJ

Prof. Dr. Fernando Regla Vargas / UNIRIO

Prof. Dr. Juan Clinton Llerena Júnior / IFF-FIOCRUZ

Rio de Janeiro
Julho de 2022

Ficha catalográfica

Spínola, Pricila da Silva

Estudos de múltiplos genes de reparo relacionados ao câncer de mama/
Pricila da Silva Spínola. - Rio de Janeiro: UFRJ/IB, 2022.

xv, 105f: il;30cm.

Orientadora: Cibele Rodrigues Bonvicino

Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia, Programa de Pós Graduação em Genética, 2022.

1. câncer de mama. 2. genes de reparo. 3. hereditariedade. 4. *ATM*. 5. *CHEK2*. 6. *PALB2*. 7. *TP53*.

I: Bonvicino, Cibele Rodrigues;

Resumo

O câncer de mama é uma doença multigênica, com vários genes envolvidos, como *BRCA1* e *BRCA2*, conhecidos pelas alterações patogênicas que conferem um aumento no risco dessa neoplasia. Outros genes como *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51D* e *TP53* são responsáveis por codificar proteínas que atuam no reparo por recombinação homóloga, e alterações nestes genes explicam metade dos casos de câncer de mama hereditário, sendo que o perfil destas alterações pode variar de acordo com a origem geográfica ou etnia. O Brasil possui um perfil heterogêneo em sua composição genética, impactando diretamente na distribuição das variantes que conferem risco para o desenvolvimento do câncer de mama. Dessa forma, este estudo tem como objetivo analisar variantes genéticas que podem estar envolvidas no desenvolvimento do câncer de mama através do rastreamento de alterações germinativas nos genes *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *CDH1*, *PALB2*, *TP53* e *RAD51D* em 155 amostras de pacientes com câncer de mama em populações de duas regiões brasileiras, Sul (sudoeste do PR) e Sudeste (Rio de Janeiro, RJ e Muriaé, MG). Identificamos em 94 pacientes (Sul e Sudeste em MG), em *BRCA1* nove variantes de significado incerto (VUS) e duas variantes patogênicas, e em *BRCA2* quatro VUS, uma patogênica e uma variante provavelmente patogênica, fornecemos dados sobre a heterogeneidade de variantes patogênicas ou provavelmente patogênica em *BRCA1* e *BRCA2* na população do Sul, gerando dados para aconselhamento genético dos probandos e de seus familiares. Em amostras negativas para *BRCA1/2*, identificamos 3,4% (n=5) de variantes patogênicas, sendo duas novas variantes *frameshift* em *PALB2* e *CHEK2*, a variante encontrada em *PALB2* causa a perda da função do gene, mostrado por nosso ensaio funcional, ela impede a interação de *PALB2* com o *BRCA2*, e levam à perda de parte ou de toda a proteína *PALB2*. A variante em *CHEK2* também causa a mudança no quadro de leitura do gene, gera um stop códon prematuro e leva a perda da função do gene. Encontramos também duas variantes patogênicas em *ATM* e *TP53*. Descrevemos novas variantes em *CHEK2* e *PALB2*, sendo a patogenicidade desta última validada por ensaio funcional, podendo contribuir futuramente para o manejo clínico das probandas e seus familiares. Nas amostras negativas para alterações patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2*, os genes *ATM*, *CHEK2*, *PALB2* e *TP53* foram os que mais apresentaram variantes patogênicas que podem estar relacionadas ao desenvolvimento do câncer de mama, mostrando a importância dos genes da via de reparo por recombinação homóloga para essa neoplasia.

Palavras chaves: câncer de mama, genes de reparo, hereditariedade, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *TP53*.

Abstract

Breast cancer is a multigenic disease, with several genes involved, such as *BRCA1* and *BRCA2*, known for pathogenic alterations that confer an increased risk of this neoplasm. Other genes such as *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51D* and *TP53* are responsible for encoding proteins that act in repair by homologous recombination, and changes in these genes explain half of the cases of hereditary breast cancer, and the profile of these changes may vary according to geographic origin or ethnicity. Brazil has a heterogeneous profile in its genetic composition, directly impacting the distribution of variants that confer risk for the development of breast cancer. Thus, this study aims to analyze genetic variants that may be involved in the development of breast cancer by screening for germline changes in *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *CDH1*, *PALB2*, *TP53* and *RAD51D* genes in 155 samples from patients with breast cancer in populations of two Brazilian regions, South (southwest of PR) and Southeast (Rio de Janeiro, RJ and Muriaé, MG). We identified in 94 patients (South and Southeast in MG), in *BRCA1* nine variants of uncertain significance (VUS) and two pathogenic variants, and in *BRCA2* four VUS, one pathogenic and one probably pathogenic variant, we provide data on the heterogeneity of pathogenic or probably pathogenic variants in *BRCA1* and *BRCA2* in the Southern population, generating data for genetic counseling of probands and their families. In *BRCA1/2* negative samples, we identified 3.4% (n=5) of pathogenic variants, being two new frameshift variants in *PALB2* and *CHEK2*, the variant found in *PALB2* causes loss of gene function, shown by our functional assay, it prevents the interaction of *PALB2* with *BRCA2*, and lead to loss of part or all of *PALB2* protein. The variant in *CHEK2* also causes the gene reading frame to change, generates a premature stop codon, and leads to loss of gene function. We also found two pathogenic variants in *ATM* and *TP53*. We described new variants in *CHEK2* and *PALB2*, the pathogenicity of the latter being validated by functional assay, which may contribute in the future to the clinical management of probands and their families. In samples negative for pathogenic alterations in *BRCA1* and *BRCA2*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2* and *TP53* genes showed the most pathogenic variants that may be related to the development of breast cancer, showing the importance of homologous recombination repair pathway genes for this neoplasm.

Keywords: Breast cancer, repair genes, hereditary, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, *TP53*.

Dedico esse trabalho aos meus pais e ao meu irmão por todo apoio, mesmo distante estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, ao meu marido e meu filho Luiz Felipe.

Agradecimentos

Gostaria primeiramente de agradecer a minha família, vocês foram essenciais nessa etapa da minha vida. À minha Mãe, obrigada por todas as conversas diárias de apoio e ensinamento. Ao meu Pai, obrigada por ser meu porto seguro, meu herói e por todos os ensinamentos, e por buscar sempre fazer de mim uma pessoa melhor. Ao meu irmão Guilherme que é meu exemplo, obrigada por me apoiar e ser esse irmão maravilhoso que cuida dos nossos pais na minha ausência. Ficar longe de vocês não é fácil.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer à minha orientadora Dra. Cibele, que há sete anos atrás me recebeu no Rio de Janeiro abrindo as portas do INCA para mim. Saiba Cibele, que minha evolução intelectual e como pessoa devo a você. A onde quer que eu esteja, levarei seus ensinamentos, críticas, conselhos e o carinho que sempre teve por mim, mesmo quando disfarçado de uma bronca. Foi você quem permitiu e deu a oportunidade para minha busca de conhecimento. Em dezembro de 2014, o seu ‘aceito orientar você’ permitiu que eu realizasse o meu sonho de ser Mestre em genética, e hoje possivelmente, me torne uma doutora em genética, você me preparou para o mercado de trabalho, e já trabalho na área. Me preparou para enfrentar a dura vida de pesquisadora no Brasil. Eu sempre serei grata por tudo que fez por mim, por toda confiança, pela mãe que se tornou ao longo desse caminho. Muito obrigada por tudo!

Gostaria também de agradecer a banca examinadora que dedicará tempo para ler o meu trabalho, e contribuirá para minha evolução científica.

À Carol Panis, nossa grande colaboradora nesse projeto muito amável e empenhada me ajudando com muita responsabilidade com todas as informações necessárias. Aos médicos Dr. Daniel Rech e Dr. Janoário por toda colaboração, aos pacientes com câncer de mama que aceitaram a participar desse estudo e a todos do hospital Centro de Oncologia Francisco Beltrão.

À Luciana pela colaboração cedendo as amostras de câncer de mama do hospital do câncer de Muriaé – MG.

Em especial à minha amiga Sara, por mais de dez anos de amizade. Você sem dúvida, é a irmã que não tive. Seu ombro amigo nessa caminhada foi imprescindível. Amo você!

Ao meu marido Luiz obrigada pelo apoio e incentivo durante esse período. E ao meu filho Luiz Felipe, seu sorriso todas as manhãs com certeza foi meu combustível para não desistir. Você é o sentimento mais forte que já tive em minha vida.

À minha amiga Cíntia obrigada pelo companheirismo desde a época do mestrado. À minha

amiga Bárbara que hoje está nos Estados Unidos, segue mesmo de longe, me apoiando e incentivando nunca desistir.

Ao Instituto Nacional do Câncer por disponibilizar toda estrutura e equipamentos necessários para a realização desse projeto. Ao Dr. Hector *in memoriam*, por ter sido um grande incentivador em minha vida de forma tão gentil. Aos professores da Pós-Graduação da UFRJ, por todo embasamento científico que me proporcionaram, sempre me inspirei em vocês. Às agências de fomento pelo apoio financeiro. As pacientes com câncer de mama que aceitaram participar desse projeto contribuindo para disseminação científica. E a todos do laboratório cujo nome eu não citei, mas que torceram por mim ao longo desses anos. E por fim, agradeço a Deus pela minha vida! A todos o meu muito obrigado.

Listas de Figuras

Figure 3.1 Representação esquemática da mutagênese sítio dirigida direta.....	17
Figura 3.2 Representação esquemática do ensaio de dois híbridos em mamífero.....	21
Figura 3.3 fluxograma mostrando a divisão das amostras e cada capítulo.....	22
Figure 4.1 Representação esquemática dos principais domínios funcionais de <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> com a localização das variantes detectadas	27
Figure 4.2 Heredograma da família portadora da variante <i>BRCA1</i> p.Cys61Gly.....	28
Figure 4.3 Heredograma da família portadora da variante <i>BRCA1</i> p.Cys64Arg.....	28
Figure 4.4 Distribuição geográfica das variantes patogênicas encontradas em <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> na população do Sudoeste do Paraná.....	29
Figure 6.1 Representação esquemática dos domínios funcionais de <i>ATM</i> , <i>BRIP1</i> , <i>CHEK2</i> , <i>PALB2</i>	60
Figure 6.2 Representação esquemática dos domínios funcionais dos genes <i>RAD51</i> e <i>TP53</i> , mostrando as variantes detectadas.. ..	61
Figure 6.3 Gráficos mostrando a distribuição de variantes patogênicas e VUS em pacientes do Sul e Sudeste do Brasil.....	61
Figure 6.4 Avaliação da interação das proteínas <i>PALB2-<i>BRCA2</i></i> no modelo híbrido em células de mamíferos.....	62
Figure 6.5 Avaliação da presença ou ausência da variante Gln921HisfsTer6 na proteína <i>PALB2</i>	62

Lista de tabelas

Tabela 3.1 Informações clínicas e de hereditariedade das pacientes com câncer de mama analisadas.....	8
Table 4.1 Dados clínicos e patológicos das pacientes com cancer de mama do Sul e Sudeste do Brasil.....	25
Table 4.2 Perfil de variants patogênicas, variants de significado incerto em pacientes positivas para <i>BRCA1/2</i>	30
Suplementar 1 Listas de variantes nos genes <i>BRCA1/2</i>	31
Tabela 6.1 Perfil de variantes patogênicas, provavelmente patogênicas e de significado incerto em pacientes negativas para variantes patogênicas em <i>BRCA1/2</i>	63

Lista de Abreviaturas

ATM – gene Ataxia Telangiectasia Mutated Protein Kinase

ATR - Serine/Threonine Kinase

ACMG/AMP- American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology

BRCA1 - gene Breast Cancer 1

BRCA2 - gene Breast Cancer 2

BWA - Burrows-Wheeler Aligner

BRCT - Brca1 C-Terminal Domain

BARD1 - gene Brca1 Associated Ring Domain 1

BRIP1 - gene Brca1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1

CEONC - Centro de Oncologia de Francisco Beltrão

CHEK2 - gene Checkpoint Kinase 2

CDH1 - gene Cadherin 1

DCIS - Ductal Carcinoma in Situ

FCV - Fundação Cristiano Varella (Hospital de câncer de Muriaé)

FDA - Food and Drug Administration

HGVS - Human Genome Variation Society

HBOC - Hereditary Breast and Ovarian Cancer

HER2 - Human Epidermal Growth Factor Type 2

IDC - Invasive Ductal Carcinoma

MES - Maxentscan

MAF - Minor Allele Frequency

M-CAP - Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity

MRE1 - Meiotic Recombination 11 Homolog 1

MLPA - Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification

MSH2 - gene MutS Homolog 2

MLH1 - gene MutL Homolog 1

MSH6 - gene MutS Homolog 6

NGS - Next-Generation Sequencing

NCCN - National Comprehensive Cancer Network Guidelines

NBS1 - Nijmegen Breakage Syndrome

NMD - Nonsense Mediated Decay

NES - Nuclear Export Signal

PALB2 - gene Partner and Localizer of *BRCA2* gene

PTV - Protein Truncating Variants

POLYPHEN-2 - Polymorphism Phenotyping v2

PTCs - Premature Termination Codons

PMS2 - gene *PMS1* Homolog 2, Mismatch Repair System Component

RAD50 - gene Double Strand Break Repair Protein

RAD51 - Homolog (s. *Cerevisiae*)

RAD51D - gene Rad51 Paralog D

RE - Receptor de Estrógeno

RP - Receptor de Progesterona

SIFT - Sorting Intolerant from Tolerant

TP53 - gene Tumor Protein p53 gene

VUS - Variants of Unknown Significance

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Câncer e a incidência do câncer de mama no Brasil e no mundo.....	1
1.2. Genes de reparo e suas funções	2
1.3. Tipos e subtipos moleculares do câncer de mama e tratamentos	3
1.4. Painéis genômicos gerando impacto no diagnóstico do câncer de mama baseado na metodologia massivo de DNA.....	5
2. Objetivo Geral	7
2.1. Objetivos Específicos	7
3 .Materiais e Métodos	8
3.1. Caracterização das amostras.....	8
3.2. Isolamento do DNA, amplificação e purificação dos genes.....	9
3.3. Programas de predição e critérios de patogenicidade da ACMG.....	13
3.4. Ensaio Funcional para variante detectada em <i>PALB2</i>	15
3.5. Cultivo <i>in vitro</i> de células humanas.....	18
3.6. Ensaio de interação <i>PALB2-BRCA2</i>	19
4. Capítulo 1. <i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i> variants in patients with breast cancer from Southern and Southeastern Brazil (a ser submetido na revista <i>Genetics Molecular Biology</i>)	23
5. Capítulo 2. Prevalence of germline variants in consensus moderate-to-high-risk predisposition genes to hereditary breast and ovarian cancer in <i>BRCA1/2</i> -negative Brazilian patients.....	42
6. Capítulo 3. Variantes em genes da via de reparo em pacientes com câncer de mama negativas para variantes patogênicas em <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	59
6.1. Resultados.....	59
6.2. Discussão.....	64
7. Conclusão geral	67
8. Referências	68
9. ANEXOS	80
9.1. ANEXO I. Aprovação do projeto “Mapeamento do câncer de mama familiar no sudoeste do Paraná e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional à agrotóxico” pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade do Oeste do Paraná	80
9.2. ANEXO II. Aprovação do comitê de ética em pesquisa da Fundação Cristiano Varela Hospital do câncer de Muriaé, MG.	82

9.3 Anexo III. Aprovação do projeto "Rastreamento de alterações genéticas e epigenéticas em múltiplos genes em pacientes portadores de câncer de mama familiar" pelo comitê de ética em pesquisa do Instituto Nacional de Câncer.....	85
9.4. ANEXO IV. Termo de Consentimento livre e esclarecido.	92
9.5. ANEXO V. Iniciadores (I) utilizados para amplificação de <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> ,.....	93
9.6. ANEXO VI. Lista das reações (R) das PCR multiplex para <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>ATM</i> , <i>RAD51</i> , <i>BARD1</i> , <i>BRIP1</i> , <i>CDH1</i> e <i>TP53</i>	95
9.7. ANEXO VII. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes <i>ATM</i> , <i>CHEK2</i> , <i>CDH1</i> , <i>PALB2</i> , <i>RAD51D</i> , <i>TP53</i> , <i>BARD1</i> e <i>BRIP1</i>	96
9.8. Anexo VIII. Lista de variantes nos genes <i>ATM</i> , <i>BARD1</i> , <i>BRIP1</i> , <i>CDH1</i> , <i>CHEK2</i> , <i>PALB2</i> , <i>RAD51D</i> e <i>TP53</i>	99
9.9. Anexo IX. Correlação das variantes com dados clínicos como óbito, grau histológico, idade e sobrevida.	103

1. Introdução

1.1. Câncer e a incidência do câncer de mama no Brasil e no mundo

O início e progressão do tumor são originados pela desregulação de genes que controlam processos celulares como proliferação, adesão celular, diferenciação, morte celular e mecanismo de reparo (Friend et al. 1986), envolvendo oncogenes e/ou supressores tumorais (Berger et al. 2011). Os oncogenes alterados têm um ganho de função que podem resultar em um aumento de proliferação (Bartkova et al. 2006), já os supressores tumorais codificam proteínas responsáveis por inibirem essa proliferação, controlando a ação dos oncogenes (Negrini et al. 2010). Em 1971, Knudson propôs a teoria dos dois “hits”, na qual um alelo mutado seria herdado dos progenitores e, posteriormente, o alelo normal sofreria um segundo evento mutacional somático, acarretando a perda de função do gene. É o que acontece nos cânceres hereditários, onde uma cópia do alelo herdado de um dos genitores é mutada, e a outra cópia é perdida através de um evento somático (Knudson 1971).

Alterações nos genes supressores tumorais e/ou em oncogenes podem conferir às células habilidade de diferenciar-se das células normais, adquirindo características específicas de uma célula tumoral, tais como proliferação celular sustentada, evasão de inibidores de crescimento, evasão do reconhecimento do sistema imune, potencial replicativo ilimitado, promoção da inflamação, invasão tecidual e metástase, indução de angiogênese, instabilidade genômica e mutação, resistência a morte celular e desregulação metabólica (Hanahan e Weinberg 2011). Alterações em genes da via de recombinação homóloga podem comprometer os mecanismos de controle da integridade do genoma, gerando instabilidade genômica, um dos *hallmarks* do câncer (Hanahan e Weinberg 2011). Esse processo de instabilidade genômica é caracterizado pelo acúmulo de mutações ao longo da vida celular que resulta no descontrole de processos celulares. Sendo assim, ele atua como fator inicial no processo da carcinogênese e sua progressão pode conferir características que uma célula tumoral necessita para se tornar maligna. Isto acontece no câncer hereditário, onde a disfunção de um gene está associado à um reparo errôneo, que pode desencadear a carcinogênese e propagar-se através da instabilidade genômica (Negrini et al. 2010).

O câncer de mama está entre as cinco neoplasias mais comuns entre as mulheres (WHO, 2020), com incidência maior em países desenvolvidos (72,5/100.000 mulheres), em relação aos países em desenvolvimento (32,8/100.000 mulheres). A mortalidade é maior em países menos desenvolvidos (17,1/100.000 mulheres), quando comparado aos desenvolvidos (13,1/100.000 mulheres). No Brasil, são esperados cerca de 66,280 casos novos de câncer de mama para cada triênio, correspondendo a um risco estimado de 61,61 novos casos a cada 100

mil mulheres, e a taxa de mortalidade estimada de 16,16 de casos de morte a cada 100 mil mulheres (INCA, 2020). Embora a letalidade seja considerada baixa, a mortalidade é a maior entre todos os tipos de câncer (INCA, 2020), com exceção dos tumores de pele não melanoma. No Brasil o câncer de mama é o mais incidente em mulheres na região Sudeste (81,06/100.000), Sul (71,06/100.000), Centro-Oeste (45,24/100.000), Nordeste (44,29/100.000) e na região Norte (21,34/100.000). Nos últimos anos tem sido observada uma tendência de aumento no número de casos diagnosticados e na taxa de mortalidade (INCA 2020). Entre os fatores de risco na etiologia do câncer de mama, a predisposição genética é o mais bem estabelecido.

Historicamente, o primeiro caso de câncer de mama familiar foi descrito em 1866, entretanto, as técnicas de epidemiologia moderna foram aplicadas somente em 1926. Em 1970, estudos epidemiológicos mostraram que o risco de pacientes com câncer de mama e ovário aumentava em mulheres com parentes de primeiro grau e segundo grau afetados, mostrando que as características genéticas dos familiares poderiam ser explicadas por um padrão autossômico dominante com alelos de alta penetrância (Hurst 2014). Desde 1994 e 1995 os genes *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente, foram mapeados e descritos (Miki et al. 1994; Wooster et al. 1995).

Mulheres portadoras de mutações deletérias em *BRCA1* e *BRCA2* possuem um aumento de aproximadamente 55-65% e 45%, respectivamente, do risco de desenvolver câncer ao longo da vida (Gorodetska et al. 2019). Entretanto, homens que apresentam mutações deletérias em *BRCA1* e *BRCA2*, possuem risco aumentado em cerca de 1,2% e 6,8%, respectivamente, além de terem maior predisposição para desenvolver câncer de próstata e pâncreas (Nielsen et al. 2016). Entre as características dos portadores de mutações hereditárias, estão o surgimento do câncer em idade precoce (≤ 50 anos), tumores bilaterais em órgãos pares, surgimento de tumores em outros órgãos e presença de outros familiares com câncer (Lynch et al. 2008). O grupo de indivíduos com essas características apresentam um risco ao longo da vida significativamente maior de desenvolver diferentes tipos de câncer (Ngeow e Eng 2016).

1.2. Genes de reparo e suas funções

Essa via é fundamental para a segregação correta dos cromossomos durante a meiose, tendo em vista que sem o reparo todo o material genético pode ser perdido durante a divisão celular (Heyer 2007). A via de recombinação homóloga é a segunda maior via de reparo de fita dupla no DNA, estando restrita à fase S e G2 do ciclo celular, momento que as cromátides

irmãs estão disponíveis e favorecendo a recombinação entre elas, sendo possível realizar uma perfeita restauração da região danificada (Prakash et al. 2015; Scully et al. 2019). Para que essa via de sinalização funcione de forma correta são necessárias algumas etapas, embora estas ainda não estejam completamente estabelecidas. De maneira sucinta há (i) o reconhecimento da sinalização do dano, (ii) amplificação desta sinalização e, (iii) o reparo do dano. Esta sinalização é primeiramente reconhecida pelo complexo MRN (formado por três proteínas, MRE1- *Meiotic Recombination 11 Homolog*), RAD50 (*RAD50 double strand break repair protein*), e (NBS1- *Nijmegen Breakage Syndrome*) (Pellegrino et al. 2020). O sinal de dano é, então, amplificado através da fosforilação de histonas promovida pelas cinases ATM (*ATM serine/threonine kinase*), servindo como uma plataforma para o recrutamento de diversas proteínas e formando uma cascata de sinalização (Picciotto et al. 2016). Essa cascata de sinalização tem a função de iniciar a ressecção da fita danificada, caracterizada pela digestão das extremidades 5' da fita lesionada, onde ocorreu a quebra. Nesta etapa, a fita simples de DNA (extremidade 3') fica exposta e é utilizada pela proteína RPA (*replication protein A*) para evitar degradação e formação de estruturas secundárias (Roy et al. 2012). Esse mecanismo de reparo de DNA conta com mediação de diversas proteínas de acordo com sua função em (i) sensores (detectam o sinal de dano), (ii) mediadores (recrutam e/ou ativam os efetores para reparar o dano), e (iii) efetores (ativam checkpoints do ciclo celular). Os genes ATM, CHEK2 (*checkpoint kinase 2*), RAD51 (*RAD51 recombinase*) funcionam como mediadores, atuando durante a fase G2 ou invasão da fita de DNA. Os genes BRCA1 (*BRCA1 DNA repair associated protein*), BRCA2 (*BRCA2 DNA repair associated protein*), PALB2 (*partner and localizer of BRCA2*), BARD1 (*brca1-associated ring domain 1*) atuam como sensores no recrutamento, ressecção da fita danificada e na fase G2/M do ciclo celular (Roy et al. 2012), e funcionam sinergicamente como um complexo molecular reforçando a montagem dos filamentos de DNA utilizados no reparo (Kawale e Sung 2020).

1.3. Tipos e subtipos moleculares do câncer de mama e tratamentos

Em relação ao tipo histológico, o câncer de mama é classificado em carcinoma ductal e carcinoma lobular, que podem ser *in situ* ou invasivos (Dossus e Benusiglio 2015). Historicamente, os dois tipos de carcinomas eram considerados lesões precursoras invasivas (Obeng-Gyasi et al. 2016). O carcinoma ductal invasivo é o tipo mais comum em mulheres com câncer de mama, representando aproximadamente 75% dos tumores invasivos (Wu et al. 2017). O carcinoma lobular invasivo se caracteriza pela baixa expressão de E-caderina, apresenta lesões bilaterais, e representa de 5-15% dos casos de câncer de mama invasivo (Cha

et al. 2017).

A heterogeneidade do câncer de mama pode ser explicada por fatores clínicos como tamanho do tumor, envolvimento linfonodal, grau histológico, idade, biomarcadores moleculares e classificação de subtipos moleculares (Eroles et al. 2012). Em relação aos subtipos moleculares, o subtipo Luminal A possui baixa capacidade de proliferação (baixa expressão do marcador de proliferação Ki67), são positivos para os Receptores de Estrógeno (RE) de Progesterona (RP), e negativo para o *HER2*, do inglês, *Human Epidermal Growth Factor Type 2* (Smith et al. 2017). O subtipo luminal A é o mais frequente, representando cerca de 40% dos cânceres de mama (Yersal 2014), sendo tratados majoritariamente com terapias hormonais (Provenzano et al. 2018). O subtipo luminal B é positivo para RE, RP, apresenta alta expressão do marcador de proliferação Ki67, e pode ter positividade para receptores *HER2* (Smith et al. 2017). Geralmente, tumores luminais B apresentam um prognóstico desfavorável quando comparados ao Luminal A, visto que o tratamento do luminal A alcança uma resposta completa com tamoxifeno, enquanto o luminal B não alcança a mesma resposta (Kim et al. 2004). Além disso, os tumores luminais B são tratado com uma quimioterapia adicional para combater o aumento da proliferação (Provenzano et al. 2018).

Os tumores *HER2+* são negativos para receptores hormonais porém possuem super expressão de *HER2*, podendo apresentar níveis elevados da proteína Ki67 (Smith et al. 2017). Aproximadamente 10 a 15% dos cânceres de mama são *HER2+*, tendo comportamento clínico mais agressivo (Aleix et al. 2013). Pacientes diagnosticadas com este subtipo podem se beneficiar do tratamento com trastuzumabe, conhecido pelo nome comercial Herceptin®, uma droga baseada em anticorpos monoclonais e específica para estes tumores (Provenzano et al. 2018). Os tumores triplo-negativos podem ser divididos no tipo basal A ou basal B, dependendo de suas características moleculares. O tipo basal A é negativo para os receptores hormonais e para *HER2*, apresenta alta expressão de Ki67 e geralmente apresenta expressão para o fator de crescimento epidermal (EGFR+) e citoqueratinas 5/6 (Smith et al. 2017). Já o tipo basal B é negativo para todos os receptores hormonais e *HER2*, possui baixa expressão Ki67, E-caderina e claudinas 3/4/7 (Smith et al. 2017). Os subtipos triplo negativos representam cerca de 15% a 20% dos casos de câncer de mama invasivo e são caracterizados pelo alto grau histológico e surgimento de metástases, além de serem frequentes em mulheres mais jovens, especialmente as de origem Africanas (Alluri e Newman 2014). Uma característica importante dos tumores triplo negativos é a alta taxa de mutação em *BRCA1* (Bose 2015).

1.4. Painéis genômicos gerando impacto no diagnóstico do câncer de mama baseado na metodologia massivo de DNA

Nos últimos anos painéis poligênicos têm sido utilizados em testes genéticos em casos com suspeita de câncer de mama hereditário, que incluem genes com variantes que conferem risco relativo para desenvolvimento de câncer até quatro vezes maior para os portadores quando comparados a população em geral (Piccinin et al. 2019). Neste conjunto de genes que confere um aumento no risco do câncer de mama hereditário estão *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *CHEK2*, *PALB2*, *TP53* e *RAD51D* (Dameri et al. 2021), que quando alterados explicam uma parte dos casos de câncer de mama hereditário (Couch et al. 2014).

Por exemplo, mulheres portadoras de variantes patogênicas em *PALB2* tem o risco cumulativo de desenvolver câncer de mama de 25-45% em comparação à mulheres saudáveis (Hoyer et al. 2018). *PALB2*, um gene importante durante o reparo do DNA, codifica uma proteína que interage com *BRCA2* durante o reparo por recombinação homóloga, e está ligado a dois outros genes, *BRCA1* e *RAD51* (Nepomuceno et al. 2017; Zhang et al. 2019). Além disso, está associado como um gene de alto risco (OR>5), e está incluído no grupo de genes com maior número de mutações em câncer de mama (Slavin et al. 2017). Alguns autores sugeriram que variantes em *PALB2* podem estar associadas com câncer de mama triplo negativo (Shimelis et al. 2018), e envolvido com a síndrome de anemia Fanconi em situações de mutações bi alélicas (Piccinin et al. 2019).

O gene *RAD51D* (*RAD51* paralog *d*; *RAD51D*) interage com *PALB2*, *BRCA1* e *BRCA2* durante o reparo do DNA pela via de recombinação homóloga. Variantes patogênicas em *RAD51D* estão fortemente associados a neoplasias caracterizadas por apresentarem instabilidade genômica. A estimativa do aumento do risco de câncer de mama em pacientes que possuem *RAD51* mutado é de cerca de 15% ao longo da vida (Angeli et al. 2020).

O gene *ATM* é recrutado durante a quebra de dupla fita do DNA para manter as duas extremidades juntas. *ATM* codifica uma proteína que atua majoritariamente no reparo do DNA e no controle do ciclo celular, mas que também está envolvida com processos de apoptose, regulação gênica e estresse oxidativo, além da manutenção da telomerase, encontrada desregulada em muitas neoplasias, incluindo o câncer de mama (Stucci et al. 2021). Mulheres portadoras de variantes patogênicas *missense*, e em heterozigose apresentam um aumento do risco do câncer de mama de até 60% ao longo da vida (Tavtigian et al. 2009). Mutações patogênicas em *ATM* também estão associadas a um aumento de duas a três vezes no risco de desenvolver câncer de próstata (Stucci et al. 2021).

O gene *TP53* (*Tumor Protein p53*), conhecido como guardião do genoma, é capaz de

interromper o ciclo celular, reparar o DNA, levar a célula a senescência e a mudanças no metabolismo, além de ser responsável por ativar uma série de genes *downstream* para reparar o dano ou levar a célula à apoptose (Schon e Tischkowitz 2018). Variantes patogênicas em heterozigose estão associadas a síndrome de Li-Fraumeni, e o aumento para o risco de desenvolver câncer de mama chega a 85% ao longo da vida (Masciari et al. 2012). Alterações em *TP53* estão associadas ao início precoce de câncer de mama, sendo que cerca de 5-8% de mulheres diagnosticadas com câncer de mama até os 30 anos de idade, sem alteração em *BRCA1/2*, podem possuir mutação patogênica em *TP53*. A probabilidade de encontrar mutações em *TP53* é ainda maior caso haja histórico familiar relacionado a Síndrome de Li-Fraumeni (Schon e Tischkowitz 2018).

O gene *CHEK2* atua no controle do segundo *checkpoint* do ciclo celular, e, junto com *ATM* e *TP53*, inicia uma cascata de sinalização que serve como bloqueio da carcinogênese. *CHEK2* também promove o bloqueio do ciclo celular e induz a célula ao processo de apoptose ou senescência (Stolarova et al. 2020). Estudos mostraram que variantes truncadas representam 20% do risco de desenvolver câncer de mama familiar, aumentando em 44% para portadores com parentes de primeiro e segundo grau afetados com câncer de mama (Cybulski et al. 2011). *CHEK2* está incluso em testes genéticos de rotina em portadores de câncer de mama hereditário devido a sua alta frequência de mutações germinativas. Entretanto, a presença de variantes de significado clínico desconhecido dificulta a avaliação precisa do risco associado ao desenvolvimento de tipos específicos de tumores (Caswell-Jin et al. 2018).

O gene *BRIP1* (*BRCA1-interacting protein 1*), também incluso no risco poligênico para o câncer de mama foi descoberto por estar ligado fisicamente e interagir com os domínios BRCT de *BRCA1* durante o reparo por recombinação homóloga. Essa interação é codependente, pois juntos eles formam o complexo que atuam no reparo da quebra de dupla fita do DNA (Brosh, Cantor 2014). Variantes patogênicas bialélicas neste gene conferem um aumento no risco de desenvolver câncer de mama em cerca de 2-10% ao longo da vida (Brosh e Cantor 2014).

O gene *CDH1* (Cadherin 1) codifica a glicoproteína caderina, responsável por manter a adesão célula a célula e traduzir sinal do núcleo da célula para o citoesqueleto. Alterações neste gene estão associadas com a perda da transição epitélio-mesenquimal (Shenoy 2019). O *CDH1* parece desempenhar um papel central no carcinoma lobular invasivo, visto que cerca de 1,3% destes tumores abrigam variantes patogênicas em *CDH1*, além de estar associado, também, ao desenvolvimento do câncer gástrico (Piccinin et al. 2019). O gene *BARD1* (*BRCA1-associated ring domain 1*) codifica uma proteína que interage com a região N-

terminal de *BRCA1* que é essencial durante o reparo celular (Shimelis et al. 2018). Variantes patogênicas no domínio de interação de *BARD1* podem romper a ligação de *BARD1* com *BRCA1* e, conseqüentemente, estão associadas com um aumento no risco de câncer de mama (Alenezi et al. 2020). Em *BARD1*, variantes patogênicas têm sido relatadas por aumentar o risco de câncer de mama em duas a três vezes na presença de histórico familiar, além de estarem envolvidas no câncer de ovário (Alenezi et al. 2020).

Os dados gerados do sequenciamento multigênicos possuem utilidade para o manejo clínico das pacientes (Stadler et al. 2014). Conhecer o perfil clínico das pacientes com câncer de mama possibilita prevenção em diversos níveis (Greenblatt et al. 2001; Fostira et al. 2012). A identificação de mutações patogênicas oferece aos parentes dos portadores a oportunidade de também realizar testes genéticos e, em casos positivos, estabelecer uma estimativa de risco, além de garantir medidas de prevenção apropriadas e eficazes, como exames de rastreamento periódico e cirurgias profiláticas se necessário (Domchek 2010). Cabe ressaltar que o custo do tratamento em estágios avançados da doença pode ser até oito vezes maior em comparação ao tratamento em estágios iniciais (INCA 2007). Reforçando esse fato, pacientes diagnosticadas em estágio I tem um custo de tratamento de \$71.909, enquanto em paciente diagnosticado em estágio IV o custo é de \$181.655 (Blumen et al. 2016). Portanto, é de suma importância expandir o rastreamento pois permite um maior benefício para os probandos, caso haja tratamento já disponível no mercado, bem como favorece o rastreio de prováveis portadores.

2. Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo rastrear variantes genéticas germinativas que podem estar envolvidas no desenvolvimento do câncer de mama, nos genes *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *CDH1*, *PALB2*, *TP53* e *RAD51D* em amostras de pacientes com câncer de mama em populações do Sul (Francisco Beltrão - Paraná) e do Sudeste do Brasil (Rio de Janeiro e Minas Gerais).

2.1. Objetivos Específicos

- Rastrear alterações nos genes *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *CDH1*, *PALB2*, *TP53* e *RAD51D* nas amostras de sangue de pacientes com câncer de mama;
- Avaliar a integridade da interação entre as proteínas PALB2 e BRCA2 na presença de variantes de *PALB2* por ensaio funcional;

- Correlacionar as variantes encontradas com dados clínicos (Subtipo molecular, grau histológico e tipo de tratamento);
- Caracterizar todas as variantes encontradas de significado clínico desconhecido de acordo com os critérios da ACMG;
- Contribuir para o aconselhamento genético das pacientes analisadas no estudo.

3. Materiais e Métodos

3.1. Caracterização das amostras

Este estudo está inserido nos projetos: (1) Caracterização do perfil proteômico e do estresse oxidativo em plasma e tecido tumoral de pacientes portadoras de câncer de mama, e mapeamento do câncer de mama familiar no sudoeste do Paraná e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional a agrotóxico, (2) Investigação da frequência de alterações genéticas nos genes *BRCA1/2* e *TP53* em indivíduos portadores de câncer de mama, ovário, próstata e pâncreas no hospital do câncer de Muriaé, MG, e (3) Rastreamento de alterações genéticas e epigenéticas em múltiplos genes em pacientes portadores de câncer de mama familiar (Anexos I - III). Foram incluídas neste estudo 155 amostras de pacientes diagnosticadas com câncer de mama, sendo 68 provenientes do Centro de Oncologia de Francisco Beltrão (CEONC) no Paraná, 28 amostras da Fundação Cristiano Varella, Hospital de Câncer de Muriaé (FCV) em Minas Gerais e 59 do Instituto Nacional de Câncer (INCA) no Rio de Janeiro. Todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Anexo IV). A maior parte das pacientes incluídas no estudo apresentam histórico familiar de câncer (tabela 3.1). As amostras do Rio de Janeiro foram excluídas do capítulo sobre os genes *BRCA1* e *BRCA2*, por terem sido sequenciadas previamente a este estudo.

Tabela 3.1 Informações clínicas e de hereditariedade das pacientes com câncer de mama analisadas.

Pacientes – Sul/Brasil	n	%	Pacientes – Sudeste/Brasil	n	%
Câncer de mama	66	100	Câncer de mama	28	100
História familiar			História familiar		
Sim	33	66	Sim	28	100
Não	33	66	Não	0	0
Idade ao diagnóstico			Idade ao diagnóstico		
≤ 50 anos	22	33	≤ 50 anos	12	42
≥ 50 anos	44	66	≥ 50 anos	16	57
Histologia			Histologia		
Carcinoma ductal invasivo	65	98	Carcinoma ductal invasivo	24	85
Carcinoma ductal <i>in situ</i>	1	1.5	Carcinoma ductal <i>in situ</i>	3	10.7

Carcinoma Lobular invasivo	0	0	Carcinoma Lobular invasivo	1	3.5
Subtipo molecular			Subtipo molecular		
Luminal A	21	32	Luminal A	8	28
Luminal B	21	32	Luminal B	14	50
Triplo Negativo	16	24	Triplo Negativo	4	14
Her2+	5	7.5	Her2+	2	7.1
Sem informação	3	4.5	Sem informação	0	0

3.2. Isolamento do DNA, amplificação e purificação dos genes.

O DNA foi isolado de amostras de sangue utilizando o conjunto de reagente *AllPrep DNA/RNA Mini kit (50)* QIAGEN seguindo as recomendações do fabricante. Diferentes protocolos e iniciadores (Anexos V - VII) foram utilizados para a amplificação e sequenciamento dos genes aqui estudados, com diferentes multiplex de reações em cadeia da polimerase (PCR, do inglês *polimerase chain reaction*) realizadas no termociclador *Veriti 96 Well* (Applied Biosystems).

BARD1 e *BRIP1* foram amplificados usando iniciadores desenhados nesse trabalho, cobrindo éxons e regiões intrônicas adjacentes. Para amplificar os 11 éxons do *BARD1* foram realizadas três PCR multiplex utilizando 0,3 mM de cada dNTP, 0,3 mM de cada iniciador, 3 mM de MgCl₂, 1 mM *Taq DNA polimerase Platinun*[®] (Invitrogen) e H₂O deionizada para completar o volume final de 50 µL. A amplificação de *BARD1* foi realizada com a ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 2 minuto, seguidas de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 59°C ou 60°C por 45 segundos e extensão a 72°C graus por 165 segundos, com extensão final de 72°C graus por 5 minutos, seguidos de resfriamento a 4°C. Para amplificar os 20 éxons do *BRIP1* foram realizadas quatro PCR multiplex contendo 0,3 mM de cada dNTP, 0,3 mM de cada iniciador, 3 mM de MgCl₂, 1 mM *Taq DNA polimerase Platinun*[®] (Invitrogen) e H₂O deionizada para completar o volume final de 50 µL. A amplificação do *BRIP1* foi realizada com a ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 2 minuto, seguidas de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento a 55°C ou 60°C ou 61°C por 45 segundos e extensão a 72°C graus por 165 segundos, com extensão final de 72°C graus por 5 minutos, seguidos de resfriamento a 4°C.

BRCA1 e *BRCA2* foram amplificados usando iniciadores cobrindo éxons e regiões intrônicas adjacentes descritos previamente (Gomes et al. 2021). Para cobrir os 24 éxons do gene *BRCA1* foram realizadas sete PCR multiplex, para cada reação de amplificação foi utilizado 1,0 µM de cada dNTP, 5 µM de cada iniciador, 2,75 mM de MgCl₂, 0,25 mM *Taq DNA polimerase Platinun*[®] (Invitrogen) e H₂O deionizada para completar o volume final de

25 µL. A amplificação de *BRCA1* foi realizada com a ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguidas de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento a 55°C ou 56°C por 45 segundos e extensão a 72°C graus por 2 minutos, com extensão final de 72°C graus por 7 minutos, seguido de resfriamento a 4°C. Para cobrir os 23 éxons do *BRCA2* foram realizadas seis PCR multiplex utilizando o mesmo termociclador com a ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94°C por 10 segundos, pareamento a 53°C e extensão de 72°C por 8 minutos, e extensão final a 72°C por 7 minutos, seguidos de resfriamento a 4°C. *ATM* e *CDHI* foram amplificados usando iniciadores cobrindo éxons e regiões intrônicas adjacentes descritos previamente (Gomes et al. 2021). Para amplificar os 63 éxons do *ATM* foram realizadas 10 PCR multiplex. Para cada reação de amplificação foi utilizado 0,125 mM de cada dNTP, 0,3 mM de cada iniciador, 10 mM de MgCl₂, 0,25 mM *Taq DNA polimerase Platinun*® (Invitrogen) e H₂O deionizada para completar o volume final de 50 µL. A amplificação do *ATM* foi realizada com a ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguidas de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, pareamento 57°C, 60°C ou 62°C por 30 segundos e extensão a 72°C graus por 2,5 minutos, com extensão final de 72°C graus por 4 minutos, seguidos de resfriamento a 4°C.

CDHI foi amplificado usando iniciadores cobrindo éxons e regiões intrônicas adjacentes descritos previamente (Gomes et al. 2019). Para amplificar os 16 éxons do *CDHI* foram realizadas 3 PCR multiplex, para cada reação de amplificação foi utilizado: 0,125 mM de cada dNTP, 10,3 mM de cada iniciador, 3 mM de MgCl₂, 1,25 mM *Taq DNA polimerase Platinun*® (Invitrogen) e H₂O deionizada para completar o volume final de 50 µL. A amplificação do *CDHI* foi realizada com a ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 90 segundos, seguidas de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C graus por 4 minutos, com extensão final de 72°C graus por 5 minutos, seguidos de resfriamento a 4°C.

CHEK2 foi amplificado usando iniciadores cobrindo éxons e regiões intrônicas adjacentes descritos previamente (Gomes et al. 2019). Uma única reação foi realizada com 0,5 mM de cada dNTP, 0,3 mM de cada iniciador, 2,0 mM de MgSO₄, 1,0 mM *Platinun*® *Taq DNA polymerase, High Fidelity* (ThermoFisher) e H₂O deionizada para completar o volume final de 50 µL. A amplificação do *CHEK2* foi realizada com a ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 30 segundos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 10 segundos, pareamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 68°C graus por 11 minutos, com extensão final de 68°C graus por 15 minutos seguidos de resfriamento a 4°C.

PALB2 foi amplificado usando iniciadores cobrindo éxons e regiões intrônicas

adjacentes descritos previamente (Gomes et al. 2021). Para amplificar os 12 éxons do *PALB2* foram realizadas em 3 PCR multiplex. Para cada reação de amplificação foi utilizado: 0,125 mM de cada dNTP, 10,3 mM de cada iniciador, 3 mM de $MgCl_2$, 1,25 mM *Taq DNA polimerase Platinun*[®] (Invitrogen) e H_2O deionizada para completar o volume final de 50 μ L. A amplificação do *PALB2* foi realizada com a ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 10 segundos, seguidas de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 10 segundos, pareamento a 64°C por 30 segundos e extensão a 72°C graus por 30 segundos, com extensão final de 72°C graus por 7 minutos, seguidos de resfriamento a 4°C. *RAD51D* e *TP53* foram amplificados usando iniciadores cobrindo éxons e regiões intrônicas adjacentes descritos previamente (Gomes et al. 2021). Para amplificar os 9 éxons do gene *PTEN* foram realizadas três PCR multiplex, para cada reação de amplificação foi utilizado: 0,5 mM de cada dNTP, 0,3 mM de cada iniciador, 2 mM de $MgCl_2$, 0,5 mM *Taq DNA polimerase Platinun*[®] (Invitrogen) e H_2O deionizada para completar o volume final de 50 μ L. A amplificação do *PTEN* foi realizada com a ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto e 30 segundos, seguidas de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento 53°C ou 64°C por 30 segundos e extensão a 72°C graus por 1,5 minutos, com extensão final de 72°C graus por 2 minutos, seguidos de resfriamento a 4°C. *RAD51D* foi amplificado usando iniciadores cobrindo éxons e regiões intrônicas adjacentes descritos previamente (Gomes et al. 2021). Para amplificar os 10 éxons do *RAD51D* foi realizada uma única reação contendo 0,5 mM de cada dNTP, 0,3 mM de cada iniciador, 2 mM de $MgCl_2$, 1 mM *Taq DNA polimerase Platinun*[®] (Invitrogen) e H_2O deionizada para completar o volume final de 50 μ L. A amplificação do gene *RAD51D* foi realizada com a ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 2 minuto e 30 segundos, seguidas de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento 58°C por 30 segundos e extensão a 72°C graus por 2 minuto 2, com extensão final de 72°C graus por 5 minutos, seguidos de resfriamento a 4°C. Para amplificar os 11 éxons do *TP53* foi realizada uma única reação contendo 0,5 mM de cada dNTP, 0,3 mM de cada iniciador, 2 mM de $MgCl_2$, 1 mM *Taq DNA polimerase Platinun*[®] (Invitrogen) e H_2O deionizada para completar o volume final de 50 μ L. A amplificação do *TP53* foi realizada com a ciclagem: desnaturação inicial a 94°C por 2 minuto, seguidas de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, pareamento 57°C por 45 segundos e extensão a 72°C graus por 2 minutos, com extensão final de 72°C graus por 5 minutos, seguidos de resfriamento a 4°C.

Todos os produtos de PCR foram purificados utilizando o protocolo de PEG (polietilenoglicol) para posteriormente serem levados para o sequenciamento. Os produtos de PCR foram transferidos para um tubo de polipropileno de 50mL, contendo o mesmo volume

da solução de PEG 20% (NaCl 2,5M + PEG 20%) ou 10% (dependendo do tamanho do fragmento) e vortexado. Em seguida os tubos eram deixados no banho Maria por 50 minutos a 37C°, seguido de uma centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado logo após, e adicionado 200 µL de etanol 80% gelado, e centrifugado novamente por mais 5 minutos a 13.000 rpm, esse passo foi repetido mais uma vez com etanol 70%. Em seguida os tubos eram colocados para secar em temperatura ambiente ou em uma estufa a 37C° até não restar vestígios de etanol no tubo.

Os produtos de PCR foram quantificados em um espectrofotômetro NanoDrop™ 1000. Posteriormente, todos os produtos amplificados de cada gene de um dado paciente foram misturados para obter uma mistura equimolar de todos os *amplicons* do gene. Em seguida as misturas de todos os genes, contendo seus produtos amplificados, do mesmo paciente foram misturadas dando origem a uma nova mistura (mistura final). Essa mistura final contendo todos os genes de um dado paciente foi quantificado utilizando o *Qubit® 3.0 Fluorometer* (Life Technologies) e o conjunto de reagentes *Qubit® dsDNA High Sensitivity Assay* (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. A mistura final foi diluída para uma concentração de 0,2ng/5µl, e uma biblioteca foi preparada para cada mistura final, utilizando o conjunto de reagentes *Nextera® XT DNA sample preparation Kit* (Illumina, San Diego, USA) conforme especificação do fabricante. E por fim, cada mistura final foi diferenciada por uma combinação específica de índice. As bibliotecas foram quantificadas por qPCR utilizando o *Kapa quantification kit* (Illumina, San Diego, USA), diluídas para 2pM, misturadas em concentrações equimolares e aplicadas sobre a lâmina de sequenciamento (*flow cell*) para a etapa de clusterização, realizada no equipamento cBot 2 System (Illumina, San Diego, USA). Em seguida foram sequenciadas na plataforma Illumina HiSeq2500 (Illumina, San Diego, USA), com leituras paired-end 2x100.

Os resultados obtidos no sequenciamento foram convertidos no formato FastQ por meio do programa CASAVA (Illumina). A qualidade das leituras (*reads*) foram obtidas por meio do programa Prinseq (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011), e as amostras que obtiverem um Q score menor que 20 foram excluídas das análises. As leituras de boa qualidade foram mapeadas utilizando o programa *Burrows-Wheeler Aligner*, BWA (LI; DURBIN, 2010) contra as regiões codificantes de cada gene, usando como referência o genoma GRCh37/hg19 disponível no bando de dados UCSC (*University of California Santa Cruz*). As leituras (*reads*) duplicadas foram removidas com auxílio do Prinseq. Por meio da análise com o programa *Genome Analysis Toolkit*, GATK (MCKENNA et al., 2010; DEPRISTO et al., 2011; VAN DER AUWERA et al., 2013) as bases lidas foram remapeadas e recalibradas,

para a identificação de variantes. As SNVs (*single nucleotide variation*) e INDELS que tiverem o alelo alternativo com frequência inferior a 20% foram removidas. Todas as variantes com cobertura inferior a 27 vezes foram removidas, seguindo protocolos anteriores (DE LEENEER et al., 2011). Ao final desse processo, as tabelas geradas foram analisadas visualmente e, quando necessário, os arquivos “.bam” foram inspecionados visualmente utilizando o programa *Integrated Genomics Viewer 2.3* (IGV, Broad Institute Cambridge, MA, USA). As variantes não descritas no banco de dados dbSNP do NCBI estão sendo denominadas de acordo com as instruções do *Human Genome Variation Society*.

3.3. Programas de predição e critérios de patogenicidade da ACMG

Para todas as variantes *missense* encontradas foram utilizados programas de predição do efeito funcional que a substituição do aminoácido poderia causar na estrutura da proteína. O programa *SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant)* (Pauline e Henikoff 2003) avalia alelos em alterações neutras, distingue o aminoácido que está sendo trocado e a posição que ele ocorre, as alterações classificadas como deletérias, apresentam $score \leq 0,05$ e as não deletérias apresentam $score > 0,05$. O programa Polyphen-2 (Adzhubei et al. 2010) calcula o efeito funcional da variante levando em consideração dois modelos de predição (*Human Div* e *Human Var*), o modelo de predição *Human Div* calcula os efeitos baseados no *Uniprot KB* que estão relacionados com doença mendeliana, e o *Human Var* prediz alelos raros e análises de seleção natural. O programa Condell (*CONsensus DELeterious score of missense SNVs/condel*; González-Pérez et al. 2011) avalia variantes não sinônimas. As alterações encontradas podem ser classificadas como benignas (não afeta a proteína), possivelmente danosas (possivelmente afeta a estrutura ou função da proteína), provavelmente danosas (alta probabilidade de afetar a proteína). Para o Polyphen-2 e o Condell são gerados $score$, onde quanto mais próximo o valor gerado for de 0, maior a probabilidade de que a variante seja benigna e quanto mais próximo de 1, maior a probabilidade de que seja patogênica. Para o preditor MaxEntScan, valores negativos abaixo -1000 sugerem que a posição não é um sítio de splice funcional, enquanto, valores positivos sugerem um sítio de splice funcional. O preditor MutationTaster utiliza três modelos diferentes voltados para diferentes tipos de alterações, tanto para alterações não sinônimas ou intrônicas, quanto para aquelas que levam à substituição/inserção/deleção de um único aminoácido, em alterações mais complexas envolvendo mutações que introduzem um códon de parada prematuro. Todos os modelos foram treinados com todos os polimorfismos comuns e mutações da doença disponíveis e adequados. Valores próximos de 1 indicam uma alta probabilidade de que a variante analisada

altere a característica de uma proteína. O preditor M-Cap (*Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity*) utiliza a combinação dos programas SIFT e PolyPhn-2 (Jagadeesh et al. 2016).

O programa align-GVGD (Tavtigian et al. 2006) combina as características biofísica do aminoácido levando em consideração a composição, polaridade e volume, juntamente com o alinhamento de proteínas de múltiplas sequências de vários vertebrados visando obter informações sobre sequências que são conservadas, para prever as substituições em genes de interesse. É gerado uma escala (C0, C15, C25, C35, C45, C55 e C65) em que o valor C0 ocorre em um aminoácido que não apresenta grau de conservação evolutiva sendo classificada como variante neutra e C65 ocorre em uma região evolutivamente conservada de *Tetraodontidae* até *Homo sapiens* (Tavtigian et al. 2006). Todas as variantes foram também submetidas ao VarSome, um site com informações de mais de 33 bilhões de variantes que analisa as informações sobre as variantes com base nos critérios e diretrizes do ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics*), que são divididas em patogênica ou benigna. A classificação de patogenicidade é subdividida em muito forte, forte, moderada e suportada, enquanto a benigna é subdividida em forte e suportada. As evidências que classificam as alterações como patogênicas são classificadas como (i) muito forte, (ii) forte, (iii) moderada ou (iv) suportada. (i) Alterações patogênicas com evidências muito fortes são denominadas PV1, e incluem alterações *nonsense*, *frameshift*, que ocorrem ± 1 ou 2 pares de base do sítio de *splice* e deleções. (ii) Alterações patogênicas com evidências fortes se subdividem em: PS1 quando há substituição de nucleotídeo considerada patogênica, PS2 quando há mutações *de novo*, PS3 se comprovadas por ensaios funcionais, PS4 quando a frequência em indivíduos afetados é significativamente maior que em controles. (iii) Alterações patogênicas com evidências moderadas se subdividem em: PM1 quando localizadas em *hotspot*, PM2 quando ausentes em indivíduos controles ou com frequência baixa, PM3 quando variantes recessivas são detectadas em trans com variantes patogênicas, PM4 quando há mudanças no comprimento da proteína devido a deleções, PM5 quando são mutações *missense* não considerada patogênica. Alterações patogênicas com evidências suportadas se subdividem em: PP1 quando há co-segregação em múltiplos familiares de uma alteração em um gene que causa doença, PP2 quando há uma variante *missense* em um gene conservado, PP3 se múltiplos programas de predição predizem que a alteração altera o produto do gene, PP4 se o fenótipo ou histórico familiar do paciente é característico de doença com etiologia genética, PP5 se uma fonte confiável sugerir a patogenicidade da variante, mas sem evidências de ensaio funcional disponíveis para uma avaliação independente.

As evidências que consideram uma alteração benigna são classificadas como (i) forte e (ii) suportada. (i) forte, se subdivide em BA1 se o alelo tem frequência >5% com base nos transcritos RefSeq & Ensembl, GnomAD (*Genome Aggregation Database*) e ClinVar, BS1 se a frequência alélica for maior que o esperado, BS2 se for observada em indivíduos saudáveis, BS3 se for estabelecido por ensaio funcional que não causa danos na proteína, BS4 se não há segregação em membros afetados de uma família; (ii) suportada, que se subdivide em BP1 se houver variante *missense* em gene que causa doença, BP2 se houver variante observada em trans com variante patogênica, BP3 se houver deleção e inserção em região repetitiva sem função conhecida, BP4 se os programas computacionais sugerirem não haver impacto no produto do gene, BP5 quando o paciente já tem uma alteração relacionada ao desenvolvimento da neoplasia, BP6 se uma fonte relatar a variante como benigna mas não existir evidência, como ensaio funcional, para fazer uma avaliação independente, BP7 se a variante sinônimo for predita por programas *in silico* como não patogênica.

Além de preditas por programas *in silico*, todas as variantes encontradas foram classificadas e comparadas com dois bancos de dados: ClinVar e BIC (*Breast information core*). No banco de dados ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ClinVar/>) as alterações são classificadas dentro de um contexto clínico associado com o fenótipo da neoplasia, como: benignas, provavelmente benigna, benigna/conflito de interpretação, provavelmente patogênicas, patogênicas, patogênicas/conflito de interpretação, VUS (*variants of Uncertain Significance*) O banco de dados do BIC (*Breast information core*, <https://research.nhgri.nih.gov/>) contém várias alterações em *BRCA1* e *BRCA2* encontradas em indivíduos com câncer de mama. A frequência das variantes também foi consultada no banco de dados projeto 1000 genoma (<http://www.internationalgenome.org/>) e GenomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>), bancos compostos por indivíduos adultos e saudáveis.

Para uma melhor caracterização clínica das pacientes foi utilizado os critérios modificados da NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*, versão 1.2021).

3.4. Ensaio Funcional para variante detectada em *PALB2*

As etapas descritas a seguir foram realizadas em colaboração com o Dr. Marcelo Alex da Divisão de Pesquisa Clínica do Instituto Nacional de Câncer. A estratégia se baseia em rotinas de PCR para geração de uma sequência alvo encerrando uma mutação desejada, baseada na rotina do kit QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis System, desenvolvida pela Stratagene (Califórnia, Estados Unidos). Para a rotina de PCR foi utilizado uma

sequência selvagem como molde e *primers* parcialmente complementares, uma DNA polimerase de alta fidelidade e alta possessividade realiza a síntese completa do plasmídeo alvo com a mutação desejada (figura 3.1, etapa 1). O plasmídeo molde é então, eliminado por meio da ação específica da endonuclease DpnI (New England Biolabs, Massachusetts, Estados Unidos), que atua seletivamente em uma sequência específica de DNA quando metilada (5'-Gm6ATC-3'). O DNA proveniente das preparações plasmidiais com origem em bactérias proficientes em DNA metilases (como a cepa DH5' α de *Escherichia coli* utilizada neste trabalho) são susceptíveis a esse tipo de digestão (figura 3.1, etapa 2). A construção plasmidial VP16:pPALB2 CT wt foi utilizada como molde para a geração das variantes localizadas na porção C-terminal de *PALB2*. As reações de mutagênese foram conduzidas utilizando iniciadores especificamente desenhados para tal e a DNA polimerase PrimeSTAR® Max (Clontech, Califórnia, Estados Unidos), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, os produtos das rotinas de PCR foram submetidos à ação da enzima de restrição DpnI, de acordo com as recomendações do fabricante.

Após a mutagênese sítio dirigida, seguimos para os ensaios envolvendo bactérias, que foram realizados utilizando *Escherichia coli* cepa DH5' α . A indução de eletrocompetência em bactérias foi realizada conforme descrito por Ausubel e colaboradores em 2002. Resumidamente, as bactérias foram cultivadas em meio LB (Luria-Bertani Broth; peptona 1% p/v, extrato de levedura 0,5% p/v, cloreto de sódio 0,5% p/v, todos Merck) sob constante agitação durante 16h a 37°C. Em seguida, uma alíquota dessa cultura foi inoculada em meio SOC (peptona 2% p/v, extrato de levedura 0,5% p/v, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, glicose 20mM, todos Merck) e cultivada sob constante agitação a 37°C. Seu crescimento foi acompanhado até que atingisse a fase exponencial (D.O.600nm de aproximadamente 0,4-0,5 unidade). Prontamente, a cultura foi mantida em gelo por 20 minutos e, posteriormente, submetida a rotinas de centrifugação (2.000 xg por 15 minutos a 4°C e desaceleração reduzida) e lavagem com glicerol 10% v/v (estéril e gelado) por 4 vezes. Finalmente, as células foram ressuspensas em glicerol 10% v/v (estéril e gelado), aliquotadas e armazenadas a -80°C.

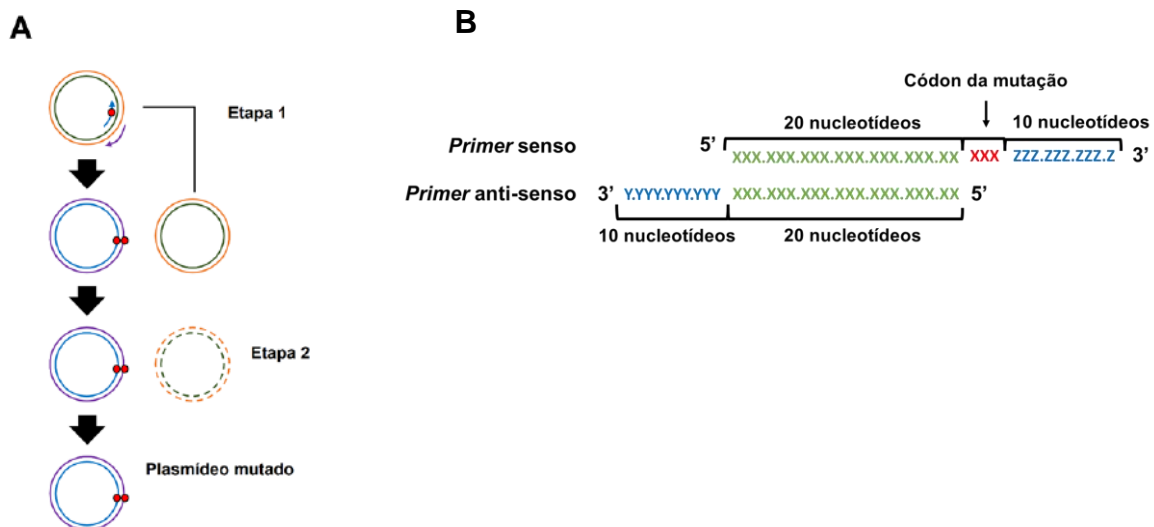


Figure 3.1 Representação esquemática da mutagênese sítio dirigida direta. (A) Na rotina de PCR, a DNA polimerase PrimeSTAR® realiza a síntese completa do plasmídeo alvo encerrando a mutação desejada (representados pelas linhas azul e roxo; círculos vermelhos representam a mutação desejada e setas azul e roxa representam os oligonucleotídeos iniciadores) (etapa 1). Na etapa 2 ocorre a eliminação do plasmídeo molde (selvagem) pela ação da enzima de restrição DpnI. Linhas tracejadas representam o plasmídeo selvagem degradado. (B) Representação do modelo de desenho dos iniciadores utilizados na mutagênese (a sequência em verde representa a região de sobreposição entre os iniciadores). Adaptado de Gomes et al. 2018.

Feito isso, as transformações bacterianas foram conduzidas pelo método de eletroporação (Neumann et al. 1982; Ausubel et al. 2002). Nessa etapa, as bactérias eletrocompetentes foram incubadas com o DNA plasmidial a ser introduzido e transferidas para uma cubeta apropriada para transformações bacterianas (BIO-RAD, Califórnia, Estados Unidos). Em seguida, foram submetidas a um pulso elétrico de 1,8kV ($E = 18 \text{ kV/cm}$) no eletroporador Micro Pulser (BIO-RAD), seguindo as instruções do fabricante. Prontamente, as bactérias foram recuperadas em meio LB e incubadas a 37°C por 1h. Posteriormente, elas foram plaqueadas em meio LB semissólido (LB + ágar 1,5% p/v) contendo antibiótico (ampicilina 50mg/mL) e incubadas durante 16h a 37°C .

Após a incubação, o isolamento de DNA plasmidial foi conduzida pelo método de lise alcalina, segundo Engebrecht e colaboradores (2001). Nessa fase, as bactérias, cultivadas em meio LB durante 16h a 37°C sob constante agitação, foram centrifugadas (16.000 xg por 5 minutos), ressuspensas em GTE (glicose 50mM, Tris-Cl 25mM pH 8,0, EDTA 10mM; contendo RNase, todos Merck), lisadas em solução alcalina (NaOH 200mM, dodecil sulfato de sódio (SDS) 1% p/v, ambos Merck) e prontamente neutralizadas em solução tampão de acetato de potássio (ácido acético glacial 29,5mM, adição de KOH até pH 4,8; ambos Merck).

Em seguida, o material foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 RPM, o sobrenadante recuperado, tratado com clorofórmio (Merck) (relação de 1:3, solvente/sobrenadante) e centrifugado novamente por 2 minutos a 10.000 RPM. A fase aquosa foi recuperada e tratada com isopropanol (Merck; relação de 0,7:1, solvente/fração aquosa) por 20 minutos a -20°C. Por fim, o material foi centrifugado a 16.000 RPM por 20 minutos a 4°C, e o DNA ressuspenso em água ultrapura (Milli-Q, Millipore, Darmstadt, Alemanha). Alternativamente, as preparações plasmidiais para rotinas de sequenciamento e transfecção de células humanas foram realizadas utilizando o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Califórnia, EUA), segundo instruções do fabricante.

Todas as construções geradas foram confirmadas através de sequenciamento automático (método automatizado de Sanger) utilizando o conjunto de reagentes BigDye Terminator v. 3.1 (Thermo Fisher Scientific), segundo as instruções do fabricante. A análise dos produtos da rotina de sequenciamento foi conduzida na plataforma ABI 3130xl (Thermo Fisher Scientific).

3.5. Cultivo *in vitro* de células humanas

Células humanas da linhagem HEK293FT (Thermo Fisher Scientific) foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% v/v de soro fetal bovino (SFB) (ambos Termo Fisher Scientific) e antibióticos penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/mL) a 37°C em atmosfera com 5% v/v de CO₂. Os subcultivos para manutenção da cultura foram realizados sempre que as células apresentavam cerca de 80 a 95% de confluência da área de cultivo. Resumidamente, a monocamada foi tratada com uma solução de tripsina 0,125% p/v e EDTA 0,02% p/v, preparadas em PBS (Phosphate Buffered Saline; todos Merck) até sua dissociação completa. Em seguida, as células foram recuperadas em meio de cultivo, centrifugadas (1.000 xg por 5min) e semeadas em novos frascos de cultivo.

Todas as rotinas de transfecção foram realizadas em células humanas de linhagem HEK293FT utilizando o reagente polietilenimina (polímero linear, peso molecular 25.000; PEI 25K) (Polysciences, Inc., Warrington, Estados Unidos). Resumidamente, 24h após o plaqueamento celular (50.000 células/cm²), o DNA plasmidial a ser transfectado foi incubado com o reagente PEI 25K (relação de 3µL de PEI: 1µg de DNA) e meio de cultura sem SFB durante 30 minutos. Em seguida, essa mistura foi adicionada ao cultivo celular e, 3h depois, o meio de cultura das células foi substituído.

Para a obtenção do extrato proteico total, as células foram dissociadas dos frascos de cultivo utilizando uma solução de tripsina, recuperadas em meio de cultivo e submetidas a rotinas de centrifugação (1.000xg por 5 minutos) e lavagem com PBS. Em seguida, elas foram ressuspensas em tampão mild-RIPA (NaCl 150mM, Tris 50mM pH 7,4, EDTA 1mM e NP40 1% v/v, todos Merck), suplementado com inibidores de proteases e fosfatases (ambos Merck), e incubadas por 30 minutos em banho de gelo. Por fim, os lisados foram centrifugados a 16.000xg por 10 minutos a 4°C, os sobrenadantes recolhidos e armazenados a -80°C. O extrato proteico total das células transfectadas foi obtido 24h após a transfecção. As concentrações de proteínas dos extratos celulares foram determinadas através do método colorimétrico descrito por Bradford (1976). Posteriormente, os extratos proteicos, previamente quantificados, foram diluídos em tampão de amostra Laemmli (Tris-Cl pH 6,8 60% v/v, glicerol 30% v/v, SDS 10% v/v, 1-4-ditiotreitol (DTT) 9,3% p/v, azul de bromofenol 0,012% p/v, todos Merck) e desnaturados por 5 minutos a 95°C. Em seguida, os extratos foram submetidos a rotinas de SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electroforesis; géis 8-12%) (Laemmli et al. 1970). Ao fim da resolução, as proteínas foram transferidas para uma membrana Hybond PVDF (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) utilizando o sistema trans-blot sd semi-dry transfer cell (Bio-Rad) sob o potencial de 20V durante 2h, segundo as recomendações dos fabricantes. Ao fim da transferência, a membrana foi incubada durante 1h em T-TBS (Tris-Buffered Saline + Tween 20; NaCl 4,0% p/v, KCl 0,1% p/v, Tris-base 1,5% p/v; pH 7,4 + Tween 20 0,1% v/v) suplementado com leite em pó desnatado 5% p/v (fase de bloqueio). Em seguida, a membrana foi incubada durante 18h à 4°C na presença de anticorpos primários Anti-VP16 (1:100) e Anti-Gal4 (1:500), diluídos em T-TBS suplementado com leite desnatado 0,5% p/v. Posteriormente, ela foi lavada por 3 vezes com T-TBS e incubada por 1h com os anticorpos secundários (Anti-mouse (1:5000), também diluídos em T-TBS suplementado com leite 0,5% p/v. Ao término da incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com T-TBS. Por fim, a revelação foi conduzida utilizando o Kit Amersham ECL Western Blotting Analysis System, seguida pela exposição da membrana ao filme radiográfico Amersham Hyperfilm ECL, seguindo as recomendações do fabricante (ambos GE Healthcare).

3.6. Ensaio de interação PALB2-BRCA2

A capacidade das variantes *missense* de *PALB2* de interagirem com *BRCA1* ou *BRCA2* foi avaliada através do método de Dois Híbridos em Mamífero (M2H) (Luo et al. 1997). Esse ensaio é baseado na ativação da transcrição (e função) de um determinado gene repórter

através da interação entre as proteínas isca e presa do ensaio. Esse sistema conta com duas proteínas quiméricas: (1) uma proteína isca, fusionada a um domínio de ligação ao DNA (GAL4 DBD) e (2) uma proteína presa, fusionada a um ativador transcricional (VP16). Além disso, o sistema também conta com um gene repórter sob o controle de elementos responsivos a GAL4. Dessa forma, caso as proteínas isca e presa interajam, haverá a aproximação de GAL4 DBD e VP16 e, conseqüentemente, a transcrição do gene repórter (Figura 3.2). Neste trabalho, a interação entre as proteínas isca e presa foi avaliada pela atividade enzimática do produto do gene repórter, como descrito a seguir.

O plasmídeo pG5luc, que encerra a seqüência codificante da enzima luciferase de *Photinus pyralis* com um promotor sob o controle de operadores de GAL4, foi utilizado como construção repórter do ensaio. O vetor pGR-TK, que encerra a seqüência codificante da luciferase de *Renilla reniformis* controlada pelo promotor HSV TK (reconhecido por células humanas e constitutivamente ativo), foi utilizado como um controle interno de transfecção do ensaio (Figura 3.2). Para o ensaio de M2H das variantes de *PALB2* localizados na região C terminal da proteína, foram utilizadas as construções plasmidiais pCMX GAL4:BRCA2 NT (produzindo a proteína de fusão BRCA2 NT-GAL4 DBD), juntamente com a construção pVP16-PALB2 CT (ou variantes), o plasmídeo repórter (pG5Luc) e o controle interno (pGR-TK).

As células humanas da linhagem HEK293FT foram semeadas em placa de 96 poços (3.000 células/poço) e, 24h depois, submetidas a rotinas de transfecção utilizando os plasmídeos correspondentes ao ensaio em questão. A leitura do ensaio de M2H foi conduzido 24h após a transfecção utilizando o conjunto de reagentes Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Resumidamente, as células foram tratadas com o tampão de lise e uma alíquota do lisado celular foi transferida para um microtubo de 1,5mL para a leitura do ensaio no luminômetro GloMax (Promega). Em cada amostra foi adicionado o reagente LARII® (que contém, dentre outros componentes, luciferina, o substrato da luciferase de *P. pyralis*, que é oxidado em uma reação que produz luz). A emissão de luz foi quantificada pelo luminômetro durante 1 segundo. Em seguida, foi adicionado o reagente Stop & Glo® (que interrompe a reação enzimática da luciferase de *P. pyralis* e fornece o substrato para a luciferase de *R. reniformis*). A emissão de luz foi quantificada novamente durante 1 segundo.

E por fim, a análise estatística dos dados foi conduzida utilizando o programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Califórnia, Estados Unidos). Foram empregados a análise de variância de uma via (one-way ANOVA) e o pós-teste de Dunnett (Dunnett's post

hoc), comparando os resultados observados para as variantes com os da proteína selvagem.

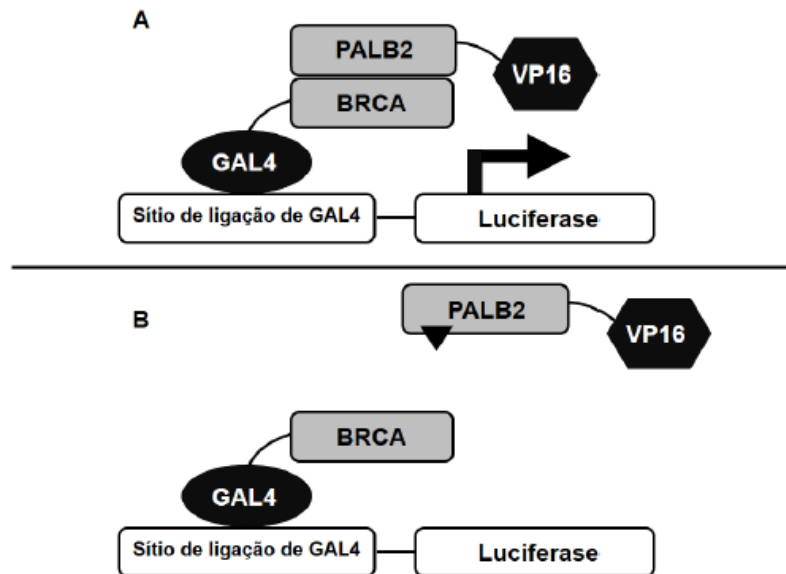


Figura 3.2 Esquema do ensaio de dois híbridos em mamífero. (A) A proteína isca (BRCA fusionada a GAL4 DBD) interage com a proteína presa (PALB2 fusionada a VP16) e promove a transcrição do gene repórter, luciferase. (B) Uma mutação em *PALB2* (representada pelo triângulo preto) corrrompe sua interação com *BRCA2* impedindo a transcrição do gene repórter (Gomes et al. 2018).

3.7 Fluxograma mostrando a divisão dos capítulos e as amostras utilizadas em cada um deles

Veja no fluxograma abaixo a divisão das amostras em cada capítulo, no capítulo 1 utilizamos duas coortes de pacientes, uma do Paraná e outra de Minas Gerais, seguindo para o capítulo 2, nesse capítulo o objetivo foi analisar o perfil de variantes em *BRCA1/2*. Seguindo para o capítulo 2 utilizamos somente uma coorte de pacientes com câncer de mama do Rio de Janeiro, nesse capítulo o objetivo foi analisar variantes germinativas em genes da via de recombinação homóloga em pacientes negativos para variantes patogênicas em *BRCA1/2*. E por fim, no capítulo 3 utilizamos 59 amostras pertencentes a coorte do capítulo 2, que são do Rio de Janeiro e acrescentamos as duas coortes do Paraná e Minas Gerais.

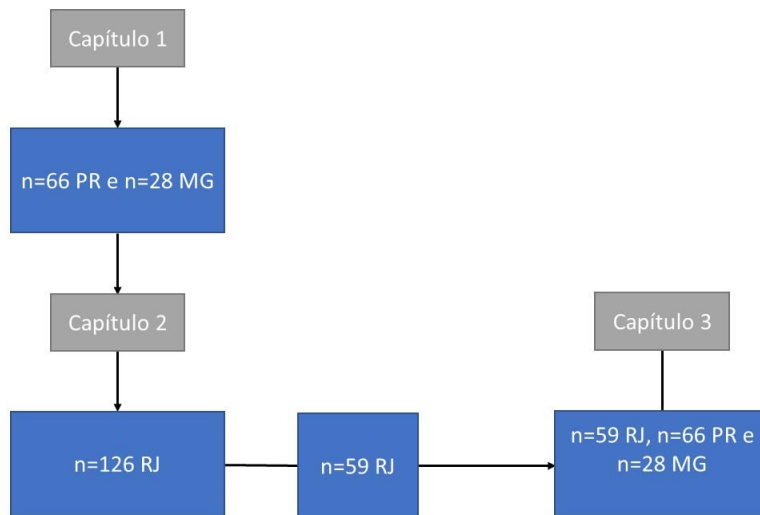


Figura 3.3 fluxograma mostrando a divisão das amostras e cada capítulo.

4. Capítulo 1. *BRCA1* and *BRCA2* variants in patients with breast cancer from Southern and Southeastern Brazil (a ser submetido na revista Genetics Molecular Biology)

Pricila da Silva Spinola¹, Renan Gomes², Sara Ferreira Valle¹, Carolina Panis³, Daniel Rech³, Luciana Agostinho^{4,5}, Cibele Rodrigues Bonvicino^{1,2*}.

¹ Pos graduate Program in Genetics – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

² Genetics Division, National Cancer Institute, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³ Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Francisco Beltrão, Francisco Beltrão, PR, Brazil

⁴ University Center Faminas, Muriaé, MG

⁵ Pos graduate Program in Neurology - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

*corresponding author: cibele.bonvicino@gmail.com

+55(21)3207-6584

Short running title (max. 35 characters): pathogenic, likely pathogenic and VUS

Abstract

BRCA1 and *BRCA2* genomic variant profiles differ according to the patient's geographic origin or ethnic groups. Brazil is especially diverse in their genetic ancestry composition, which impacts directly on the distribution of variants that confer breast cancer risk along the country. In this study we report the pathogenic, likely pathogenic and uncertain significance variants profiles in *BRCA1* and *BRCA2* genes in two populations in Brazil, one from Paraná state in Southern region, and another from Minas Gerais state in Southeastern region, and discuss their world distribution. We identified in 94 patients, nine variants of uncertain significance (VUS) and two pathogenic variants (c.181T>G p.Cys61Gly, c.190T>C p.Cys64Arg) in *BRCA1*, and four VUS, one pathogenic (c.6405_6409delCTTAA p.Ans2135LysTer3) and one likely pathogenic variant (c.6935A>T, p.Asp2312Val) in *BRCA2*. In Southern Brazil patients, we found one likely pathogenic and three pathogenic variants (4.2%, *BRCA1* n=2, *BRCA2* n=2), different from other studies in the same region, probably due to a founder effect, genetic drift, and the different colonization pattern. We also suggest that pathogenic and likely pathogenic variants found in *BRCA1* and *BRCA2* in Brazilian patients have a European origin and were spread during the European migration and colonization in Brazil.

Keywords: Breast cancer, genetic variants, hereditary and sporadic cancer

Introduction

BRCA1 and *BRCA2* are known tumor suppressor genes, involved in DNA repair, cell-cycle checkpoints, and maintenance of genomic stability (Roy et al. 2012; Kwong et al. 2016). Lifetime risks of breast and ovarian cancer are as high as 65-44% in *BRCA1* and 55-18% in *BRCA2* germline mutation carriers (Patel et al. 2020). As next-generation sequencing (NGS) panels became more approachable and less costly, increased the BRCA molecular screening, allowing the discovery of novel variants, especially that of uncertain significance (VUS), as well as a higher number of variants that still do not have a known clinical impact defined (Esposito et al. 2019).

BRCA1 and *BRCA2* profiles vary according to the population geographic origin or ethnic group (Esposito et al. 2019). The Brazilian population are especially diverse in their genetic ancestry composition, which has an impact on the distribution of genetic variants that offer a risk for breast cancer development (Dullens et al. 2020). Therefore, cancer management protocols, which includes the adoption of preventive measures, must be updated frequently according to new findings and available resources (Zavala et al. 2019). Expand the molecular data in different geographic regions of Brazil is fundamental to better characterize BRCA variation spectrum due to populational heterogeneity, as it could improve clinical recommendations, treatment, and prevention of breast cancer (Yoshida 2020).

There are several implications for carriers of pathogenic or likely pathogenic variants in *BRCA1/BRCA2* (Esposito et al. 2019), thus, increase the investigation on these genes, especially in Brazilian regions with few populational studies, can improve the identification and characterization of genetic alterations in families at high risk for breast cancer predisposition syndromes. In this study, we report the profile of pathogenic and uncertain significance variants in *BRCA1* and *BRCA2* genes in two different populations from Southern and Southeastern Brazil.

Material and Methods

This study included 94 DNA samples from breast cancer patients from Paraná state in Southern Brazil (n=66, Centro de Oncologia de Francisco Beltrão – CEONC, Paraná), and Minas Gerais state in Southeastern Brazil (n=28, Fundação Cristiano Varella, Hospital de Câncer de Muriaé - FCV, Minas Gerais). Most patients fulfilled at least one criteria of the National Comprehensive Cancer Network guidelines (Version 1.2021), of these 33 had no family history of breast cancer. Patients' data including personal history of cancer, tumor histological type, hormonal receptor status, and age at diagnosis, were obtained from clinical

records. Information regarding familial cancer history was obtained during interviews with probands (Table 4.1). This study was approved by the ethical committee of the Brazilian National Cancer Institute (C.A.A.E.00655812700005274). All individuals signed an informed consent form.

Table 4.1 Clinical and pathological characteristics of breast cancer patients from Southwest Paraná state, Southern Brazil (n=66) and Minas Gerais state, Southeastern Brazil (n=28), with or without of family history of breast, ovarian, prostate, and pancreatic cancer.

Patients - Southern Brazil	n	%	Patients - Southeastern Brazil	n	%
Breast cancer	66	100	Breast cancer	28	100
Family history			Family history		
Yes	33	66	Yes	28	100
No	33	66	No	0	0
Age at diagnosis			Age at diagnosis		
≤ 50 yeas	22	33	≤ 50 yeas	12	42
≥50 yeas	44	66	≥ 50 yeas	16	57
Histology			Histology		
Invasive ductal carcinoma	65	98	Invasive ductal carcinoma	24	85
Ductal carcinoma in situ	1	1.5	Ductal carcinoma in situ	3	10.7
Invasive lobular carcinoma	0	0	Invasive lobular carcinoma	1	3.5
Subtype molecular			Subtype molecular		
Luminal A	21	32	Luminal A	8	28
Luminal B	21	32	Luminal B	14	50
Triple Negative	16	24	Triple Negative	4	14
Her2+	5	7.5	Her2+	2	7.1
No provided	3	4.5	No provided	0	0

Sample Preparation, Sequencing and variant detection

Genomic DNA was isolated from whole blood using AllPrep DNA/RNA Mini kit reagent set (QIAGEN) following the manufacturer's recommendations. Multiplex PCR-based assays were performed as previously described (Gomes et al. 2021), purified using PureLink PCR purification kit (ThermoFisher), and quantified by Qubit fluorimeter (Life Technologies). Purified products were pooled using a rough normalization of base pair counts per multiplex PCR. Sequencing libraries were prepared using Nextera XT DNA kit (Illumina).

Sequencing was performed in two independent runs, with a paired-end (150bp dual-indexing) methodology on HiSeq2500 System (Illumina). For FASTA filtering, reads were discarded when the median coverage quality, measured by Phred quality score (Q30), was below Q30. Reads were aligned against the human reference sequence GRCh37. Sequencing

alignment was performed using Burrows-Wheeler Alignment (BWA) with default parameters. Base quality score recalibration, indel realignment and variant calling were performed using the Genome Analysis Toolkit v4.1 (GATK, Broad Institute) pipeline. Populational frequency of each variant was retrieved from the Genome Aggregation Database (gnomAD v2.1.1) (<https://gnomad.broadinstitute.org/>). Variants were reported only if coverage depth was $> 26\times$ and if the variant allele was present in $> 20\%$ of the reads, based on a theoretical model proposed (de Leeneer et al. 2011). Sequence variants were annotated using Variant Effect Prediction (McLaren et al. 2016).

Nomenclature, *in silico* analysis and variant classification

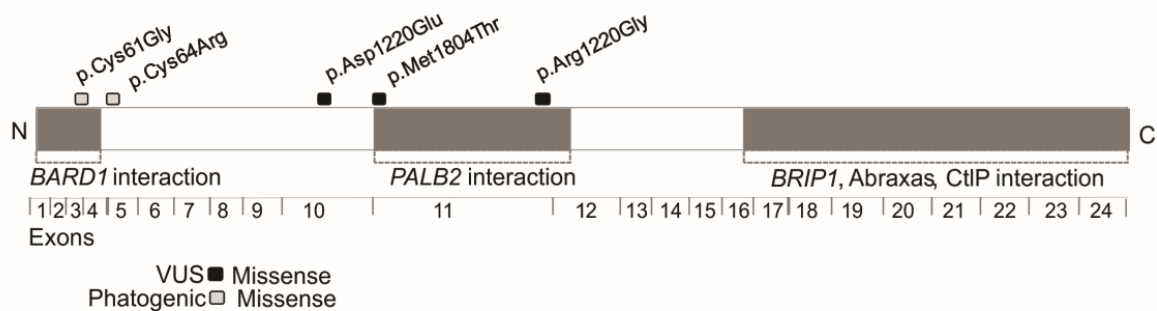
The genetic variants were described according to The Human Genome Variation Society (HGVS) guidelines (den Dunnen et al. 2016), and classified in accordance with the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) (Richards et al. 2015) in association with ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) and VarSome variant search engine (Meyer et al. 2018). Protein truncating variants (PTVs) were defined as nonsense or frameshift. We used The Improved Splice Site Detection in Genie (Reese et al. 1997) and MaxEntScan (MES) algorithm (Yeo and Burge 2004) to predict splicing-induced alteration for all variants, by adding the PP3 criterion (e.g., multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product: conservation, evolutionary, splicing impact) of ACMG guidelines to the final classification of pathogenicity, or by adding to the number of *in silico* tools with deleterious/benign prediction of missense variants.

Missense variants classified as VUS and with Minor Allele Frequency (MAF) < 0.01 at gnomAD (rare variants) were submitted to other five *in silico* prediction tools to estimate their potential pathogenicity: (i) M-CAP (Mendelian Clinically Applicable Pathogenicity), (ii) SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant), (iii) PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2), (iv) MutationTaster, and (v) Align-GVGD (values of C45 or higher were considered as deleterious). Missense variants were defined as “potentially damaging” when predicted deleterious by > 3 tools, or as “potentially benign” when predicted benign by > 3 tools, and PP3 (e.g., multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product: conservation, evolutionary, splicing impact) criteria of ACMG guidelines were added to their final classification of pathogenicity. All variants classified as pathogenic or likely pathogenic, according to the ACMG guidelines, were confirmed by Sanger sequencing.

Results

The average depth of coverage was 1174-fold, and more than 70% of the target bases were covered >26-fold (all exonic bases and at least 6 base pairs of intronic sequences at intron/exon junctions). We detected 40 *BRCA1* variants (20 missenses, 8 synonymous, 12 non-coding variants), among them we identified 37 benign, nine VUS and two pathogenic c.181T>G (p.Cys61Gly), and c.190T>C (p.Cys64Arg) (SI1, table 4.2). The *BRCA1* pathogenetic variants of patients with family history are localized in the functional domains of the gene (Fig.4.1). Two *BRCA1* VUS c.5411T>C (p.Met1804Thr), c.3659A>G (p.Arp1220Gly) of patients with family history are localized inside the functional domain, and one was found outside this domain c.3660 T>G (p.Asp1220Glu) (Fig.4.1).

BRCA1



BRCA2

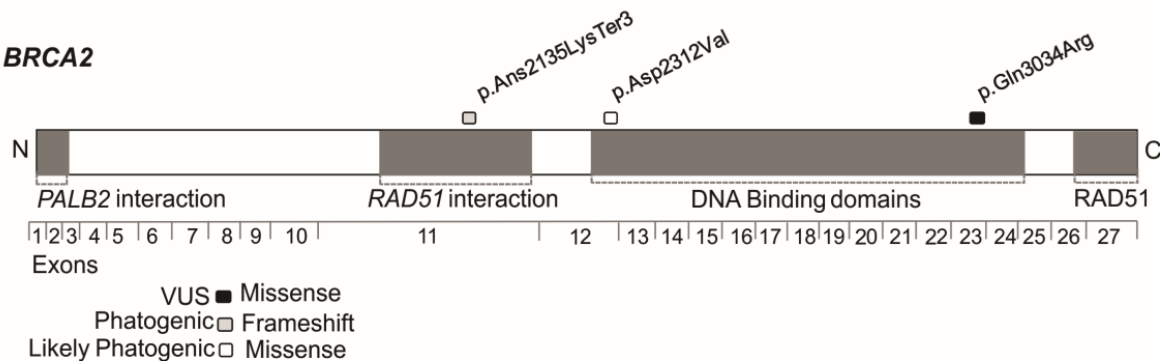


Figure 4.1 Schematic representation of main functional domains of the *BRCA1* and *BRCA2* protein with localization of the variants detected. Dashed lines represent the boundaries between exons and numbers represent the 24 exons for *BRCA1* and 27 exons for *BRCA2*. N= N Terminal, C= C terminal.

We identified the *BRCA1* pathogenic variant c.181T>G (p.Cys61Gly), in a proband and 10 relatives, and the *BRCA1* pathogenic variant c.190T>C (p.Cys64Arg) in another proband and eight relatives (Fig.4.2 and 4.3). The global geographic distribution of *BRCA1* pathogenic variants herein detected are available in figure 4.4.

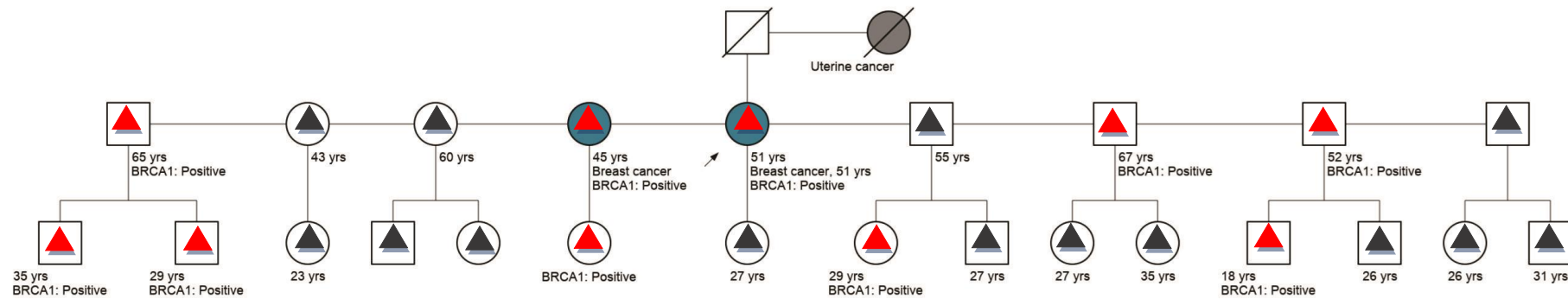


Figure 4.2 Pedigree of the patient carrying *BRCA1* p.Cys61Gly variant, showing individuals positive or negative for the mutation. The proband is indicated with an arrow, circles indicate females, squares males, slashes death, and blue circles individuals with breast cancer. Red triangles represent individuals positive for the presence of the variant and gray triangles represent individuals negative for the presence of the variant.

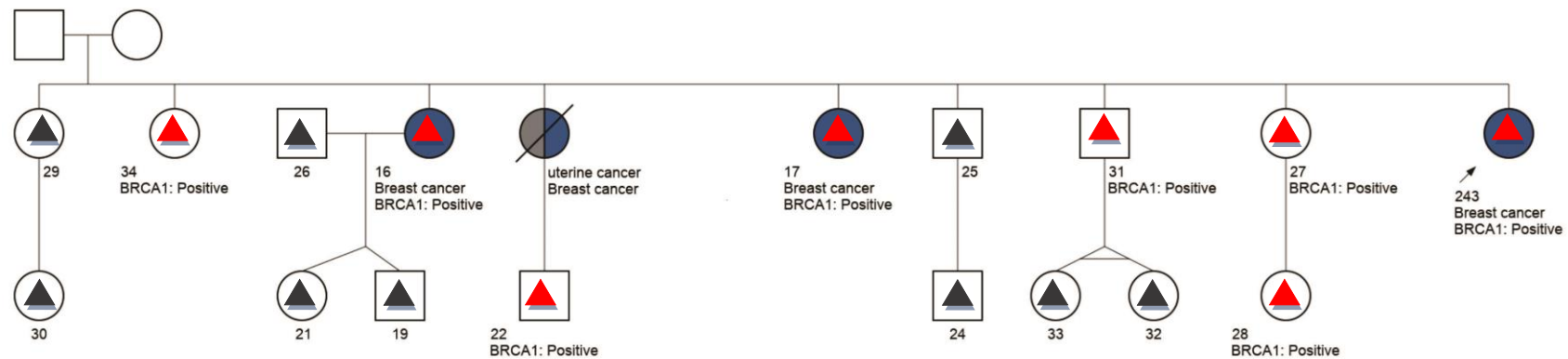


Figure 4.3 Pedigree of a family carrying *BRCA1* p.Cys64Arg variant showing individuals positive or negative for the mutation. Proband is indicated with an arrow. Circles indicate females, squares males, slashes death, gray circle individual with uterine cancer, and blue circles individuals with breast cancer. Red triangles represent individuals positive for the presence of the variant and gray triangles represent individuals negative for the presence of the variant.

We identified 62 *BRCA2* variants (21 missense, 18 synonymous, one deletion, two in 5'UTR region, 20 non-coding), being 56 benign, five VUS, one pathogenic, and one likely-pathogenic. The pathogenic variant c.6405_6409delCTTAA (p.Ans2135LysTer3) is located in the *RAD51* interaction domain, and the VUS c.9101A>G (p.Gln3034Arg) and the likely pathogenic variant c.6935A>T, (p.Asp2312Val), in the DNA binding domains (Table 4.2, fig.4.1). The global geographic distribution of *BRCA2* pathogenic variants herein detected are available in figure 4.4.

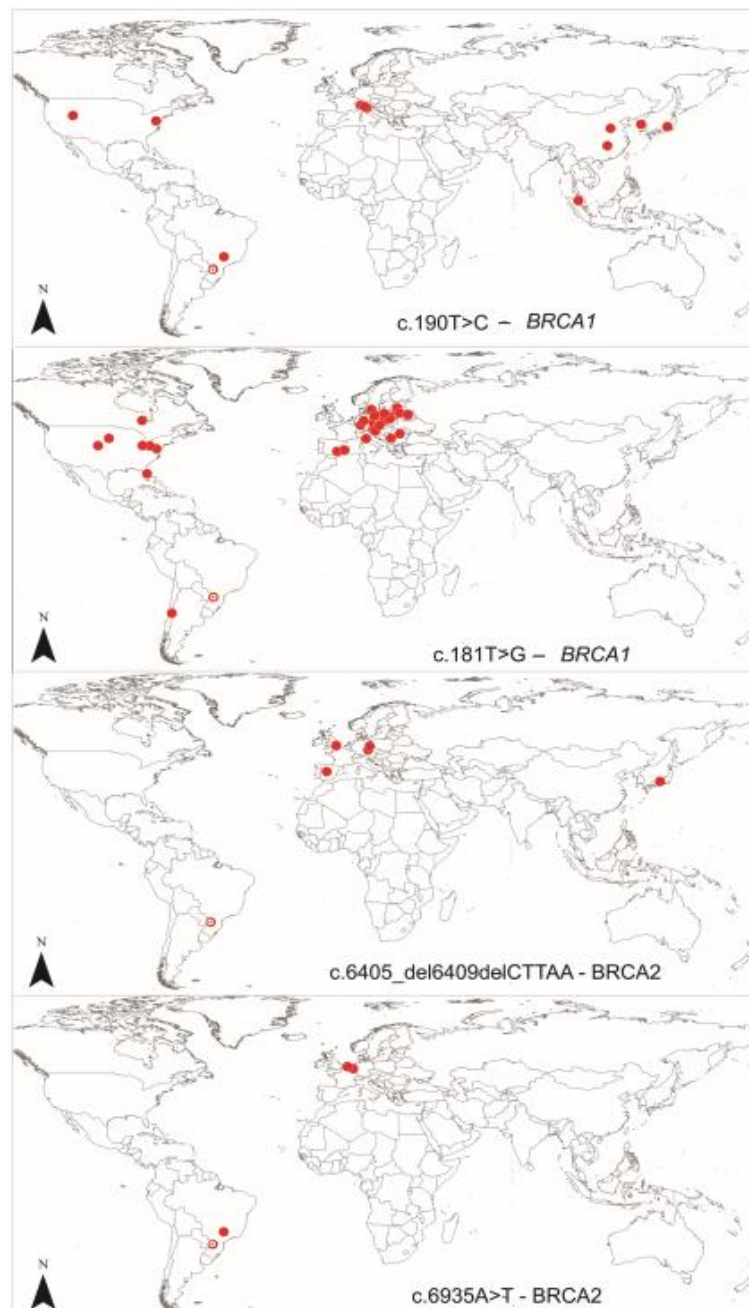


Figure 4.4 World records (red dots) of the pathogenic variants found in *BRCA1* and *BRCA2* genes in Southwestern Paraná population (red and white dots).

Table 4.2 Profile of germline variants in *BRCA1/2* positive patients that meeting or not meeting NCCN (version 1.2121) criteria for genetic testing, indicating pathogenic (P), conflicting, and variants uncertain significance (VUS). The table shows the identification of the variants (dbSNP ID), the nomenclature according to the Human Genome Variation Society (HGVS), frequency of variants according to GenomAD database, the classification of the variants according to the ClinVar databases (ClinVar), and the American Collage of Medical Genetics and Genomics and the association for molecular pathology (ACMG) with ACMG's variant classification recommendations. All patients had unilateral breast cancer.

	dbSNP ID	HGVS	Classification			Criteria	GenomAD	ClinVar	Clinical features	
			Age	Mol.Sub	histologic	NCCN			Criteria ACMG	ACMG
B R C A 1	rs55808233	c.5411T>C p.Met1804Thr	29	LB	IDC	Yes	1.19E-04	Conflicting	PM1, PM2, PP3	VUS
	rs28897672	c.181T>G p.Cys61Gly sul 49	51	LB	IDC	Yes	3.19E-05	P	PM1, PM2, PM5, PP3, PP5	P
	rs766572561	c.3659A>G p.Arg1220Gly	56	LA	IDC	Yes	3.18E-05	VUS	PM1, PM2, PP3	VUS
	rs80357064	c.190T>C p.Cys64Arg sul 243	52	TN	IDC	Yes	1.20E-05	P	PM1, PP5, PM2, PM5, PP3	P
	Without	c.3660 T>G p.Asp1220Glu	50	LA	IDC	Yes	Na	VUS	PM2	VUS
B R C A 2	rs80359164	c.9101A>G p.Gln3034Arg	60	LA	IDC	No	1.20E-05	VUS	PM2, BP4	VUS
	rs80359584	c.6405_6409delCTTAA p.Ans2135LysTer3 -sul 82	43	:	IDC	Yes	4.16E-05	P	PVS1, PM2, PP5	P
	rs80358916	c.6935A>T p.Asp2312Val sul 80	62	HER2+	DCIS	No	Na	Conflicting	PM2, PP3	LP

Legenda:

Criteria for clinical classification of variants: PM1= variant located in functional domain of the gene or hot spot, PM2= absent or extremely low frequency in controls or population banks, PP3= several lines of computational evidence show a deleterious effect on the gene (conservation, evolution, altered splicing), PM5= missense variant present at an amino acid residue where a different missense has already been classified as pathogenic, PP5= reliable source reports the variant as pathogenic, BP4= several lines of computational evidence suggest no impact in the gene, PVS1= nonsense, frameshift, splicing sites in genes where loss of function is a known disease mechanism. Hystologic type: IDC= invasive ductal carcinoma, DCIS= ductal carcinoma in situ. Molecular subtype (Mol.Sub): LA= Luminal A, LB= Luminal B, TN= Tripe Negative, HER2+= Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2.

Discussion

We found a slighter different frequency of variants in Southern Brazil/ Paraná state patients (4.2%, *BRCA1* n=2 and *BRCA2* n=2) in relation to another study with patients from Southern Brazil, in Rio Grande do Sul state (3.5%, *BRCA1* n=6 and *BRCA2* n=2; Alemar et al. 2016). Whereas in this latter study the Ashkenazi Jewish founder mutations c.5266dupC was found, another study in the same state and region did not find this pathogenic variant (Dillenburg et al. 2012), which could be due to patient selection criteria, strong gene drift or admixture between populations. Additionally, a third study in Rio Grande do Sul state (Ewald et al. 2016) found a lower frequency of BRCA variant (1.4%, *BRCA1* n=2 and *BRCA2* n=3), and two variants, c.547+240_5193+178del and c.4675+467_5075-990del, not identify in our and other studies (Dillenburg et al. 2012; Alemar et al. 2016). This picture showed the genetic diversity in Southern Brazil, probably related to the regional colonization patterns, as the Brazilian population is genetically heterogeneous due to five centuries of admixture between Amerindians, Europeans, and Africans. The prevalence of matrilineal lineages differs among Brazilian regions, in the South region European haplogroups are more frequent (66%), in the Amazonian region the Amerindian (54%), and in the Northeast region the African ancestry (44%; Pena et al. 2011). Specifically, from 1943 onwards, the region of Paraná state, where Francisco Beltrão is localized, was colonized by agricultural colonies composed mainly of Italian and German descendants, but also by Poles (Serova et al. 1997; Fernandes et al. 2016; Brasil et al. 2017; Casaril 2017; Rizzarda 2018).

The missense *BRCA1* pathogenic variant c.181T>G (p.Cys61Gly) that we found in one patient from southwest Paraná, segregates in family members with breast cancer (Figure 2). The pathogenicity of the missense pathogenic variant c.181T>G (p.Cys61Gly) is related to loss of protein function, as it affects the RING domain of *BRCA1* and disrupts its interaction with *BARD1*, and has already been found segregating in European families with breast cancer (Wu et al. 1996; Humphrey et al. 1997; Brzovic et al. 1998). This variant is a founder mutation, originated after the radioactive accident in Chernobyl in 1986 (Håkansson et al. 1997; Bergthorsson et al. 2001; Pukkala et al. 2006; Elsakov et al. 2010; Bogdanova et al. 2010; Strom et al. 2015). It was reported in a single Brazilian patient from Southeastern Brazil, without information about the patient's ascendancy (Carraro et al. 2013), Chile (Jara et al. 2004) and in North America (Castilla et al. 1994; Friedman et al. 1994; Merajver et al. 1995; Serova et al. 1996; Jara et al. 2004; Zhang et al. 2011; Rummel et al. 2013; Pearlman et al. 2017; Brand et al. 2018). This *BRCA1* pathogenic variant (c.181T>G p.Cys61Gly) is considered of European origin, being widespread and common in the European population

(Johannsson et al. 1996; Wagner et al. 1998; Csokay et al. 1999; Grzybowska et al. 2000; Steinmann et al. 2001; Meyer et al. 2003; Perkowska et al. 2003; Foretova et al. 2004; Pohlreich et al. 2005; Górski 2006; Machackova et al. 2008; Cherbal et al. 2010; Elsakov et al. 2010; Negura et al. 2010; Bogdanova et al. 2010; Uglanitsa et al. 2010; Szwiec et al. 2015; Wojcik et al. 2016; Gabaldó Barrios et al. 2017; Lener et al. 2017; Tedaldi et al. 2017; Jakimovska et al. 2018; Kluz et al. 2018; Kowalik et al. 2018; Figure 4.4). Therefore, we assume that the mutation c.181T>G (p.Cys61Gly) found in the proband (Figure 4.2) is related to the Polish origin of her family, as Poland is a neighbor country of Ukraine, where the Chernobyl Nuclear Power Plant accident occurred.

The missense *BRCA1* pathogenic variant c.190T>C (p.Cys64Arg), that we found in one Brazilian patient from southwest Paraná state with European ancestry, was first described in an African American patient diagnosed with early-onset breast and ovarian cancer (Castilla et al. 1994). The pathogenicity of the missense variant c.190T>C (p.Cys64Arg), found in a European patient, is related to the loss of the RING domain interaction of *BRCA1* with *BARD1* (Wu et al. 1996). According to the Ensembl database, it was reported in African American descents, in one Southeast Brazilian patient without ancestry information (Fernandes et al. 2016), European descendants from the Western United States (Serova-Sinilnikova et al. 1997), Asia (Nakamura et al. 2015; Park et al. 2017; Li et al. 2018; Wen et al. 2018; Deng et al. 2019), and Europe (Aretini et al. 2003; Marchina et al. 2010; Caleca et al. 2014; Foo et al. 2017). Interestingly, there is evidence of this variant in the Asia, Europe, North and South America, but not in Africa (Fig. 4.4).

The *BRCA2* pathogenic variant c.6405_6409delCTTAA (p.Ans2135LysTer3), herein detected in one patient from southwestern Paraná state, is located in the functional domain of this gene, and it is predicted as pathogenic by five *in silico* prediction software's (table 4.2). The variant c.6405_6409delCTTAA (p.Ans2135LysTer3) is a five-nucleotide deletion that modifies the reading frame of the gene, generating a termination codon at position 3 (Kote-Jarai et al. 2011). Since it is also located in the functional domain of *BRCA2*, a region that interacts with *RAD5D* (Biswas et al. 2012), it is likely to affect the interaction between the genes. Although it was already described in patients from Asia (Momozawa et al. 2018), it is more common in European countries (Machackova et al. 2008; Kote-Jarai et al. 2011; de Juan et al. 2015; Meisel et al. 2017; Figure 4). The *BRCA2* likely-pathogenic variant c.6935A>T (p.Asp2312Val), herein detected in one patient in southwestern Paraná state, was classified by several ACMG criteria with a high probability to be pathogenic and causes an amino acid exchange in the functional domain of *BRCA2*, the DNA recognition region, affecting the

functionality of the gene (Biswas et al. 2012). It was already reported in the European population with cancer (Brandão et al. 2011; Trujillano et al. 2015) (Figure 4).

Furthermore, we detected three missense variants of uncertain significance in *BRCA1*, each of them only in one patient with a strong family history of cancer from the southwestern Paraná population. The first variant of uncertain significance and missense c.3659A>G (p.Arg1220Gly) is located in the functional domain of *BRCA1* that interacts with *PALB2*, possibly affecting gene functionality, but is not classified as pathogenic. Although further functional studies are needed to investigate the exact role of c.3659A>G variant, we recommend being careful during clinical and genetic counselling of this mutation carriers.

The second variant of uncertain significance in *BRCA1* c.5411T>C (p.Met1804Thr) is located in the functional domain of *BRCA1*, which interacts with *PALB2*, however, there are not yet enough reports in the literature showing the pathogenicity of this variant. In the present study it was detected in a 29-year-old patient with a family history of breast cancer, luminal B molecular subtype, and invasive ductal carcinoma. It is known that variants located in the functional domain of *PALB2*, which interacts with other genes can prevent the interaction between *PALB2-BRCA1* and *RAD51* (Nepomuceno et al. 2020). And the third variant detected in *BRCA1* c.3660 T>G (p.Asp1220Glu) is located in exon ten of the gene, so far it is a variant of uncertain significance, and there is no information in the literature about this variant. Further studies such as functional assays, segregation analysis among family members will be needed to observe a possible association.

In *BRCA2* we found only one variant of uncertain significance c.9101A>G (p.Gln3034Arg), which was first described in a 43-year-old fallopian tube cancer patient with a low family history. This variant is present in exon 23 of *BRCA2*, and the nucleotide change causes the loss of a highly conserved amino acid residue and is expected to cause a major change in the structure of *BRCA2* (Baudi et al. 2003). In the present study the variant is being reported for the second time in a 60-year-old breast cancer patient with no family history. Given this picture, there is still insufficient data to clarify the clinical relationship of this variant with the neoplasm.

Statements and Declarations

Conflict of interest - The authors declare that they have no conflict of interest.

Authors' contributions - Study conception and design: Cibele Rodrigues Bonvicino. DNA sequencing: Pricila Spínola. Identification of genetics variants and pathogenicity classification: Pricila Spínola. Bioinformatic analysis: Renan Gomes and Pricila Spínola. Variant's validation: Sara Ferreira

Valle, manuscript writing: Pricila Spínola and Cibele R. Bonvicino. Funding acquisition: Cibele R. Bonvicino. Providing patient samples: Carolina Panis, Daniel Rech and Luciana Agostinho. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

Funding - This study was conducted at the Brazilian National Cancer Institute (INCA) and was supported by grants to CR Bonvicino from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 304498/2014-9) and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ E26/201.200/2014 from the Oswaldo Cruz Institute), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowship to Pricila Spínola.

Data availability - All raw data supporting the conclusions in this paper will be made available by the authors without undue reservation.

Ethical Approval - All the patients and healthy individuals included in the present study signed an informed consent form following the approval of the research by the local ethics committees at the institutions where patients were being treated (resolutions 954.548 and FR –463464).

Informed consent open access - All individuals who participate in this study provided written informed consent approved by the local ethics committee. No identifiable personal patient data are show in this article.

Supplementary material

SI.1 List of variants in *BRCA1* and *BRCA2* genes, with identification (Id-dbSNP), transcript position (cDNA), protein, function, classification in ClinVar/Varsome, and number of Brazilian patients from Southeastern region in Minas Gerais state (MG), and from Southern region in Paraná state (PR).

Gene	Id-dbSNP	cDNA	Protein	Function	Varsome/ ClinVar	Nº patient
<i>BRCA2</i>	rs206075	c.4563A>G	P.Leu1521	Synonymous	Benign	MG 33
<i>BRCA2</i>	rs1801426	c.10234A>G	p.Ile3412Val	Missense	Benign	MG 2
<i>BRCA2</i>	rs1060915	c.4308T>C	p.Ser1436	Synonymous	Benign	MG 21
<i>BRCA2</i>	rs11571622	c.516+21A>T	-	Intronic	Benign	MG 1
<i>BRCA2</i>	rs11571623	c.517-19C>T	-	Intronic	Benign	MG 1
<i>BRCA2</i>	rs11571642	c.1788T>C	p.Asp596	Synonymous	Benign	MG 1
<i>BRCA2</i>	rs11571651	c.1910-51G>T	-	Intronic	Benign	MG 1
<i>BRCA2</i>	rs11571707	c.7469T>C	p.Ile2490Thr	Missense	Benign	MG 1
<i>BRCA2</i>	rs11571744	c.8487+47C>T	-	Intronic	Benign	MG 1
<i>BRCA2</i>	rs11571769	c.8851G>A	p.Ala2951Thr	Missense	Benign	MG 1
<i>BRCA2</i>	rs144848	c.1114A>C	p.Asn372His	Missense	Benign	MG 22
<i>BRCA2</i>	rs144862123	c.2926T>A	p.Ser976Thr	Missense	Benign	MG 1
<i>BRCA2</i>	rs169547	c.7397T>C	p.Val2466Ala	Missense	Benign	MG 37
<i>BRCA2</i>	rs1799943	c.-26G>A	-	5'UTR	Benign	MG 8
<i>BRCA2</i>	rs1799944	c.2971A>G	p.Asn991Asp	Missense	Benign	MG 1
<i>BRCA2</i>	rs1799955	c.7242A>G	p.Ser2414	Synonymous	Benign	MG 10
<i>BRCA2</i>	rs1801406	c.3396A>G	p.Lys1132	Synonymous	Benign	MG 10
<i>BRCA2</i>	rs1801426	c.10234A>G	p.Ile3412Val	Missense	Benign	MG 2
<i>BRCA2</i>	rs1801499	c.2229T>C	p.His743	Synonymous	Benign	MG 1

Gene	Id-dbSNP	cDNA	Protein	Function	Varsome/ ClinVar	N° patient	
BRCA2	rs206076	c.6513G>C	p.Val2171	Synonymous	Benign	MG37	
BRCA2	rs2126042	c.681+56C>T		Intronic	Benign	MG 4	
BRCA2	rs2320236	c.1910-74T>C		Intronic	Benign	MG 4	
BRCA2	rs11571657	c.5640T>G	p.Asn1880Lys	Missense	Benign	MG 1	
BRCA2	rs1801439	c.1365A>G	p.Ser455	Synonymous	Benign	MG 1	
BRCA2	rs4942486	c.8755-66T>C		Intronic	Benign	MG 4	
BRCA2	rs4987117	c.5744C>T	p.Thr1915Met	Missense	Benign	MG 1	
BRCA2	rs543304	c.3807T>C	p.Vall1269	Synonymous	Benign	MG 15	
BRCA2	rs9534262	c.7806-14T>C		Intronic	Benign	MG 19	
BRCA2	rs766173	c.865A>C	p.Asn289His	Missense	Benign	MG 1	
BRCA2	rs81002830	c.68-7T>A		Intronic	Benign	MG 1	
BRCA2	rs9595456	c.9257-83G>A		Intronic	Benign	MG6	
BRCA1	rs3092995	c.*36C>G		3'UTR	Benign	MG 2	
BRCA1	rs16940	c.4563A>G	p.Leu771	Synonymous	Benign	MG 21	
BRCA1	rs16941	c.3113A>G	p.Glu1038Gly	Missense	Benign	MG 19	
BRCA1	rs16942	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	Missense	Benign	MG 20	
BRCA1	rs1799949	c.2082C>T	p.Ser694	Synonymous	Benign	MG 22	
BRCA1	rs1799950	c.1067A>G	p.Gln356Arg	Missense	Benign	MG 3	
BRCA1	rs1799966	c.4900A>G	p.Ser1634Gly	Missense	Benign	MG 2	
BRCA1	rs192655097	c.2458A>G	p.Lys820Glu	Missense	Benign	MG 1	
BRCA1	rs3765640	c.-18-115T>C	-	Intronic	Benign	MG 1	
BRCA1	rs4986850	c.2077G>A	p.Asp693Asn	Missense	Benign	MG 6	
BRCA1	rs4986852	c.3119G>A	p.Ser1040Asn	Missense	Benign	MG 1	
BRCA1	rs55808233	c.5411T>C	p.Met1808Thr	Missense	VUS	MG 1	
BRCA1	rs754597283	c.3238T>C	p.Leu1080=	Synonymous	VUS	MG 1	
BRCA1	rs799923	c.442-34C>T	-	Intronic	Benign	MG 12	
BRCA1	rs80358111	c.4424-13C>T	-	Intronic	Benign	MG 1	
BRCA1	rs8176128	c.212+23T>A	-	Intronic	Benign	MG 2	
BRCA1	rs3092994	c.5152+66G>A	-	Intronic	Benign	PR 24	
BRCA1	rs1799966	c.4837A>G	p.Ser1613Cys	Missense	Benign	PR 25	
BRCA1	rs1060915	c.4308T>C	p.Ser1436	Synonymous	Benign	PR 24	
BRCA1	rs16942	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	Missense	Benign	PR 23	
BRCA1	rs1799967	c.4956G>A	p.Met1652Ile	Missense	Benign	PR 2	
BRCA1	rs1800709	c.2521C>T	p.Arg841Trp	Missense	Benign	PR 1	
BRCA1	rs1801406	c.3396A>G	p.Lys1132	Synonymous	Benign	PR 18	
BRCA1	rs28897689	c.4039A>G	p.Arg1347Gly	Missense	Benign	PR 1	
BRCA1	rs4986850	c.2077G>A	p.Asp693Asn	Missense	Benign	PR 6	
BRCA1	rs4986852	c.3119G>A	p.Ser1040Asn	Missense	Benign	PR 3	
BRCA1	without	c.670+36A>G	-	Intronic	VUS	PR 6	
BRCA1	without	c.3660T>G	p.Asp1220Glu	Missense	VUS	PR 2	
BRCA1	without	c.670+37A>G	-	Intronic	VUS	PR 1	
BRCA1	without	c.213-232A>C	-	Intronic	VUS	PR 1	
BRCA1	rs16940	c.2311T>C	p.Leu771	Synonymous	Benign	PR 24	
BRCA1	rs16941	c.3113A>G	p.Glu1038Ala	p.Glu1038Gly	Missense	Benign	PR 24
BRCA1	rs1799949	c.2082C>T	p.Ser694	Synonymous	Benign	PR 24	
BRCA1	rs1799950	c.1067A>G	p.Gln356Arg	Missense	Benign	PR 8	
BRCA1	rs189352191	c.212+253G>A	-	Intronic	VUS	PR 2	
BRCA1	rs28897672	c.181T>G	p.Cys61Gly	413	Missense	Pathogenic	PR 1
BRCA1	rs766572561	c.3659A>G	p.Asp1220Gly		Missense	VUS	PR 1
BRCA1	rs799912	c.213-161A>G	-	Intronic	Benign	PR 23	
BRCA1	rs799917	c.2612C>T	p.Pro871Arg		Synonymous	VUS	PR 25
BRCA1	rs799923	c.442-34C>T	-	Intronic	Benign	PR 12	
BRCA1	rs80356927	c.2584A>G	p.Lys862Glu		Missense	Benign	PR 1
BRCA1	rs8176130	c.212+430G>A	-	Intronic	Benign	PR 23	
BRCA1	rs8176133	c.213-485T>G	-	Intronic	Benign	PR 25	
BRCA2	rs538947930	c.67+58A>G	-	Intronic	Benign	PR 17	
BRCA2	rs2126042	c.681+56C>T/G	-	Intronic	Benign	PR 13	
BRCA2	rs206073	c.793+98G>A	-	Intronic	Benign	PR 42	

Gene	Id-dbSNP	cDNA	Protein	Function	Varsome/ ClinVar	Nº patient
<i>BRCA2</i>	rs206076	c.6513G>C	p.val2171	Synonymous	Benign	PR 42
<i>BRCA2</i>	rs206080	c.6938-120T>C	-	Intronic	Benign	PR 42
<i>BRCA2</i>	rs169547	c.7397C>T	p.Ala2466Val	Missense	Benign	PR 42
<i>BRCA2</i>	rs4942486	c.8755-66T>C	-	Intronic	Benign	PR 14
<i>BRCA2</i>	rs11571747	c.8567A>C	p.Glu2856Ala	Missense	Benign	PR 1
<i>BRCA2</i>	rs1801406	c.3396A>G	p.Lys1132Asn	Synonymous	Benign	PR 18
<i>BRCA2</i>	rs4987047	c.8830A>T	p.lle2944Phe	Missense	Benign	PR 1
<i>BRCA2</i>	rs4987117	c.5744C>T	p.Thr1915Met	Missense	Benign	PR 1
<i>BRCA2</i>	without	c.7617+51A>C	-	Intronic	VUS	PR 1
<i>BRCA2</i>	without	c.7617+53T>G	-	Intronic	VUS	PR 1
<i>BRCA2</i>	without	c.9705C>A	p.Ala3235	Synonymous	VUS	PR 1
<i>BRCA2</i>	without	c.4587G>T	p.Gly1529	Synonymous	VUS	PR 1
<i>BRCA2</i>	rs11147489	c.7435+53C>T	-	Intronic	Benign	PR 3
<i>BRCA2</i>	rs11571769	c.8851G>A	p.Ala2951Thr	Missense	Benign	PR 3
<i>BRCA2</i>	rs144848	c.1114A>C	p.His372Asn	Missense	Benign	PR 15
<i>BRCA2</i>	rs1799943	c.-26G>A	-	5'UTR	Benign	PR 18
<i>BRCA2</i>	rs1799944	c.2971A>G	p.Asn991Asp	Missense	Benign	PR 4
<i>BRCA2</i>	rs1799955	c.7242A>G	p.Ser2414	Synonymous	Benign	PR 12
<i>BRCA2</i>	rs1801426	c.10234A>G	p.lle3412Val	Missense	Benign	PR 2
<i>BRCA2</i>	rs1801439	c.1365A>G	p.Ser455	Synonymous	Benign	PR 5
<i>BRCA2</i>	rs206075	c.4563A>G	p.Leu1521	Synonymous	Benign	PR 30
<i>BRCA2</i>	rs28897724	c.4068G>A	p.Leu1356	Synonymous	Benign	PR 1
<i>BRCA2</i>	rs543304	c.3807T>C	p.Val1269	Synonymous	Benign	PR 12
<i>BRCA2</i>	rs766173	c.865A>C	p.Asn289Asp	Missense	Benign	PR 5
<i>BRCA2</i>	rs80359164	c.9101A>G	p.Gln3034Arg	Missense	VUS	PR 1
<i>BRCA2</i>	rs9534262	c.7806-14T>C	-	Intronic	Benign	PR32
<i>BRCA2</i>	rs9595456	c.9257-83G>A	-	Intronic	Benign	PR 1

References

- Aleamar B, Herzog J, Brinckmann Oliveira Netto C, Artigalás O, Schwartz IVD, Matzenbacher Bittar C, Ashton-Prolla P and Weitzel JN (2016) Prevalence of Hispanic *BRCA1* and *BRCA2* mutations among hereditary breast and ovarian cancer patients from Brazil reveals differences among Latin American populations. *Cancer Genet* 209:417–422.
- Aretini P, D'Andrea E, Pasini B, Viel A, Costantini RM, Cortesi L, Ricevuto E, Agata S, Bisegna R, Boiocchi M et al. (2003) Different expressivity of *BRCA1* and *BRCA2*: Analysis of 179 Italian pedigrees with identified mutation. *Breast Cancer Res Treat* 81:71–79.
- Bergthorsson JT, Ejlertsen B, Olsen JH, Borg A, Nielsen K V, Barkardottir RB, Klausen S, Mouridsen HT, Winther K, Fenger K et al. (2001) *BRCA1* and *BRCA2* mutation status and cancer family history of Danish women with multifocal or bilateral breast cancer at a young age. 38:361–368.
- Brand R, Borazanci E, Speare V, Dudley B, Karloski E, Peters MLB, Stobie L, Bahary N, Zeh H, Zureikat A et al. (2018) Prospective study of germline genetic testing in incident cases of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 124:3520–3527.
- Brandão RD, Van Roozendaal K, Tserpelis D, García EG and Blok MJ (2011) Characterisation of unclassified variants in the *BRCA1/2* genes with a putative effect on splicing. *Breast Cancer Res Treat* 129:971–982.
- Brasil EP, Aparecida M and Stormoski P (2017) Revolta dos Posseiros : Colonização do Sudoeste Do Paraná 7:1-12.

- Brzovic PS, Meza J, King MC and Klevit RE (1998) The cancer-predisposing mutation C61G disrupts homodimer formation in the NH2-terminal BRCA1 RING finger domain. *J Biol Chem* 273:7795–7799.
- Caleca L, Putignano AL, Colombo M, Congregati C, Sarkar M, Magliery TJ, Ripamonti CB, Foglia C, Peissel B, Zaffaroni D et al. (2014) Characterization of an Italian Founder Mutation in the RING-Finger Domain of *BRCA1* 9:e86924.
- Carraro DM, Aparecida M, Koike A, Cristina B, Lisboa G, Helena E, Olivieri R, Cristina A, Krepischi V, Carvalho AF De et al. (2013) Comprehensive Analysis of *BRCA1*, *BRCA2* and TP53 Germline Mutation and Tumor Characterization: A Portrait of Early-Onset Breast Cancer in Brazil. 8:7–9.
- Casaril CC (2017) the Social-Spatial Formation of the Southwest of Paraná. *Mercator* 16:1–20.
- Castilla LH, Couch FJ, Erdos MR, Hoskins KF, Calzone K, Garber JE, Boyd J, Lubin MB, Deshano ML, Brody LC et al. (1994) Mutations in the *BRCA1* gene in families with early-onset breast and ovarian cancer. *Nat Genet* 8:387–391.
- Cherbal F, Bakour R, Adane S, Boualga K, Benais-Pont G and Maillet P (2010) *BRCA1* and *BRCA2* germline mutations screening in Algerian breast/ovarian cancer families. *Dis Markers* 28:377–384.
- Csokay B, Tihomirova L, Stengrevics A, Sinicka O and Olah E (1999) Strong founder effects in BRCA1 mutation carrier breast cancer patients from Latvia. *Online. Hum Mutat* 14:92-92.
- de Juan I, Palanca S, Domenech A, Feliubadaló L, Segura Á, Osorio A, Chirivella I, de la Hoya M, Sánchez AB, Infante M et al. (2015) *BRCA1* and *BRCA2* mutations in males with familial breast and ovarian cancer syndrome. Results of a Spanish multicenter study. *Fam Cancer* 14:505–513.
- de Leeneer K, de Schrijver J, Clement L, Baetens M, Lefever S, de Keulenaer S, van Criekinge W, Deforce D, van Nieuwerburgh F, Bekaert S et al. (2011) Practical tools to implement massive parallel pyrosequencing of PCR products in next generation molecular diagnostics. *PLoS One* 6:1–7.
- den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE and Taschner PEM (2016) HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat* 37:564–569.
- Deng H, Chen M, Guo X, Heng J, Xu X, Peng L, Jiang H, Li G, Day JX, Li J et al. (2019) Comprehensive analysis of serum tumor markers and BRCA1/2 germline mutations in Chinese ovarian cancer patients. *Mol Genet Genomic Med* 7:6.
- Dullens B, de Putter R, Lambertini M, Toss A, Han S, Van Nieuwenhuysen E, Van Gorp T, Vanderstichele A, Van Ongeval C, Keupers M et al. (2020) Cancer Surveillance in Healthy Carriers of Germline Pathogenic Variants in *BRCA1/2*: A Review of Secondary Prevention Guidelines. *J Oncol* 2020:1–13.
- Elsakov P, Kurtinaitis J, Petraitis S, Ostapenko V, Razumas M, Razumas T, Meskauskas R, Petrulis K, Luksite A, Lubiński J et al. (2010) The contribution of founder mutations in *BRCA1* to breast and ovarian cancer in Lithuania. *Clin Genet* 78:373–376.
- Esposito MV, Minopoli G, Esposito L, D’Argenio V, Di Maggio F, Sasso E, D’Aiuto M, Zambrano N and Salvatore F (2019) A Functional Analysis of the Unclassified Pro2767Ser *BRCA2* Variant Reveals Its Potential Pathogenicity that Acts by Hampering DNA Binding and Homology-Mediated DNA Repair. *Cancers (Basel)* 11:1454-1459.
- Ewald IP, Cossio SL, Palmero EI, Pinheiro M, Nascimento IL de O, Machado TMB, Sandes KA, Toralles B, Garicochea B, Izetti P et al. (2016) *BRCA1* and *BRCA2* rearrangements in Brazilian individuals with hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *Genet Mol Biol* 39:223–231.

- Fernandes GC, Michelli RAD, Galvão HCR, André E, Pereira R, Andrade CE, Felicio PS, Souza CP, Mendes RP, Volc S et al. (2016) Prevalence of *BRCA1/BRCA2* mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry 49:80465-80481.
- Foo TK, Tischkowitz M, Simhadri S, Boshari T, Zayed N, Burke KA, Berman SH, Bleuca P, Riaz N, Huo Y et al. (2017) Compromised *BRCA1–PALB2* interaction is associated with breast cancer risk. *Oncogene* 36:4161–4170.
- Foretova L, Machackova E, Navratilova M, Pavlu H, Hrubá M, Lukesova M and Valik D (2004) *BRCA1* and *BRCA2* mutations in women with familial or early-onset breast/ovarian cancer in the Czech Republic. *Hum Mutat* 23:397–398.
- Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE and King M-C (1994) Confirmation of *BRCA1* by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet* 8:399–404.
- Gabaldó Barrios X, Sarabia Meseguer MD, Marín Vera M, Sánchez Bermúdez AI, Macías Cerrolaza JA, Sánchez Henarejos P, Zafra Poves M, García Hernández MR, Cuevas Tortosa E, Aliaga Baño Á et al. (2017) Molecular characterization and clinical interpretation of *BRCA1/BRCA2* variants in families from Murcia (south-eastern Spain) with hereditary breast and ovarian cancer: clinical–pathological features in BRCA carriers and non-carriers. *Fam Cancer* 16:477–489.
- Gomes R, Spinola P da S, Brant AC, Matta BP, Nascimento CM, de Aquino Paes SM, Bonvicino CR, dos Santos ACE and Moreira MAM (2021) Prevalence of germline variants in consensus moderate-to-high-risk predisposition genes to hereditary breast and ovarian cancer in *BRCA1/2*-negative Brazilian patients. *Breast Cancer Res Treat* 185:851–861.
- Górski B (2006) Selected aspects of molecular diagnostics of constitutional alterations in *BRCA1* and *BRCA2* genes associated with increased risk of breast cancer in the Polish population. *Hered Cancer Clin Pract* 4:142–152.
- Grzybowska E, Zientek H, Jasinska A, Rusin M, Kozłowski P, Sobczak K, Sikorska A, Kwiatkowska E, Gorniak L, Kalinowska E et al. (2000) High frequency of recurrent mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes in Polish families with breast and ovarian cancer. *Hum Mutat* 16:482–490.
- Håkansson S, Johannsson O, Johannsson U, Sellberg G, Loman N, Gerdes a M, Holmberg E, Dahl N, Pandis N, Kristoffersson U et al. (1997) Moderate frequency of *BRCA1* and *BRCA2* germ-line mutations in Scandinavian familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 60:1068–1078.
- Humphrey JS, Salim A, Erdos MR, Collins FS, Brody LC and Klausner RD (1997) Human *BRCA1* inhibits growth in yeast: potential use in diagnostic testing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5820–5825.
- Jakimovska M, Kostovska IM, Popovska-Jankovic K, Kubelka-Sabit K, Karadjozov M, Stojanovska L, Arsovski A, Smichkoska S, Lazarova E, Dimitrovska MJ et al. (2018) *BRCA1* and *BRCA2* germline variants in breast cancer patients from the Republic of Macedonia. *Breast Cancer Res Treat* 168:745–753.
- Jara L, Ampuero S, Santibáñez E, Seccia L, Rodríguez J, Bustamante M, Layson G, Ojeda JM, Reyes JM and Blanco R (2004) Molecular analysis of the eighteen most frequent cancer families. 1:469–481.
- Johannsson O, Ostermeyer EA, Håkansson S, Friedman LS, Johannsson U, Sellberg G, Brøndum-Nielsen K, Sele V, Olsson H, King MC et al. (1996) Founding *BRCA1* mutations in hereditary breast and ovarian cancer in Southern Sweden. *Am J Hum Genet* 58:441–450.
- Kluz T, Jasiewicz A, Marczyk E, Jach R, Jakubowska A, Lubiński J, Narod SA and

- Gronwald J (2018) Frequency of *BRCA1* and *BRCA2* causative founder variants in ovarian cancer patients in South-East Poland. *Hered Cancer Clin Pract* 16:6–9.
- Kote-Jarai Z, Leongamornlert D, Saunders E, Tymrakiewicz M, Castro E, Mahmud N, Guy M, Edwards S, O'Brien L, Sawyer E et al. (2011) *BRCA2* is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: Implications for genetic testing in prostate cancer patients. *Br J Cancer* 105:1230–1234.
- Kowalik A, Siołek M, Kopczy J, Krawiec K, Kalisz J, Zi S, Kozak-klonowska B, Furma J, Nowak-ozimek E, Chłopek M et al. (2018) *BRCA1* founder mutations and beyond in the Polish population : A single-institution *BRCA1/2* next-generation sequencing study 13:1–14.
- Kwong A, Chen JW and Shin VY (2016) A new paradigm of genetic testing for hereditary breast/ovarian cancers. *Hong Kong Med J* 22:171–177.
- Lener MR, Kashyap A, Kluźniak W, Cybulski C, Soluch A, Pietrzak S, Huzarski T, Gronwald J and Lubiński J (2017) The prevalence of founder mutations among individuals from families with familial pancreatic cancer syndrome. *Cancer Res Treat* 49:430–436.
- Li X, Liang C, Yang Y, Liu L, Du Y, Liang H, Li L, Zhang B, Li J and Zhao J (2018) No association between HMGB1 polymorphisms and cancer risk : evidence from a meta-analysis. 5:1–11.
- Machackova E, Foretova L, Lukesova M, Vasickova P, Navratilova M, Coene I, Pavlu H, Kosinova V, Kuklova J and Claes K (2008) Spectrum and characterisation of *BRCA1* and *BRCA2* deleterious mutations in high-risk Czech patients with breast and/or ovarian cancer. *BMC Cancer* 8:1–11.
- Marchina E, Fontana MG, Speziani M, Salvi A, Ricca G, Di Lorenzo D, Gervasi M, Caimi L and Barlati S (2010) *BRCA1* and *BRCA2* genetic test in high risk patients and families: counselling and management. *Oncol Rep* 24:1661–7.
- McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GRS, Thormann A, Flicek P and Cunningham F (2016) The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol* 17:1–14.
- Meisel C, Sadowski CE, Kohlstedt D, Keller K, Stäritz F, Grübling N, Becker K, Mackenroth L, Rump A, Schröck E et al. (2017) Spectrum of genetic variants of *BRCA1* and *BRCA2* in a German single center study. *Arch Gynecol Obstet* 295:1227–1238.
- Merajver SD, Pham TM, Caduff RF, Chen M, Poy EL, Cooney K a, Weber BL, Collins FS, Johnston C and Frank TS (1995) Somatic mutations in the *BRCA1* gene in sporadic ovarian tumours. *Nat Genet* 9:439–443.
- Meyer P, Voigtlaender T, Bartram CR and Klaes R (2003) Twenty-three novel *BRCA1* and *BRCA2* sequence alterations in breast and/or ovarian cancer families in Southern Germany. *Hum Mutat* 22:259-259.
- Meyer R, Kopanos C, Albarca Aguilera M, Tsiolkas V, Massouras A, Kouris A and Chapple CE (201) VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* 35:1978-1980.
- Momozawa Y, Iwasaki Y, Parsons MT, Kamatani Y, Takahashi A, Tamura C, Katagiri T, Yoshida T, Nakamura S, Sugano K et al. (2018) Germline pathogenic variants of 11 breast cancer genes in 7,051 Japanese patients and 11,241 controls. *Nat Commun* 9:4–6.
- Nakamura S, Takahashi M, Tozaki M, Nakayama T, Nomizu T, Miki Y, Murakami Y, Aoki D, Iwase T, Nishimura S et al. (2015) Prevalence and differentiation of hereditary breast and ovarian cancers in Japan. *Breast Cancer* 22:462–468.
- Negura L, Uhrhammer N, Negura A, Artenie V, Carasevici E and Bignon YJ (2010) Complete *BRCA* mutation screening in breast and ovarian cancer predisposition families from a North-Eastern Romanian population. *Fam Cancer* 9:519–523.
- Nielsen SM, Eccles DM, Romero IL, Al-Mulla F, Balmaña J, Biancolella M, Blok R, Caligo

- MA, Calvello M, Capone GL et al. (2018) Genetic Testing and Clinical Management Practices for Variants in Non- *BRCA1/2* Breast (and Breast/Ovarian) Cancer Susceptibility Genes: An International Survey by the Evidence-Based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles (ENIGMA) Clinical Work group. *JCO Precision Oncology* 2:1–42.
- Nv B, Nn A, Yi R and Jh K (2010) High frequency and allele-specific differences of *BRCA1* founder mutations in breast cancer and ovarian cancer patients from Belarus 4:364–372.
- Park JS, Nam EJ, Park HS, Han JW, Lee JY, Kim J, Kim T II and Lee ST (2017) Identification of a novel *BRCA1* pathogenic mutation in Korean patients following reclassification of *BRCA1* and *BRCA2* variants according to the ACMG standards and guidelines using relevant ethnic controls. *Cancer Res Treat* 49:1012–1021.
- Patel VL, Busch EL, Friebel TM, Cronin A, Leslie G, McGuffog L, Adlard J, Agata S, Agnarsson BA, Ahmed M et al. (2020) Association of genomic domains in *BRCA1* and *BRCA2* with prostate cancer risk and aggressiveness. *Cancer Res* 80:624–638.
- Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, Zhao W, Yilmaz A, Miller K, Bacher J, Bigley C, Nelsen L, Goodfellow PJ et al. (2017) Prevalence and spectrum of germline cancer susceptibility gene mutations among patients with early-onset colorectal cancer. *JAMA Oncol* 3:464–471.
- Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy F de SG, Kohlrausch F, Magno LAV, Montenegro RC, Moraes MO et al. (2011) The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. *PLoS One* 6:e17063.
- Perkowska M, BroZek I, Wysocka B, Haraldsson K, Sandberg T, Johansson U, Sellberg G, Borg A and Limon J (2003) *BRCA1* and *BRCA2* mutation analysis in breast-ovarian cancer families from northeastern Poland. *Hum Mutat* 21:553–554.
- Pohlreich P, Zikan M, Stribrna J, Kleibl Z, Janatova M, Kotlas J, Zidovska J, Novotny J, Petruzalka L, Szabo C et al. (2005) High proportion of recurrent germline mutations in the *BRCA1* gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. *Breast Cancer Res* 7:R728-736.
- Pukkala E, Kesminiene A, Poliakov S, Ryzhov A, Drozdovitch V, Kovgan L, Kyyrönen P, Malakhova I V., Gulak L and Cardis E (2006) Breast cancer in Belarus and Ukraine after the Chernobyl accident. *Int J Cancer* 119:651–658.
- Reese MG, Eeckman FH, Kulp D and Haussler D (1997) Improved Splice. *J Comput Biol* 4:311–323.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E et al. (2015) 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* 17:405–423.
- Rizzarda AD (2018) Um olhar valioso sobre a terra: Sudoeste do Paraná. *Ágora* 20:1930-1940.
- Roy R, Chun J and Powell SN (2012) *BRCA1* and *BRCA2*: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* 12:68–78.
- Rummel S, Varner E, Shriver CD and Ellsworth RE (2013) Evaluation of *BRCA1* mutations in an unselected patient population with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 137:119–125.
- Serova-Sinilnikova OM, Boutrand L, Stoppa-Lyonnet D, Bressac-de-Paillerets B, Dubois V, Lasset C, Janin N, Bignon YJ, Longy M, Maugard C et al. (1997) *BRCA2* mutations in hereditary breast and ovarian cancer in France. *Am J Hum Genet* 60:1236–9.
- Serova O, Montagna M, Torchard D, Narod SA, Tonin P, Sylla B, Lynch HT, Feunteun J

- and Lenoir GM (1996) A high incidence of BRCA1 mutations in 20 breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 58:42–51.
- Serova OM, Mazoyer S, Puget N, Dubois V, Tonin P, Shugart YY, Goldgar D, Narod SA, Lynch HT and Lenoir GM (1997) Mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast cancer families: Are there more breast cancer-susceptibility genes? *Am J Hum Genet* 60:486–495.
- Steinmann D, Bremer M, Rades D, Skawran B, Siebrands C, Karstens JH and Dörk T (2001) Mutations of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in patients with bilateral breast cancer. *Br J Cancer* 85:850–858.
- Strom CM, Rivera S, Elzinga C, Angeloni T, Rosenthal SH, Goos-Root D, Siaw M, Platt J, Braastadt C, Cheng L et al. (2015) Development and validation of a next-generation sequencing assay for *BRCA1* and *BRCA2* variants for the clinical laboratory. *PLoS One* 10:1–16.
- Szwiec M, Jakubowska A, Górski B, Huzarski T, Tomiczek-Szwiec J, Gronwald J, Debniak T, Byrski T, Kluźniak W, Wokołorczyk D et al. (2015) Recurrent mutations of *BRCA1* and *BRCA2* in Poland: An update. *Clin Genet* 87:288–292.
- Tedaldi G, Tebaldi M, Zampiga V, Danesi R, Arcangeli V, Ravegnani M, Cangini I, Pirini F, Petracci E, Rocca A et al. (2017) Multiple-gene panel analysis in a case series of 255 women with hereditary breast and ovarian cancer. *Oncotarget* 8:47064–47075.
- Trujillano D, Weiss MER, Schneider J, Köster J, Papachristos EB, Saviouk V, Zakharkina T, Nahavandi N, Kovacevic L and Rolfs A (2015) Next-generation sequencing of the *BRCA1* and *BRCA2* genes for the genetic diagnostics of hereditary breast and/or ovarian cancer. *J Mol Diagnostics* 17:162–170.
- Uglañitsa N, Oszurek O, Uglañitsa K and Savonievich E (2010) The contribution of founder mutations in *BRCA1* to breast cancer in Belarus. 377–380.
- Wagner TMU, Möslinger RA, Muhr D, Langbauer G, Hirtenlehner K, Concin H, Doeller W, Haid A, Lang AH, Mayer P et al. (1998) *BRCA1*-related breast cancer in Austrian breast and ovarian cancer families: Specific *BRCA1* mutations and pathological characteristics. *Int J Cancer* 77:354–360.
- Wen WX, Allen J, Lai KN, Mariapun S, Hasan SN, Ng PS, Lee DSC, Lee SY, Yoon SY, Lim J et al. (2018) Inherited mutations in *BRCA1* and *BRCA2* in an unselected multiethnic cohort of Asian patients with breast cancer and healthy controls from Malaysia. *J Med Genet* 55:97–103.
- Wojcik P, Jasiowka M, Strycharz E, Sobol M, Hodorowicz-Zaniewska D, Skotnicki P, Byrski T, Blecharz P, Marczyk E, Cedrych I et al. (2016) Recurrent mutations of *BRCA1*, *BRCA2* and *PALB2* in the population of breast and ovarian cancer patients in Southern Poland. *Hered Cancer Clin Pract* 1:5-10.
- Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MCW, Hwang LY, Bowcock AM and Baer R (1996) Identification of a RING protein that can interact in vivo with the *BRCA1* gene product. *Nat Genet* 14:430–440.
- Yeo G and Burge CB (2004) Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* 11:377–394.
- Yoshida R (2020) Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis. *Breast Cancer* 28:1167-1180.
- Zavala VA, Serrano-Gomez SJ, Dutil J and Fejerman L (2019) Genetic epidemiology of breast cancer in Latin America. *Genes (Basel)* 10:153-159.
- Zhang S, Royer R, Li S, McLaughlin JR, Rosen B, Risch HA, Fan I, Bradley L, Shaw PA and Narod SA (2011) Frequencies of *BRCA1* and *BRCA2* mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 121:353–357.

5. Capítulo 2. Prevalence of germline variants in consensus moderate-to-high-risk predisposition genes to hereditary breast and ovarian cancer in *BRCA1/2*-negative Brazilian patients.

Breast Cancer Research and Treatment (2021) 185:851–861
<https://doi.org/10.1007/s10549-020-05985-9>

EPIDEMIOLOGY



Prevalence of germline variants in consensus moderate-to-high-risk predisposition genes to hereditary breast and ovarian cancer in *BRCA1/2*-negative Brazilian patients

Renan Gomes¹ · Pricila da Silva Spinola² · Ayslan Castro Brant¹ · Bruna Palma Matta¹ · Caroline Macedo Nascimento² · Sílvia Maria de Aquino Paes^{1,3} · Cibele Rodrigues Bonvicino¹ · Anna Claudia Evangelista dos Santos¹ · Miguel Angelo Martins Moreira¹

Received: 13 August 2020 / Accepted: 15 October 2020 / Published online: 30 October 2020
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2020

Abstract

Purpose This study aimed to identify and classify genetic variants in consensus moderate-to-high-risk predisposition genes associated with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome (HBOC), in *BRCA1/2*-negative patients from Brazil.

Methods The study comprised 126 index patients who met NCCN clinical criteria and tested negative for all coding exons and intronic flanking regions of *BRCA1/2* genes. Multiplex PCR-based assays were designed to cover the complete coding regions and flanking splicing sites of six genes implicated in HBOC. Sequencing was performed on HiSeq2500 Genome Analyzer.

Results Overall, we identified 488 unique variants. We identified five patients (3.97%) that harbored pathogenic or likely pathogenic variants in four genes: *ATM* (1), *CHEK2* (2), *PALB2* (1), and *TP53* (1). One hundred and thirty variants were classified as variants of uncertain significance (VUS), 10 of which were predicted to disrupt mRNA splicing (seven non-coding variants and three coding variants), while other six missense VUS were classified as probably damaging by prediction algorithms.

Conclusion A detailed mutational profile of non-*BRCA* genes is still being described in Brazil. In this study, we contributed to filling this gap, by providing important data on the diversity of genetic variants in a Brazilian high-risk patient cohort. *ATM*, *CHEK2*, *PALB2* and *TP53* are well established as HBOC predisposition genes, and the identification of deleterious variants in such actionable genes contributes to clinical management of probands and relatives.

Keywords Hereditary cancer · HBOC · Massive parallel sequencing · Breast cancer · Ovarian cancer

Renan Gomes and Pricila da Silva Spinola: These authors contributed equally.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s10549-020-05985-9>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Miguel Angelo Martins Moreira
miguelm@inca.gov.br

¹ Genetics Program, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

² Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

³ Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

Introduction

Carriers of deleterious variants in the tumor suppressor genes *BRCA1* or *BRCA2* have an increased cumulative risk of developing breast cancer (BC) and ovarian cancer (OC) that may reach up to 66% and 41% at age 70, respectively [1]. The identification of pathogenic variants in *BRCA1/2* leads to specific clinical management of families with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome (HBOC), through personalized prevention and therapeutic strategies [2]. While the identification of pathogenic variants in *BRCA1* or *BRCA2* represents a clear benefit to patients and their relatives, it only accounts for 15–20% of the families at-risk for HBOC [2, 3]. In the past years, systematic investigation of genetic contributions to hereditary BC and OC cancer uncovered additional susceptibility genes.

Massive parallel sequencing coupled with multigene testing have allowed the simultaneous screening of risk associated HBOC genes, which can be especially informative to HBOC families that are negative for pathogenic variants in *BRCA1/2*. Up to now, about 20 genes were linked to HBOC, and studies have been using multigene panel to increase detection rate of pathogenic or likely pathogenic variants, aiming to improving the effectiveness in the identification of HBOC families. Recent reports have shown that around 12% of *BRCA1/2*-negative HBOC patients harbor a pathogenic variant in one of the known moderate-to-high-risk predisposition genes [3–6]. Although a multigene testing seems to be the best strategy, few genes included in multigene panels have the association with BC/OC risk well established and, consequently, there is a lack of conclusive evidences to support clinical decision making [7].

Over time, multiple large-scale cohorts provided robust evidences for genes like *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, and *TP53* in their roles as BC and OC predisposition genes [5, 8–18]. For carriers of pathogenic variants in *PALB2* and *TP53* genes, the cumulative risk for BC in women is 53% and 85%, respectively, which overlaps with the range of cumulative risk for *BRCA1/2* carriers [19–21]. In turn, for *ATM* and *CHEK2* carriers of pathogenic variants, the cumulative risk for BC in women is 25–30% [3, 22]. These findings have allowed the development of guidelines on how to better manage patient's lifetime risks, through adoption of specific strategies of prevention and/or therapy [11, 23, 24].

Moreover, the understanding of genetic factors driving HBOC is biased towards populations of European descent. Despite having a genetic contribution of Europeans, the Brazilian population has multiple ethnic contributions to its genetic background [25, 26]. Therefore, identification of population-specific mutational spectrum in such admixed population is critical, since the frequency of common and specific genetic variants may differ from populations with major European background [6, 27]. For instance, the presence of the Brazilian founder mutation *TP53* c.1010G>A (p.Arg337His) is well described and has a frequency of 0.3% in Southern Brazilian population [28]. However, a detailed mutational profile of non-*BRCA* genes is still being described in Brazil. In this study, we contribute to filling this gap, through the identification and classification of variants in moderate-to-high-risk predisposition genes (*ATM*, *CDH1*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51D*, and *TP53*) associated with HBOC in *BRCA1/2*-negative familial breast and ovarian cancer patients from Brazil.

Material and methods

Patients

The study comprised 126 patients from the Brazilian National Cancer Institute (INCA), diagnosed with breast

and/or ovarian cancer and referred to Genetic Counseling Program for germline testing of susceptibility genes, from January 2015 to January 2019. Patients fulfilled at least one criterion of the National Comprehensive Cancer Network guidelines (Version 1.2016) for HBOC germline genetic testing and were tested as negative for pathogenic variants in *BRCA1* and *BRCA2*, through Sanger sequencing of all coding exons and intron flanking regions. All patients were also negative for the Portuguese variant *BRCA2* c.156_157insAlu, and 18/126 (14.28%) of included patients were previously tested using multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) and did not present large rearrangements in *BRCA1* or *BRCA2*. Patients' data (personal history of cancer, tumor histology, receptor status, and age at diagnosis) were obtained from clinical records (Table 1), while the family history of cancer was obtained from interviews with the probands. All individuals who participate in this study provided written informed consent. This study was approved by the ethical committee of the Brazilian National Cancer Institute (INCA, project #114/07 and C.A.A.E. 14,144,819.0.0000.5274).

Sample preparation

Genomic DNA was isolated from peripheral blood samples using salting out method [29]. At the time of study design, the *ATM*, *CDH1*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51D*, and *TP53* genes were selected by taking into account the worldwide prevalence of pathogenic variants in HBOC patients and by following the National Cancer Comprehensive Network recommendations [3, 11, 30–33]. Multiplex PCR-based assays were designed to cover the complete coding regions and flanking splicing sites of the genes, based on NCBI reference sequences NG_009830.1 for *ATM*, NG_008021.1 for *CDH1*, NG_008150.2 for *CHEK2*, NG_007406.1 for *PALB2*, NG_031858.1 for *RAD51D*, and NG_017013.2 for *TP53*. Multiplex PCR products were purified using PureLink PCR purification kit (ThermoFisher) and quantified using Qubit fluorimeter (Life Technologies). Purified products were pooled using a rough normalization of base pair counts per multiplex PCR (all primer pairs, multiplex PCR conditions, and pooling ratios are available under request). Sequencing libraries were prepared using Nextera XT DNA kit (Illumina).

Massive parallel sequencing, variant detection, and annotation

Sequencing was performed in two independent runs, using paired-end methodology on HiSeq2500 Genome Analyzer (Illumina), with up to 150 bp of read length. Libraries were allocated in the first or second run following the sequence of

Table 1 Clinical and pathological features of the patients with breast and/or ovarian cancer

	Number	%
Index patients		
BC	115	91.27
OC	5	3.97
BC and OC	2	1.59
BC and other	4	3.17
Age at first diagnosis, years		
Mean (SD)	43.5	–
Median	43	–
≤ 45	71	56.35
46–60	39	30.95
> 60	12	9.53
Not provided	4	3.17
Sex		
Female	120	95.24
Male	6	4.76
Bilateral cancer (BC or OC)		
Yes	16	12.70
No	106	84.13
Not provided	4	3.17
Histology (BC only)		
IDC	107	88.43
ILC	5	4.13
Other	5	4.13
Not provided	4	3.31
Grade (BC only)		
I	11	9.10
II	50	41.32
III	37	30.58
Not specified	2	1.65
Not provided	21	17.35
BC subtypes, receptor status		
ER+, PR+, HER2–	44	36.37
ER–, PR–, HER2+	9	7.44
Triple positive	6	4.96
Triple negative	16	13.22
Not provided (any)	46	38.01
First-/second-degree relative with BC/OC		
Yes	86	68.25
No	31	24.60
Not provided	9	7.15
First-/second-degree relative with any cancer*		
Yes	100	79.36
No	17	13.49
Not provided	9	7.15

BC Breast cancer, OC ovarian cancer, IDC invasive ductal carcinoma, ILC invasive lobular carcinoma, ER estrogen receptor, PR progesterone receptor, HER2 human epidermal growth factor receptor type 2

*Lung cancer and cervix cancer were not included

patient enrollment and the compatibility between the indexes used for massive parallel sequencing. For FASTA filtering of the base call quality scores (Q score), reads were discarded when the median was below 30 phreds. Reads were then aligned against human reference sequences (GRCh37). Sequencing alignment was performed using the Burrows-Wheeler Alignment (BWA) with default parameters. Base quality score recalibration, indel realignment, and variant calling were performed using a pipeline based on the Genome Analysis Toolkit v4.1 (GATK) (Broad Institute). Populational frequency of each variant was retrieved from the Genome Aggregation Database (gnomAD v2.1.1) (<https://gnomad.broadinstitute.org/>). Variants were reported only if coverage depth was > 26 × and if the variant allele was present in > 20% of the reads, based on the theoretical model proposed by de Leeneer et al. [34]. Sequence variants were annotated using Variant Effect Prediction [35]. The efficiency and accuracy of our multiplex PCR-based assays and pipeline analysis were previously characterized (data available under request).

Nomenclature, in silico analysis, and variant classification

The Human Genome Variation Society (HGVS) guidelines were used to describe the genetic variants [36]. Variant classification was performed in accordance with the Guidelines of American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Association for Molecular Pathology (AMP) [37], hereafter abbreviated as ACMG guidelines, through the use of VarSome variant search engine version 8.4.6 [38] and ClinVar database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Protein-truncating variants (PTVs) were defined as nonsense or frameshift. The Human Splicing Finder (HSF) and MaxEntScan (MES) algorithms [39] were used with default threshold parameters to predict variant-induced splicing alteration for all variants. Variants were considered to be “potentially spliceogenic” if $\Delta\text{MES} \geq +30\%$ or $\leq -30\%$ and $\Delta\text{HSF} \geq +10\%$ or $\leq -10\%$, adding the PP3 criterion (i.e., multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product: conservation, evolutionary, splicing impact, etc.) of ACMG guidelines to the final classification of pathogenicity in case of synonymous or intronic variants, or adding to the number of in silico tools with deleterious/benign prediction in case of missense variants. We did not take into account the PP2 criterion (i.e., missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and in which missense variants are a common mechanism of disease) as automated by VarSome, since there was a higher proportion of missense VUS in comparison to known benign and pathogenic/likely pathogenic missense variants, for all tested genes. We also did not take into account VarSome

automated threshold for BS2 criterion (i.e., observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder, with full penetrance expected at an early age), since it is a fixed value that does not consider sample size of population databases (i.e., allele count greater than 5 and 3, for dominant genes and for recessive or X-linked genes, respectively, as described in VarSome version 8.4.6 documentation). Instead, we evaluated the suitability of BS2 criterion case by case. Missense variants classified as VUS and with minor allele frequency (MAF) < 0.01 at gnomAD (rare variants) were submitted to other five in silico prediction tools to estimate their potential pathogenicity: (a) mendelian clinically applicable pathogenicity (M-CAP); (b) SIFT (sorting intolerant from tolerant); (c) PolyPhen-2 (polymorphism phenotyping v2); (d) MutationTaster; and (e) Align-GVGD (values of C45 or higher were considered as deleterious). Missense variants were defined as “potentially damaging” when predicted deleterious by > 3 tools or as “potentially benign” when predicted benign by > 3 tools (including HSF and MES), so that PP3 (i.e., multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product: conservation, evolutionary, splicing impact, etc.) or BP4 (i.e., multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product: conservation, evolutionary, splicing impact, etc.) criteria of ACMG guidelines were respectively added to their final classification of pathogenicity. All variants finally classified as pathogenic or likely pathogenic, according to the ACMG guidelines, were confirmed by Sanger sequencing.

Results

Among 126 patients with breast and/or ovarian cancer, 56.35% had their primary cancer diagnosis at age 45 years or younger (Table 1). The median age at diagnosis was 43 years (range = 23–73 years). Eighty-six patients (68.25%) had at least one first-degree relative affected with breast or ovarian cancer. Most of tested individuals were female, comprising 95.24% of the total. Of the 121 breast tumors, the majority was invasive ductal carcinomas (88.43%) and 87/121 (71.9%) were high stages, grade II or III. HER2, estrogen and progesterone receptor status was available for a subgroup of 75/121 (61.98%) of BC patients, of which 16/75 (21.33%) had triple-negative breast cancer (TNBC). Detailed information on patients is given in Table 1.

Mean coverage depth for the first run, comprising 64 samples, was 4411-fold, and more than 90.5% of the targeted bases (all exonic bases and at least 6 bp of intronic sequences at intron/exon junctions) were covered > 26-fold. Mean coverage depth for the second run, comprising 62 samples, was

1174-fold, and more than 74.1% of the targeted bases were covered > 26-fold.

Overall, we identified 488 unique variants (Supplementary Fig. 1): 51 missense, 28 synonymous, 1 frameshift, 1 stop codon, and 407 non-coding variants. After classification of the clinical significance of each variant, following ACMG criteria, we identified five patients (3.97%) that harbor pathogenic or likely pathogenic variants, all confirmed by Sanger sequencing (Table 2). Of the remaining variants, 353 were benign or likely benign and 130 were VUS (Supplementary Table 2). None of the patients harbored concomitantly a pathogenic/likely pathogenic variant and a VUS predicted to be deleterious.

Among pathogenic or likely pathogenic variants identified in this cohort, three were detected in *ATM* or *CHEK2*, which are cancer susceptibility genes with moderate-to-low penetrance: *ATM* c.6099dup (p.Arg2034ThrfsTer4), *CHEK2* c.1036C > T (p.Arg346Cys), and *CHEK2* c.1270 T > C (p.Tyr424His). Other two pathogenic variants were detected in high-penetrance cancer susceptibility genes: *PALB2* c.2257C > T (p.Arg753Ter) and *TP53* c.534C > A (p.His178Gln). All carriers of such variants were female patients. The respective personal, familial cancer history and complete in silico predictions are detailed in Table 2.

Overall, 130 variants were classified as VUS (Supplementary Table 2), 129 were rare variants (MAF < 1% or not reported in gnomAD database), of which 45/129 (34.88%) were described for the first time in this paper. Most of the VUS (113/130; 86.92%) are non-coding variants localized in intronic or untranslated regions, while only 17/130 of them (13.07%) are synonymous or missense coding variants. Ten VUS were predicted to disrupt mRNA splicing by the two prediction algorithms: seven are non-coding variants (Supplementary Table 1), and three are coding variants (two synonymous and one missense VUS: *ATM* c.6975G > A p.Ala2325Ala; *PALB2* c.3495G > A p.Ser1165Ser; *ATM* c.7375C > G p.Arg2459Gly) and are shown in Table 2. Among the missense VUS (11/130; 8.46%), six were classified as probably damaging by the majority of prediction algorithms (Table 2), and one of those VUS (*ATM* c.7375C > G, p.Arg2459Gly) was also predicted to disrupt mRNA splicing.

The schematic representation of thirteen pathogenic (P), likely pathogenic (LP), and VUS classified as probably damaging as well as the tumoral receptors statuses (progesterone, estrogen, and HER2) are shown in Supplementary Fig. 2.

Discussion

This study aimed to identify genetic variants in Brazilian patients at risk for hereditary breast and ovarian cancer and negative for the presence of pathogenic variants in *BRCA1*

Table 2 Overall characteristics of pathogenic or likely pathogenic variants, and rare coding VUS (missense or synonymous) predicted as deleterious, and the personal and family history of probands

Gene	#	dbSNP ID	HGVS nomenclature	ACMG criteria	Predictive algorithm ^a	Classification		Receptor status			Cancer history ^b (age at diagnosis)		
						ACMG	ClinVar	gnomAD	ER	PR	HER2	Personal	Familial
ATM	1	na	c.6099dup p.Arg2034Thr&Ter4	PVS1, PM1, PM2, PP3	5/7	P	na	na	+	+	-	UBC (na)	na
	1	rs67060474	c.6820G>A p.Ala2274Thr	PM1, PM2, PP3	5/7	VUS	Conflicting	9.21e-05	na	na	na	BC (47)	First degree: BC (82), Lymphatic cancer (74), BC (na), skin cancer (68), PCa (50) Second degree: BC (>60), BC (>60), BC (<50)
	1	rs556778314	c.6975G>A p.Ala2325Ala	PM2, PP3	2/2	VUS	Conflicting	1.99e-05	na	na	na	UBC (47)	First degree: BC (51), Stomach cancer (<50) Third degree: BC (48), OC (na)
CHEK2	1	rs730881383	c.7375C>G p.Arg2459Gly	PM1, PM2, PP3	7/7	VUS	VUS	3.54e-05	+	+	-	UBC (36)	na
	1	na	c.8170C>A p.Gln2724Lys	PM1, PM2, PP3	5/7	VUS	na	na	+	+	-	UBC (88)	First degree: BC (na), BC (na)
CHEK2	1	rs746351320	c.8800A>G p.Thr2934Ala	PM1, PM2, PP3	6/7	VUS	VUS	7.96e-06	-	-	-	BBC (47)	First degree: BC (35), BC (45)
	1	rs201206424	c.1016C>T p.Arg346Cys	PS1, PM1, PM2, PP3	5/7	LP	VUS	5.18e-05	+	+	na	BBC (39)	First degree: Liver cancer (na) Third degree: BC (>50), Esophagus cancer (na), BC (72), CRC (57), CRC (60)
	1	rs439366548	c.1270 T>C p.Tyr424His	PS1, PM1, PM2, PP3	6/7	LP	Conflicting	2.63e-04	+	+	-	UBC (38)	Third degree: BC (50), BC (68), bladder cancer (59)

Table 2 (continued)

Gene	#	dbSNP ID	HGVS nomenclature	ACMG criteria	Predictive algorithm ^a Classification		Receptor status		Cancer history ^b (age at diagnosis)		
					ACMG	ClinVar	gnomAD	ER	PR	HER2	Personal
PALB2	1	rs73483056	c.100C>T p.Arg34Cys	PML, PML2, PP3, BSS3 ^c	VUS	VUS	+	+	na	MBC (35)	No other cancer
	1	rs480177110	c.2257C>T p.Arg733Ter	PVS1, PML, PP3, PP5	P	P	+	+	-	UBC (53)	First degree: BC (48), BC (50) Second degree: BC (na) Third degree: BC (na), BC (na), BC (na) Fourth degree: BC (40), BBC (50) Fifth degree: BC (30) Sixth degree: Rectum cancer (na), Liver cancer (na), Stomach cancer (na)
TP53	1	rs455526001	c.534C>A p.His178Gln	PML, PP3, PML2, PML3, PP3	VUS	Conflicting	-	-	+	UBC (51)	First degree: BC (32), Mouth cancer (50) Second degree: Mouth cancer (na), CCR (na), Larynx cancer (na) Third degree: Mouth cancer (na) Fourth degree: BC (40), BBC (50) Fifth degree: BC (30) Sixth degree: Rectum cancer (na), Liver cancer (na), Stomach cancer (na)
	1	rs66984480	c.997C>T p.Arg333Cys	PML, PP3	VUS	VUS	+	-	na	UBC (32)	First degree: BC (48), gastric cancer (50)

gnomAD Allele frequency at gnomAD database, *P* pathogenic, *LP* likely pathogenic, *ER* estrogen receptor, *PR* progesterone receptor, *HER2* human epidermal growth factor receptor type 2, *na* not available, *BC* breast cancer, *UBC* unilateral breast cancer, *BBC* bilateral breast cancer, *PrCa* prostate cancer, *OC* ovarian cancer, *CCR* colorectal cancer

^a For synonymous variants, only the Human Splicing Finder (HSF) and MaxEntScan (MES) algorithms were used

^b Lung cancer and cervix cancer were not included

^c [49]

^d [42]

^e [50]

^f Number of probands

and *BRCA2* genes. We identified five patients harboring pathogenic or likely pathogenic variants in well-established HBOC genes, representing 3.97% of our cohort: A novel frameshift variant was identified in *ATM* (c.6099dup, p.Arg2034ThrfsTer4), one nonsense variant was observed in *PALB2* (c.2257C > T, p.Arg753Ter), and three missense variants were identified in *CHEK2* (c.1036C > T, p.Arg346Cys, and c.1270 T > C, p.Tyr424His) and *TP53* (c.534C > A, p.His178Gln) genes (Supplementary Fig. 1 and Table 2).

Regarding the pathogenic truncating variants found in this study, the *ATM* frameshift variant generates a premature stop codon causing loss of functional domains, which impairs ATM's ability to block cell cycle progression in response to DNA double strand breaks [40]. Similarly, the nonsense variant in *PALB2* (c.2257C > T, p.Arg753Ter) introduces a premature termination codon at position 753 and is predicted to generate a truncated or absent protein, since this mRNAs that carries a premature termination codons can potentially be degraded through the process of nonsense-mediated decay (NMD). Even if translated, this truncated protein would have no WD40 domain, losing a nuclear export signal (NES) responsible for the cytoplasmic transport of PALB2 [41, 42]. Moreover, truncating variants in *PALB2* (OR = 4.69, 95% CI 2.27 to 9.68) and *ATM* (OR = 3.26; 95% CI 1.82 to 6.46) were previously associated with increased BC risk [43]. The *PALB2* c.2257C > T (p.Arg753Ter) carrier presented a family history highly suggestive of hereditary cancer that included six BC cases over three generations, while the *ATM* c.6099dup carrier had no familial history of cancer available. Furthermore, association of deleterious variants in *ATM* and *PALB2* genes with positive status of ER/PR has already been described [15, 43–45], and ER/PR status of carriers mentioned above was consistent with these data (Table 2, Supplementary Fig. 2).

In respect to the likely pathogenic missense variants identified in this study (*CHEK2* c.1036C > T, p.Arg346Cys and *CHEK2* c.1270C > T, p.Tyr424His), both are located in the protein kinase domain of *CHEK2*. The *CHEK2* c.1036C > T (p.Arg346Cys) carrier fulfills HBOC criteria due to her personal history of bilateral early onset breast cancer, plus familial history with two BC cases in third-degree relatives. Moreover, her family history includes two third-degree relatives with colorectal cancer (CCR); therefore, this family also fulfills criteria to hereditary breast and colorectal cancer, as proposed by Meijers-Heijboer et al. [46] and Naseem et al. [47]. In agreement with predictive data (PP3), evidence of association between this variant and breast cancer risk was observed in carriers of European ancestry (OR = 5.06; 95% CI = 1.09 to 23.5) [48]. Besides, a recent yeast-based assay showed an effect of *CHEK2* c.1036C > T (p.Arg346Cys) variant

that is suggestive of pathogenicity [49]. In addition to this functional assay (PS3), this variant is located in a critical and well-established functional domain (PM1) and has low frequency in population database (PM2), strengthening the evidence in favor of its association with an increased risk of breast cancer. The *CHEK2* c.1270C > T (p.Tyr424His) carrier reported a personal cancer history characterized by unilateral breast cancer, grade 2, diagnosed at 38 years old and a third-degree family history comprising two breast cancer cases, diagnosed at 50 and 68 years old, and one bladder cancer diagnosed at 59 years old. *CHEK2* c.1207C > T (p.Tyr424His) variant is also located in a critical and well-established functional domain (PM1), has predictive data supportive of a deleterious effect (PP3), and has functional assay data (PS3) [49] arguing in favor of its pathogenicity.

The carrier of *TP53* c.534C > A (p.His178Gln), classified as pathogenic variant (Table 2), did not fulfill the classic Li-Fraumeni or Li-Fraumeni like criteria. Regarding HBOC criteria, besides her personal history of bilateral breast cancer, familial history includes one first-degree breast cancer case, diagnosed at 30 years old, and three second-degree cancer cases that include rectum cancer, liver cancer, and stomach cancer. This result demonstrates the value of multigene testing targeted at moderate-to-high-penetrance genes for HBOC, even when patients do not meet the criteria for the main syndrome associated with tested genes. Overall, this variant is located in p53 oligomerization domain, which is a critical and well-established functional domain (PM1), within a highly conserved codon where different missense substitutions have already been determined to be pathogenic (PM5), and has not been previously reported in population databases (PM2). In addition, this mutation was predicted to be damaging by four in silico tools (PP3), and this putative deleterious effect is supported by in vitro assays that showed reduced transcriptional activity (< 25%) in comparison to wild type *TP53* (PS3) [50]. Based on ACMG criteria mentioned above, the evidences are in favor of the pathogenicity of this variant.

ATM, *CHEK2*, *PALB2*, and *TP53* are well-established HBOC predisposition genes and are relevant to clinical management of affected families [5, 8, 10–16, 18, 51]. *PALB2* and *TP53* are considered as highly penetrant genes in hereditary BC cases, since mutations in these genes are associated with approximately fivefold and sevenfold elevated risk of breast cancer, respectively. In turn, *ATM* and *CHEK2* genes have moderate penetrance in hereditary BC cases, with deleterious variants associated with twofold to threefold increase in breast cancer risk [12, 15, 16, 45, 52]. Other than *BRCA1* and *BRCA2*, *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, and *TP53* are the most frequently mutated genes in HBOC families [5, 10, 12, 14, 15, 17, 18, 27, 53], including Brazilian families [54, 55].

To date, about 20 genes have been suggested to carry high and/or moderate BC risk variants, but only a minority of these genes has significant association to BC established by both stringent testing and statistical analyses [3, 9, 15, 32, 56]. The incorporation into multigene testing of several genes for which the evidence of risk-association is weak or absent can result in information that might not be clinically relevant to patients and their families. Therefore, the high rate of pathogenic variants identified in some studies might be inflated. *CDH1* and *RAD51D* genes were included in the present work based on data available at the time of study design. Some studies have shown a substantial prevalence of *CDH1* and *RAD51D* pathogenic or likely pathogenic variants in HBOC patients, but their contribution to HBOC is still controversial [4, 11, 12, 15, 53]. The more comprehensive results published to date on non-*BRCA* gene association with hereditary BC have established *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, and *TP53* as moderate-to-high penetrant genes, and also as the most frequently mutated non-*BRCA* genes in breast and ovarian cancer patients [5, 8–18]. Hence, by taking together latest results of these studies, there are robust data to support *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, and *TP53* as HBOC “consensus genes.”

Knowledge about the germline mutational spectrum among Brazilian HBOC patients that tested negative for pathogenic variants in *BRCA1* and *BRCA2* is limited. Only three studies have performed a comprehensive multigene test to date [54, 55, 57]. Timoteo et al. [55] reported a proportion of 3.44% pathogenic variants, considering “consensus genes” in 132 BC patients from Northeast of Brazil, who underwent clinical genetic testing, using 33 to 94-gene panels. In another study, a frequency of 2.32% of pathogenic variants was reported in 319 breast and/or ovarian cancer patients from Southeast Brazil, using a 94-gene panel [54]. Interestingly, in a recent study, Carvalho et al. [57] evaluated a 21-gene panel in a series of 95 HBOC families also from Southeast Brazil, and found a higher prevalence of non-*BRCA* mutation in comparison to the other studies (6.66%). In this case, however, the mutation *TP53* c.1010G > A (p.Arg337His), which is a well-known variant that occurs at a high frequency in cancer-prone families in Southern Brazil [28], accounted for 83.3% of the pathogenic variants. We observed a frequency of 3.97% pathogenic variants in 126 familial breast/ovarian cancer patients negative for *BRCA1/2*. This result indicates that a smaller set of consensus moderate-to-high-risk predisposition genes might be of value when testing HBOC families, although other issues, like differences in the criteria for patient enrollment, should also be considered.

In addition, over 26.64% (130/488) of the unique variants identified in the current study were classified as VUS, a higher proportion in comparison with other reports [13–15, 55, 58, 59]. Most of the VUS identified here (56.92%,

74/130) were located “deep” within introns (Supplementary Table 1), probably because some of the amplicons were long and spanned multiple exons when compared to studies that sequence flanking regions close to intron/exon boundaries. Considering non-coding VUS, 7/113 (6.19%) were predicted as spliceogenic by in silico algorithms (Supplementary Table 1). Even though we cannot determine their clinical significance with current evidences, functional studies on these variants may be worthwhile. The rare coding VUS predicted to be deleterious (Table 2) were observed in *ATM* (5/8), *PALB2* (2/8), and *TP53* (1/8). All of them are located within functional domains of the proteins and could affect biochemical properties and biological functions (Supplementary Fig. 2). Although some studies hypothesize that specific missense substitutions in *ATM* gene may confer greater risk of breast cancer [52, 60], there is no additional evidence regarding their impact on protein function.

Two VUS reported here require special attention. The *ATM*: c.6975G > A (p. Ala2325Ala), despite being a synonymous variant, this substitution falls at the last nucleotide position of exon 47, considered by VarSome as part of the consensus 5' splice motif (PVS1), leading to a likely pathogenic classification for this variant. Point mutations at this position are considered extremely likely to alter splicing due to improper exon and intron recognition and may result in the formation of an aberrant transcript [61, 62]. Algorithms used to predict the effect of sequence changes on RNA splicing suggest that *ATM* c.6975G > A (p. Ala2325Ala) variant may disrupt the consensus splice site (Supplementary Table 2). Furthermore, familial history of the carrier included one first- and one third-degree breast cancer, and one third-degree of ovarian cancer. Nonetheless, we did not add the PVS1 criterion to this variant, since it is not located in a canonical splice site and confirmation of functional impact by either RNA or protein analysis is still required. The other variant is *TP53* c.997C > T (p.Arg333Cys), located in a critical and well-established functional domain (PM1) and predicted to be damaging by four in silico tools (PP3); two functional studies produced conflicting findings, and did not allow to establish this variant as pathogenic or benign [50, 63].

Since only 18/126 (14.28%) of the included patients were previously tested for large rearrangements, we cannot rule out that some patients included in this study could harbor *BRCA1* or *BRCA2* pathogenic variants. However, the frequency of such *BRCA1/2* rearrangements in HBOC Brazilian patients represents 1.7% [64]. Furthermore, large rearrangements and deletions known to cause hereditary breast and ovarian cancer in the other tested genes were not evaluated in this study. According to Cybulski et al. [27], cases of non-*BRCA* large rearrangements might account for 1% or 2% of additional HBOC families. Additionally, the prevalence of pathogenic variants found here

might be underestimated, since our sequencing runs did not achieve 100% of sequence coverage of target regions, and the second run presented a low mean coverage depth affected by sequencing yield. Finally, our study was composed by families primarily ascertained through female individuals with breast cancer, which might have led to under-representation of ovarian cancer cases in these families. Consequently, in such a highly selected sample of women with a breast cancer diagnosis, this factor might lead to biased prevalence of pathogenic/likely pathogenic variants.

In conclusion, our findings provide important data on the composition of genetic variants in a Brazilian HBOC cohort tested negative for *BRCA1* and *BRCA2* deleterious variants. We identified pathogenic variants in 3.97% of patients in six breast/ovarian cancer predisposition genes. The identification of deleterious variants in actionable genes like *ATM*, *CHEK2*, *PALB2*, and *TP53* also contributes to the clinical management of the probands and their relatives. Additionally, our study demonstrates the utility of multigene panels for patients who underwent non-informative *BRCA1* and *BRCA2* genetic screening. We also identified several rare variants for which the clinical significance is currently unknown. Some of these VUS were predicted to be deleterious or benign, pointing to the need of functional assays or robust segregation studies to evaluate the biological impact of these variants.

Acknowledgements We are very thankful to all patients who participated in this study. We also thank Kelly Rose Lobo de Souza who performed *BRCA* genetic testing and Carolina Furtado for her experimental assistance. This work was supported by the National Institute for Cancer Control (INCT para Controle do Câncer; <https://www.inct-cancer-control.com.br>), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, Grant Numbers: 305873/2014-8 and 573806/2008-0), and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, Brazil Grant Number: E26/170.026/2008). PSS was supported by grants from the Rio de Janeiro State Science Foundation (FAPERJ E26/201.200/2014), the Brazilian National Research Council (CNPq 304498/2014-9), and the Coordination for Higher Education Personnel Training (CAPES). This study is part of the requirements for the doctoral degree in Genetics of PSS at the Federal University of Rio de Janeiro.

Author contributions Study conception and design: MAMM and CRB. Patients' inclusion, clinical data collection, and Genetic Counseling: ACES. DNA sequencing: RG, PSS, CMN, SMAP and BPM. Identification of genetics variants and pathogenicity classification: RG, ACB, PSS, and BPM. Manuscript writing—original draft: RG. Manuscript writing—review and editing: RG, PSS, BPM, and MAMM. Funding acquisition: MAMM and CRB. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Patient consent All individuals who participate in this study provided written informed consent approved by the local ethics committee. No identifiable personal patient data are shown in this article.

Research involving human rights All procedures performed in studies involving human participants were approved by the ethical committee of the Brazilian National Cancer Institute (INCA; Project #114/07 and C.A.A.E. 14144819.0.0000.5274).

References

1. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S et al (2003) Average risks of breast and ovarian cancer associated with *BRCA1* or *BRCA2* mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 72:1117–1130. <https://doi.org/10.1086/375033>
2. Maxwell KN, Domchek SM (2012) Cancer treatment according to *BRCA1* and *BRCA2* mutations. *Nat Rev Clin Oncol* 9:520–528. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2012.123>
3. Easton DF, Pharoah PDP, Antoniou AC et al (2015) Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *N Engl J Med* 372:2243–2257. <https://doi.org/10.1056/NEJMSr1501341>
4. Susswein LR, Marshall ML, Nusbaum R et al (2016) Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. *Genet Med* 18:823–832. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.166>
5. Slavin TP, Maxwell KN, Lilyquist J et al (2017) The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. *NPJ Breast Cancer* 3:22. <https://doi.org/10.1038/s41523-017-0024-8>
6. Jarhelle E, Riise Stensland HMF, Hansen GÅM et al (2019) Identifying sequence variants contributing to hereditary breast and ovarian cancer in *BRCA1* and *BRCA2* negative breast and ovarian cancer patients. *Sci Rep* 9:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55515-x>
7. Pal T, Agnese D, Daly M et al (2020) Points to consider: is there evidence to support *BRCA1/2* and other inherited breast cancer genetic testing for all breast cancer patients? A statement of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* 22:681–685. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0712-x>
8. Couch FJ, Hart SN, Sharma P et al (2015) 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* 33:304–311. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.57.1414>
9. Kurian AW, Li Y, Hamilton AS, et al (2017) Gaps in incorporating germline genetic testing into treatment decision-making for early-stage breast cancer. In: *Journal of Clinical Oncology*. pp 2232–2239
10. Momozawa Y, Iwasaki Y, Parsons MT et al (2018) Germline pathogenic variants of 11 breast cancer genes in 7,051 Japanese patients and 11,241 controls. *Nat Commun* 9:4–6. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06581-8>
11. Desmond A, Kurian AW, Gabree M et al (2015) Clinical actionability of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer risk assessment. *JAMA Oncol* 1:943–951. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2015.2690>
12. Couch FJ, Shimelis H, Hu C et al (2017) Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer. *JAMA Oncol* 3:1190–1196. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0424>

13. Rosenthal EA, Ranola JMO, Shirts BH (2017) Power of pedigree likelihood analysis in extended pedigrees to classify rare variants of uncertain significance in cancer risk genes. *Fam Cancer* 16:611–620. <https://doi.org/10.1007/s10689-017-9989-6>
14. Bonache S, Esteban I, Moles A et al (2018) Multigene panel testing beyond BRCA1/2 in breast/ovarian cancer Spanish families and clinical actionability of findings. *J Cancer Res Clin Oncol* 144:2495–2513. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2763-9>
15. Hauke J, Horvath J, Groß E et al (2018) Gene panel testing of 5589 BRCA1/2-negative index patients with breast cancer in a routine diagnostic setting: results of the German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *Cancer Med* 7:1349–1358. <https://doi.org/10.1002/cam4.1376>
16. Lu HM, Li S, Black MH et al (2019) Association of breast and ovarian cancers with predisposition genes identified by large-scale sequencing. *JAMA Oncol* 5:51–57. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2018.2956>
17. Singh J, Thota N, Singh S et al (2018a) Screening of over 1000 Indian patients with breast and/or ovarian cancer with a multi-gene panel: prevalence of BRCA1/2 and non-BRCA mutations. *Breast Cancer Res Treat* 170:189–196. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4726-x>
18. Dominguez-Valentin M, Nakken S, Tubeuf H et al (2019) Results of multigene panel testing in familial cancer cases without genetic cause demonstrated by single gene testing. *Sci Rep* 9:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54517-z>
19. Antoniou AC, Casadei S, Heikkinen T et al (2014) Breast-cancer risk in families with mutations in *PALB2*. *N Engl J Med* 371:497–506. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1400382>
20. Schon K, Tischkowitz M (2018) Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53. *Breast Cancer Res Treat* 167:417–423. <https://doi.org/10.1007/s10549-017-4531-y>
21. Yang X, Leslie G, Doroszuk A et al (2019) Cancer risks associated with germline *PALB2* pathogenic variants: an international study of 524 families. *J Clin Oncol* 38:674–685
22. Marabelli M, Cheng SC, Parmigiani G (2016) Penetrance of ATM gene mutations in breast cancer: a meta-analysis of different measures of risk. *Genet Epidemiol* 40:425–431. <https://doi.org/10.1002/gepi.21971>
23. Eliade M, Skrzypski J, Baurand A et al (2017) The transfer of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer to healthcare: what are the implications for the management of patients and families? *Oncotarget* 8:1957–1971. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12699>
24. Tung NM, Boughey JC, Pierce LJ et al (2020) Management of hereditary breast cancer: American Society of Clinical Oncology, American Society for Radiation Oncology, and Society of Surgical Oncology Guideline. *J Clin Oncol*. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.00299>
25. Pena SDJ, di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M et al (2011) The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017063>
26. Kehdy FSG, Gouveia MH, Machado M et al (2015) Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:8696–8701. <https://doi.org/10.1073/pnas.1504447112>
27. Cybulski C, Kluzniak W, Huzarski T et al (2019) The spectrum of mutations predisposing to familial breast cancer in Poland. *Int J Cancer* 145:3311–3320. <https://doi.org/10.1002/ijc.32492>
28. Achatz MIW, Olivier M, Le CF et al (2007) The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett* 245:96–102. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.12.039>
29. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>
30. Castéra L, Krieger S, Rousselin A et al (2014) Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Eur J Hum Genet* 22:1305–1313. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.16>
31. Laduca H, Stuenkel AJ, Dolinsky JS et al (2014) Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients. *Gen Med*. <https://doi.org/10.1038/gim.2014.40>
32. Thompson ER, Rowley SM, Li N et al (2016) Panel testing for familial breast cancer: calibrating the tension between research and clinical care. *J Clin Oncol* 34:1455–1459. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.63.7454>
33. NCCN (2014) NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Breast Cancer. Version 1.2014
34. de Leeneer K, de Schrijver J, Clement L et al (2011) Practical tools to implement massive parallel pyrosequencing of PCR products in next generation molecular diagnostics. *PLoS One* 6:1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025531>
35. McLaren W, Gil L, Hunt SE et al (2016) The ensembl variant effect predictor. *Genome Biol* 17:1–14. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-0974-4>
36. den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR et al (2016) HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update. *Hum Mutat* 37:564–569. <https://doi.org/10.1002/humu.22981>
37. Richards S, Aziz N, Bale S et al (2015) 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* 17:405–423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
38. Meyer R, Kopanos C, Albarca Aguilera M et al (2018) VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>
39. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M et al (2009) Human splicing finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 37:1–14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp215>
40. Bakkenist CJ, Kastan MB (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421:499–506. <https://doi.org/10.1038/nature01368>
41. Pauty J, Couturier AM, Rodrigue A et al (2017) Cancer-causing mutations in the tumor suppressor *PALB2* reveal a novel cancer mechanism using a hidden nuclear export signal in the WD40 repeat motif. *Nucleic Acids Res* 45:2644–2657. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx011>
42. Wiltshire T, Ducey M, Foo TK et al (2020) Functional characterization of 84 *PALB2* variants of uncertain significance. *Genet Med* 22:622–632. <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0682-z>
43. Decker B, Allen J, Luccarini C et al (2017) Rare, protein-truncating variants in *ATM*, *CHEK2* and *PALB2*, but not *XRCC2*, are associated with increased breast cancer risks. *J Med Genet* 54:732–741. <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2017-104588>
44. Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G et al (2001) Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to *BRCA1* and *BRCA2* in a population-based study. *Genet Epidemiol* 21:1–18. <https://doi.org/10.1002/gepi.1014>
45. Girard E, Eon-Marchais S, Olaso R et al (2019) Familial breast cancer and DNA repair genes: Insights into known and novel susceptibility genes from the GENESIS study, and implications for multigene panel testing. *Int J Cancer* 144:1962–1974. <https://doi.org/10.1002/ijc.31921>
46. Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H et al (2003) The *CHEK2* 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. *Am J Hum Genet* 72:1308–1314. <https://doi.org/10.1086/375121>

47. Naseem H, Boylan J, Speake D et al (2006) Inherited association of breast and colorectal cancer: limited role of CHEK2 compared with high-penetrance genes. *Clin Genet* 70:388–395. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00698.x>
48. Winship I, Southey MC (2016) Gene panel testing for hereditary breast cancer. *Med J Aust* 204:188–190.e1. <https://doi.org/10.5694/mja15.01335>
49. Delimitsou A, Fostira F, Kalfakakou D et al (2019) Functional characterization of CHEK2 variants in a *Saccharomyces cerevisiae* system. *Hum Mutat* 40:631–648. <https://doi.org/10.1002/humu.23728>
50. Fischer NW, Prodeus A, Gariépy J (2018) Survival in males with glioma and gastric adenocarcinoma correlates with mutant p53 residual transcriptional activity. *JCI insight*. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.121364>
51. Singh J, Thota N, Singh S et al (2018b) Screening of over 1000 Indian patients with breast and/or ovarian cancer with a multi-gene panel: prevalence of BRCA1/2 and non-BRCA mutations. *Breast Cancer Res Treat* 170:189–196. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4726-x>
52. Tavtigian SV, Oefner PJ, Babikyan D et al (2009) Rare, evolutionarily unlikely missense substitutions in atm confer increased risk of breast cancer. *Am J Hum Genet* 85:427–446. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.08.018>
53. Buys SS, Sandbach JF, Gammon A et al (2017) A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer* 123:1721–1730. <https://doi.org/10.1002/cncr.30498>
54. Sás D (2015) Mutações em genes de predisposição para câncer de mama em pacientes brasileiros de risco. Diss - Univ Estadual Paul “Julio Mesquita Filho”, Inst Biociências Botucatu 42
55. de Souza Timoteo AR, Gonçalves AEMM, Sales LAP et al (2018) A portrait of germline mutation in Brazilian at-risk for hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 172:637–646. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4938-0>
56. Afghahi A, Kurian AW (2017) The Changing landscape of genetic testing for inherited breast cancer predisposition. *Curr Treat Options Oncol*. <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0468-y>
57. Da Costa E, Silva Carvalho S, Cury NM, Brotto DB et al (2020) Germline variants in DNA repair genes associated with hereditary breast and ovarian cancer syndrome: analysis of a 21 gene panel in the Brazilian population. *BMC Med Genom*. <https://doi.org/10.1186/s12920-019-0652-y>
58. Dutil J, Golubeva VA, Pacheco-Torres AL et al (2015) The spectrum of BRCA1 and BRCA2 alleles in Latin America and the Caribbean: a clinical perspective. *Breast Cancer Res Treat* 154:441–453. <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3629-3>
59. Dutil J, Teer JK, Golubeva V et al (2019) Germline variants in cancer genes in high-risk non-BRCA patients from Puerto Rico. *Sci Rep* 9:1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54170-6>
60. Jerzak KJ, Mancuso T, Eisen A (2018) Ataxia–telangiectasia gene (ATM) mutation heterozygosity in breast cancer: a narrative review. *Curr Oncol* 25:e176–e180. <https://doi.org/10.3747/co.25.3707>
61. Anna A, Monika G (2018) Splicing mutations in human genetic disorders: examples, detection, and confirmation. *J Appl Genet* 59:253–268
62. Fu Y, Masuda A, Ito M et al (2011) AG-dependent 3′-splice sites are predisposed to aberrant splicing due to a mutation at the first nucleotide of an exon. *Nucleic Acids Res* 39:4396–4404. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr026>
63. Fortunato C, Cipponi A, Ballinger ML et al (2019) A quantitative model to predict pathogenicity of missense variants in the TP53 gene. *Hum Mutat* 40:788–800. <https://doi.org/10.1002/humu.23739>
64. Palmero EI, Carraro DM, Alemar B et al (2018) The germline mutational landscape of BRCA1 and BRCA2 in Brazil. *Sci Rep* 8:1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27315-2>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Supplementary Table 1 Overall characteristics of non-coding VUS predicted as deleterious.

Gene	#	dbSNP ID	HGVS nomenclature	ACMG criteria	ClinVar classification	Predictive algorithm		gnomAD	Receptor status			Cancer history ² (Age at diagnosis)	
						HSF	MES		ER	PR	HER2	Personal	Familial
<i>ATM</i>	2	rs528576554	c.1607+112A>G	PM2, PP3	Benign	+77.61	-49.21	1.72e-03	na	na	na	BOC (28)	Third-degree: GIST (na), BC (70)
									+	+	+	UBC (49)	First-degree: BC (47), BC (50)
									na	na	na	UBC (49)	Second-degree: BC (45), BC (49), BC (na), GIST (82)
													First-degree: Skin cancer (49).
	2	rs186571773	c.1802+350G>A	PM2, PP3	na	+60.67	-223.48	7.65e-04	+	+	-	UBC (51)	Second-degree: Pancreatic cancer (84), thyroid cancer (70), GIST (na), GIST (90)
													Third-degree: PrCa (na)
	1	rs56112367	c.2921+19dup	PM2, PP3	na	-88.54	+149.67	7.05e-04	-	-	+	UBC/OC (33)	Second-degree: BC (49), Third degree: BC (na)
	1	rs137911551	c.3078-265T>G	PM2, PP3	na	+56.81	+275	7.96e-04	+	+	-	UBC (39)	First-degree: PrCa (45), Second-degree: BC (35)
													First-degree: BC (34), Pancreas cancer (na)
													Second-degree: PrCa (65), metastatic cancer (na)
	3	rs138963508	c.8011-234C>A	PM2, PP3	na	+57.06	+872.83	5.99e-03	+	+	-	UBC (64)	Second-degree: BC (80)
													na
<i>CDH1</i>	1	na	c.832+291_832+292insTAGG	PM2, PP3	na	+81.09	-364.06	na	na	na	na	UBC (38)	First-degree: BBC (40), Second-degree: PrCa (97)
<i>PALB2</i>	1	rs1444711587	c.2835-369C>T	PP3	na	+47.16	+188.32	5.80e-04	+	-	na	UBC (32)	First-degree: BC (48), gastric cancer (50)

Abbreviations: # - Number of probands; gnomAD – Allele frequency at gnomAD database. ER – Estrogen receptor; PR – Progesterone receptor; HER2 – Human Epidermal Growth Factor Receptor-type 2; na – Not available; BC – Breast cancer. UBC – Unilateral breast cancer. BBC – Bilateral breast cancer. PrCa – Prostate cancer. OC – Ovarian cancer. BOC – Bilateral ovarian cancer. GIST – Gastrointestinal cancer. ²Lung cancer and cervix cancer were not included.

Supplementary Table 2 VUS detected in this study.

Gene	dbSNP	HGVS nomenclature	gnomAD	Consequence	SIFT	PolyPhen	Align-GVGD	MutationTaster	M-CAP	HSF	MES
<i>ATM</i>	rs56112367	c.2921+19dup	1.0e-03	Intronic	na	na	na	na	na	-88.54	+149.67
<i>ATM</i>	na	c.8170C>A p.Gln2724Lys	na	Missense	Deleterious	Probably damaging	C45	Disease causing	Possibly Pathogenic	-0.81	na
<i>ATM</i>	rs1479478300	c.149A>G p.Lys50Arg	7.97e-06	Missense	Tolerated	Benign	C0	Polymorphism	Likely benign	+50.43	na
<i>ATM</i>	rs35963548	c.1595G>A p.Cys532Tyr	2.45e-04	Missense	Deleterious	Benign	C0	Disease causing	Possibly Pathogenic	+0.08	na
<i>ATM</i>	rs201780199	c.3256C>G p.Arg1086Cys	3.19e-05	Missense	Deleterious	Benign	C0	Disease causing	Possibly Pathogenic	+0.63	-2.05
<i>ATM</i>	rs34325032	c.1236-4_1236-3del	1.05e-02	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	rs768748099	c.497-5_497-4del	7.65e-04	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	rs763451341	c.6347+19_6347+20del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	rs763451341	c.6347+30_6347+31del	1.37e-04	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	rs556778314	c.6975G>A p.Ala2325Ala	1.19e-05	Synonymous	na	na	na	na	na	+56.48	-171.39
<i>ATM</i>	rs730881383	c.7375C>G p. Arg2459Gly	3.54e-05	Missense	Deleterious	Probably damaging	C65	Disease causing	Possibly Pathogenic	+15.98	+170.27
<i>ATM</i>	rs746351323	c.8800A>G p.Thr2934Ala	7.96e-06	Missense	Deleterious	Probably damaging	C55	Disease causing	Possibly Pathogenic	+76.75	na
<i>ATM</i>	rs745427727	c.2922-22_2922-20del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	-1.17
<i>ATM</i>	rs140641762	c.5352C>T p.Asn1784Asn	3.55e-05	Synonymous	na	na	na	na	Possibly Pathogenic	+2.3	na
<i>ATM</i>	rs528576554	c.1607+112A>G	1.72e-03	Intronic	na	na	na	na	na	+77.61	-49.21
<i>ATM</i>	rs186571773	c.1802+350G>A	7.65e-04	Intronic	na	na	na	na	na	+60.67	-223.48
<i>ATM</i>	rs137911551	c.3078-265T>G	7.96e-04	Intronic	na	na	na	na	na	+56.81	+275
<i>ATM</i>	rs138963508	c.8011-234C>A	5.99e-03	Intronic	na	na	na	na	na	+57.06	+872.83
<i>ATM</i>	rs567060474	c.6820G>A p.Ala2274Thr	9.21e-05	Missense	Deleterious	Probably damaging	C55	Disease causing	Possibly Pathogenic	-0.22	na
<i>ATM</i>	rs527558552	c.2250+503G>T	3.19e-05	Intronic	na	na	na	na	na	na	na

<i>ATM</i>	rs373116929	c.3577-28T>G	4.02e-05	Intronic	na	na	na	na	na	+155.15	na
<i>ATM</i>	na	c.4109+372del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	na	c.4109+628G>A	na	Intronic	na	na	na	na	na	+65.24	na
<i>ATM</i>	na	c.4109+629G>A	na	Intronic	na	na	na	na	na	-16.28	na
<i>ATM</i>	na	c.4109+630_4109+631del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	na	c.4109+631T>A	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	na	c.4110-307C>G	na	Intronic	na	na	na	na	na	+59.25	na
<i>ATM</i>	rs202068074	c.4110-374_4110-371del	5.94e-03	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	rs77033857	c.4110-473T>C	4.94e-04	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	na	c.4110-630_4110-629insAT	na	Intronic	na	na	na	na	na	-71.77	na
<i>ATM</i>	na	c.4110-630C>T	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	na	c.4436+83G>A	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	na	c.4776+130_4776+131insTG TGCCTGGCCTACGT	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	rs774000640	c.5762+56T>C	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	rs11366542	c.6573-45_6573-42del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	-70.06
<i>ATM</i>	rs553744385	c.6976-114del	3.21e-05	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	na	c.7516-298_7516-295del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	rs1372185010	c.7927+51G>A	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	na	c.7927+52T>C	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	rs1374518800	c.8011-51G>T	8.02e-06	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	na	c.8671+69_8671+70insTCTT GGTAGGCAAACA	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	rs566209535	c.8850+59C>T	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	rs664143	c.8850+60A>T	6.05e-01	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>ATM</i>	na	c.7992C>G p.Val2664Val	na	Synonymous	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	rs1360937602	c.532-25T>C	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	na	c.687+392_687+394del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	na	c.688-445T>C	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	na	c.688-485A>G	na	Intronic	na	na	na	na	na	+55.96	-8.54
<i>CDHI</i>	na	c.832+291_832+292insTAG G	na	Intronic	na	na	na	na	na	+81.09	-364.06

<i>CDHI</i>	na	c.832+419G>A	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	+66.15	na
<i>CDHI</i>	rs1158343325	c.833-270_833-267del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	rs1027713288	c.*110del	6.41e-05	3' UTR	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	rs191798782	c.1138-125G>T	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	rs9935130	c.1320+178A>C	7.82e-02	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	na	c.1320+352G>T	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	rs973703367	c.1320+414G>C	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	rs533594259	c.1320+55C>T	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	na	c.1320+617del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	na	c.1321-414C>G	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	rs1381315974	c.1321-572T>G	1.59e-04	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	rs746677240	c.1321-593_1321-590del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	rs1161708784	c.1321-958del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	na	c.1566-183C>T	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	na	c.1566-189G>A	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	na	c.1566-200C>T	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	rs34212204	c.1566-38T>G	1.19e-05	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	rs1053707665	c.49-387A>G	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	na	c.687+194A>T	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	rs868814008	c.687+195G>A	1.19e-04	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	rs536314715	c.687+393_687+394dup	9.93e-02	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	na	c.832+536_832+537del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	+235.94	na
<i>CDHI</i>	rs949458172	c.832+537A>T	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	rs930343696	c.832+537del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CDHI</i>	rs145920869	c.*210_*211del	9.68e-05	3' UTR	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs749156425	c.1581G>A p.Pro484Pro	2.57e-05	Synonymous	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs111466304	c.1590+174del	9.12e-03	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	na	c.1224+295_1224+298del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs941678224	c.1224+322T>C	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs17881221	c.1225-379A>T	2.23e-03	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs1481969887	c.1225-483G>T	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs77670999	c.1389-213C>T	6.37e-05	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na

<i>CHEK2</i>	rs557089147	c.1590+1239C>T	6.69e-04	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs780084871	c.1590+1540_1590+1544del	1.50e-03	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs576299845	c.1590+1726_1590+1731del	3.03e-03	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs556335113	c.1590+173del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs556335113	c.1590+173T>A	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs111317257	c.1590+1937T>C	1.56e-03	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs913183173	c.1591-1088C>T	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs190487254	c.1591-1094A>G	1.60e-03	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs184381247	c.1591-159G>A	8.28e-04	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs1249938257	c.1591-869G>A	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs554779856	c.1671+276A>G	1.72e-03	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs914857068	c.1671+463del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>CHEK2</i>	rs554426567	c.1672-368A>G	2.39e-03	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	rs45439097	c.3495G>A p.Ser1165Ser	7.04e-04	Synonymous	na	na	na	na	na	+57.68	+165.63
<i>PALB2</i>	rs138200248	c.-158G>C	9.91e-03	5' UTR	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	rs249936	c.3114-51T>G	9.98e-01	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	rs1336079225	c.*209G>A	na	3' UTR	na	na	na	na	na	?	?
<i>PALB2</i>	na	c.1685-90A>G	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	rs773179377	c.211+23T>C	1.06e-05	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	rs978973239	c.2835-220C>T	1.06e-05	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	rs1444711587	c.2835-369C>T	5.80e-04	Intronic	na	na	na	na	na	+47.16	+188.32
<i>PALB2</i>	rs1189941589	c.2835-373_2835-372del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	rs1189941589	c.2835-373_2835-372dup	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	na	c.2835-374_2835-372dup	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	rs1189941589	c.2835-375_2835-372del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	na	c.2835-375_2835-372dup	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	rs1189941589	c.2835-376_2835-372del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	na	c.2835-376_2835-372dup	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	na	c.2835-377_2835-372del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	rs1189941589	c.2835-378_2835-372del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	na	c.2835-404G>T	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	rs754470879	c.2835-75_2835-71del	1.33e-01	Intronic	na	na	na	na	na	+252.51	na

<i>PALB2</i>	na	c.3351-43T>C	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	na	c.3351-44T>C	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	na	c.3351-55_3351-53del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>PALB2</i>	rs373483056	c.100C>T p.Arg34Cys	1.76e-05	Missense	Deleterious	Probably damaging	C65	Disease causing	Possibly Pathogenic	1.31	na	na
<i>PALB2</i>	rs587782765	c.2401G>A p.Asp801Asn	3.98e-06	Missense	Tolerated	Probably damaging	C0	Polymorphism	Likely benign	+1.63	na	na
<i>PALB2</i>	rs536644825	c.2506G>A p.Val836Ile	1.06e-05	Missense	Tolerated	Benign	C0	Polymorphism	Likely benign	-0.14	-4.02	na
<i>RAD51D</i>	na	c.-385C>T	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>RAD51D</i>	na	c.-386C>T	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>TP53</i>	rs1060504164	c.135G>A p.Leu45Leu	na	Synonymous	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>TP53</i>	na	c.1100+439_1100+440insG	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	+254.01	na
<i>TP53</i>	na	c.1100+444C>T	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>TP53</i>	rs576983083	c.1101-200T>C	1.28e-04	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>TP53</i>	rs183276131	c.673-100C>T	5.27e-03	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>TP53</i>	na	c.673-236del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>TP53</i>	na	c.673-73_673-71del	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>TP53</i>	na	c.994-53T>C	na	Intronic	na	na	na	na	na	na	na	na
<i>TP53</i>	rs769934890	c.997C>T p.Arg333Cys	2.39e-05	Missense	Deleterious	Probably damaging	C55	Disease causing	Possibly Pathogenic	na	na	na

Abbreviations: gnomAD – Allele frequency in gnomAD database; na – Not available or not applicable.

6. Capítulo 3. Variantes em genes da via de reparo em pacientes com câncer de mama negativas para variantes patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2*

6.1. Resultados

Em 145 pacientes com câncer de mama negativas para variantes deletérias em *BRCA1* e *BRCA2*, detectamos 549 variantes únicas, sendo 89 *missense*, 32 sinônimos, 2 *frameshift*, 7 sítio de *splice*, 2 deleções, 28 na região 3'UTR, 12 na região 5'UTR, e 377 variantes intrônicas. Entre as 549 variantes únicas, 400 foram classificadas como benignas, 144 como VUS e cinco como patogênicas. As variantes VUS e patogênicas são listadas no material suplementar VIII. Observamos duas variantes patogênicas em *PALB2*, c.1240C>T (p.Arg414Ter) e c.2763_2764del (p.His921GlnFsTer6), e uma variante patogênica nos outros genes, *ATM* c.6099dup (p.Arg2034ThrfsTer4), *TP53* c.534C>A (p.His178Gln), e *CHEK2* c.1229del (p.Thr410MetfsTer15). Essas variantes estavam localizadas nos domínios funcionais do *PALB2*, *ATM*, *TP53* e *CHEK2* (figuras 6.1 e 6.2). Não foram encontradas variantes patogênicas nos genes *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *RAD51D*.

Encontramos 144 VUS, seis delas presentes nos domínios funcionais dos genes (figuras 6.1 e 6.2). No gene *ATM* detectamos uma nova VUS, c.8170 C>A (p.Gln2724Lys), e quatro c.497-5_497-4del, c.6176C>T (p.Thr2059Ile), c.6543G>T (p.Glu2181Asp), c.7375C>G (p.Arg2459Gly) com frequência muito baixa no banco de dados GenomAD. No gene *BRIP1* encontramos duas VUS, c.316C>T (p.Arg106Cys) e c.3651G>T (p.Trp1217Cys), e no gene *RAD51D* encontramos duas VUS, c.26G>C (p.Cys9Ser) e c.415T>C (p.Cys139Arg), todos com uma frequência muito baixa no GenomAD (tabela 6.1). As VUS não localizadas nos domínios funcionais dos genes estão listadas no anexo VIII. Não houve associação das variantes patogênicas e VUS em relação a sobrevida das pacientes após o diagnóstico da neoplasia (Anexo IX).

Observamos que a interação entre as proteínas PALB2/BRCA2 não ocorre na presença da variante p.Gln921HisfsTer6, devido à perda da proteína PALB2, já a variante selecionada como controle negativo (A1025R) mostrou comportamento esperado, semelhante ao observado com a transfecção do vetor vazio (Figura 6.4). A atividade luciferase relativa observada para a interação entre PALB2 CT e BRCA2 NT foi cerca de 7 vezes mais intensa do que a observada para PALB2 NT e BRCA1 CT (figura 6.4). Também foi possível observar uma perda parcial ou total da proteína PALB2 na presença da variante p.Gln921HisfsTer6 (Figura 6.5).

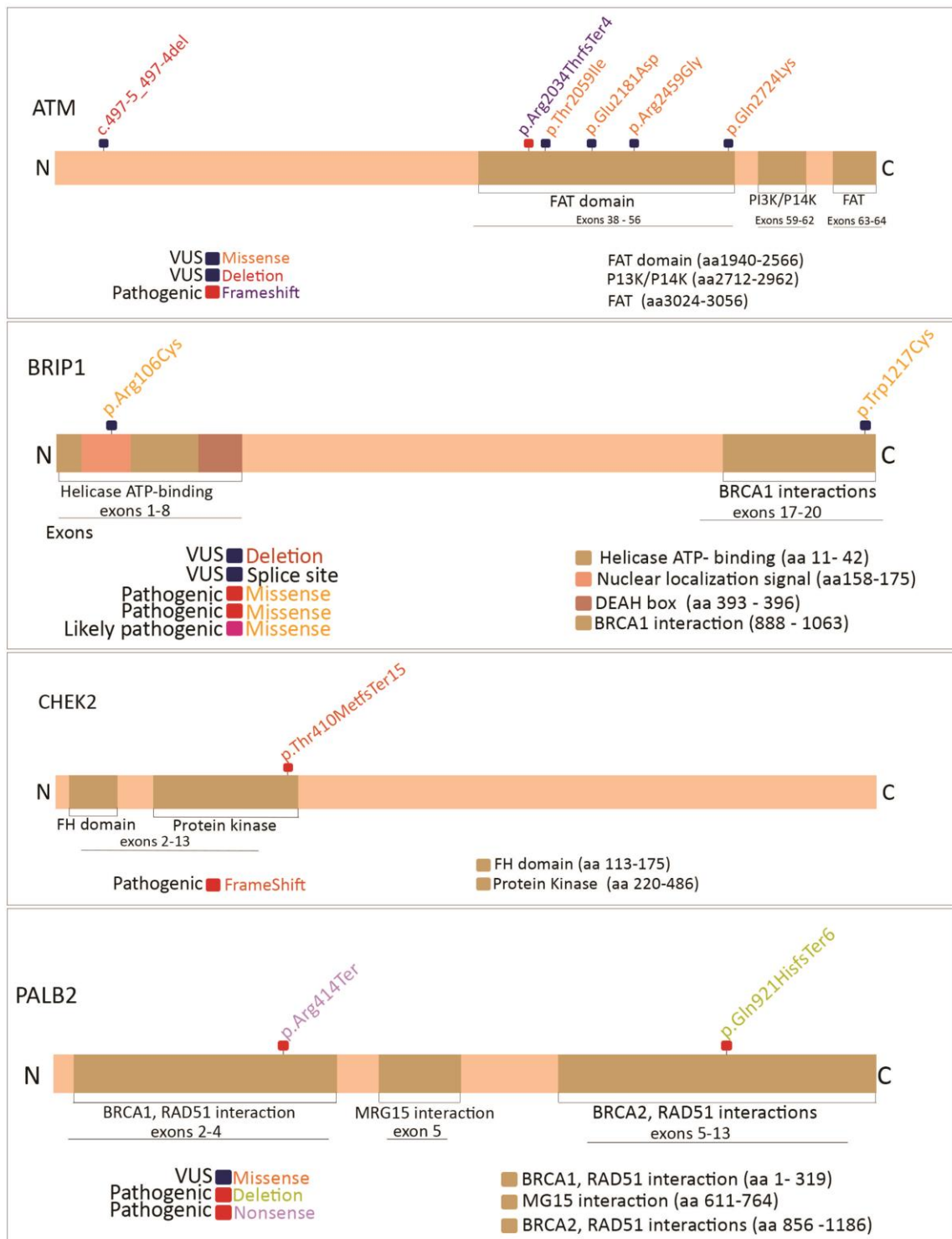


Figure 6.1 Representação esquemática dos domínios funcionais de *ATM*, *BRIP1*, *CHEK2*, *PALB2*, genes responsáveis pelo reparo da via de recombinação homóloga. A figura mostra os domínios funcionais e as variantes detectadas em cada região. A linha horizontal e os números abaixo dos domínios representam os éxons que abrangem os domínios funcionais.

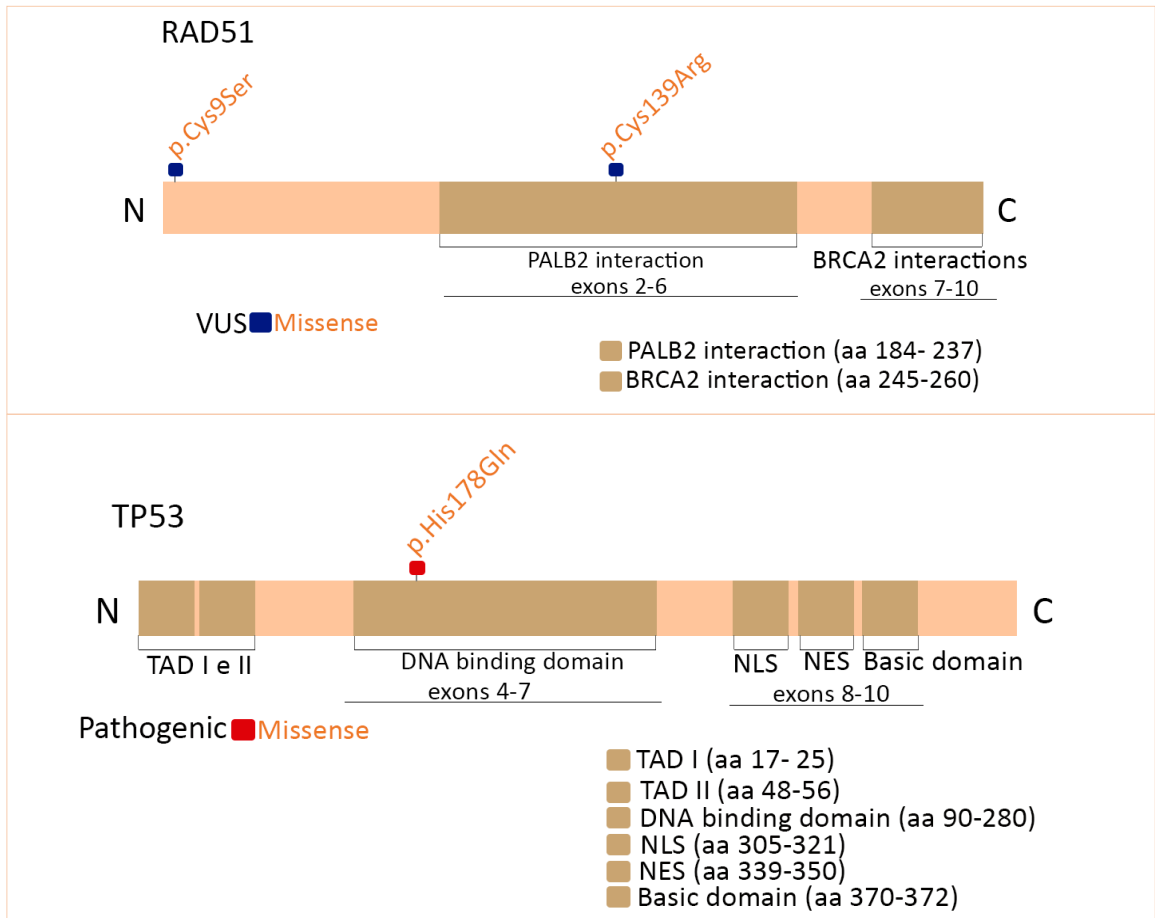


Figure 6.2 Representação esquemática dos domínios funcionais dos genes *RAD51* e *TP53*, mostrando as variantes detectadas. A linha horizontal e os números abaixo dos domínios representam os éxons que abrangem os domínios funcionais.

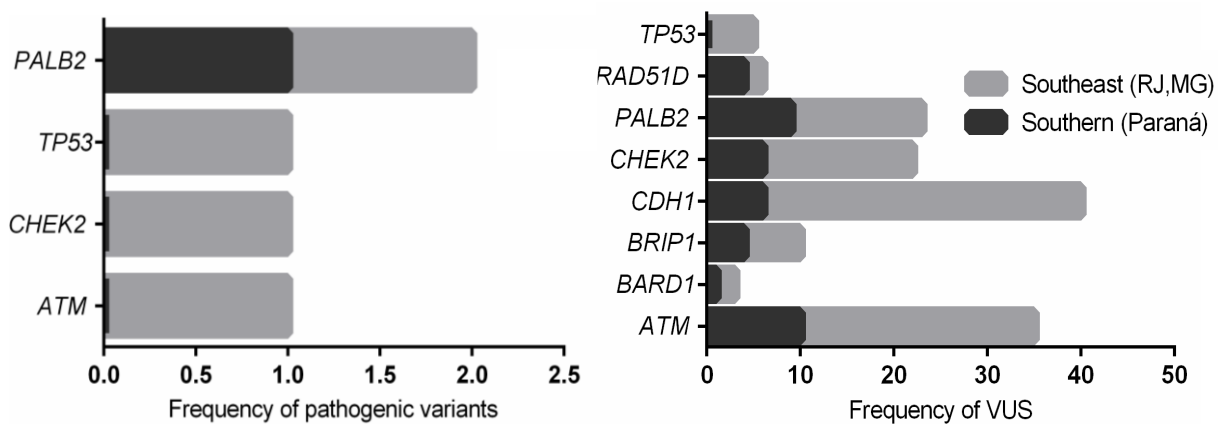


Figure 6.3 Gráficos mostrando a distribuição de variantes patogênicas e VUS em pacientes do Sul e Sudeste do Brasil.

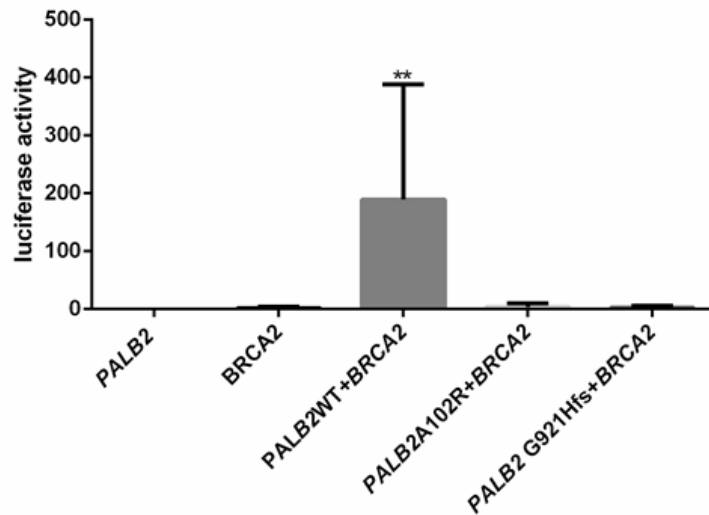


Figure 6.4 Avaliação da interação das proteínas PALB2-BRCA2 no modelo híbrido em células de mamíferos usando células humanas HEK293FT co-transfectadas com as construções codificadas para *PALB2* (vetor vazio), mostrando uma diferença estatisticamente significativa quando comparamos o vetor vazio, a variante analisada (G921Hfs+BRCA2) e a proteína selvagem de PALB2 (PALB2WT+BRCA2). ** $p \leq 0.001$ na ANOVA unidirecional e $p \leq 0.0001$ no pós-hoc de Dunnett. As barras representam a média e o desvio padrão dos três experimentos obtidos independentemente em ensaios quadruplicados.

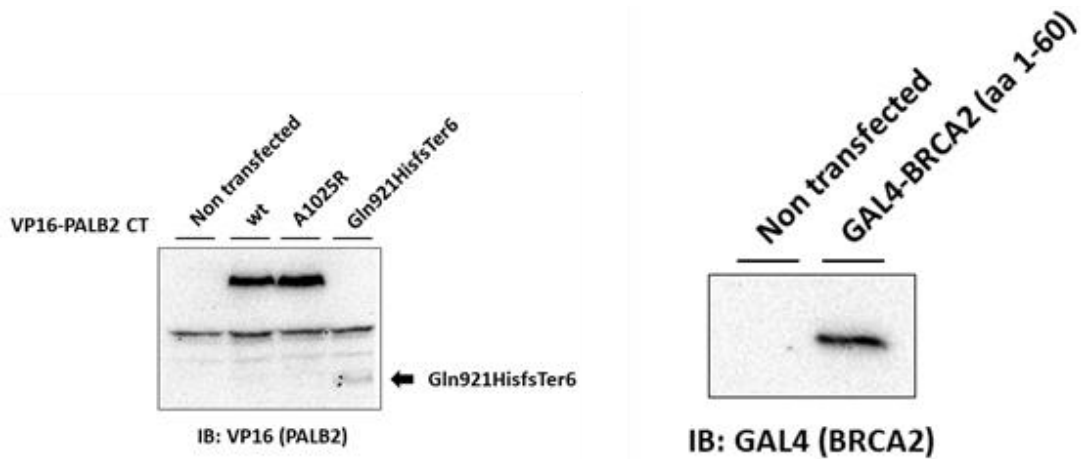


Figure 6.5 Avaliação da presença ou ausência da variante Gln921HfsTer6 na proteína *PALB2*. A figura mostra (A) quatro condições diferentes: células humanas não transfectada usadas como controle negativo, wt (transfecção de BRCA2 NT-GAL4 DBD e PALB2 tipo selvagem CT-VP16, com banda indicando a presença da proteína PALB2), A1025R (transfecção de BRCA2 NT-GAL4, PALB2 CT-VP16 e variante sintética A1025R, conhecida por não interagir com BRCA2), Gln921HfsTer6 (avaliação da variante Gln921HfsTer6, sem a presença da banda na altura esperada, que representaria parte da proteína truncada). (B) duas condições: não transfectada, GAL4-BRCA2(aa1-60) (o controle positivo do promotor GAL4 fundido ao BRCA2, mostrando que a interação entre eles foi obtida com sucesso).

Tabela 6.1 Perfil de variantes patogênicas, provavelmente patogênicas e de significado inserto em pacientes negativas para variantes patogênicas em *BRCA1/2*. A tabela mostra os genes, identificação dbSNP, a nomenclatura de acordo com HGV (*Human Genome Variation Society*), características clínicas, frequência de acordo com o banco populacional GnomAD, classificação de acordo com a NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) e ClinVar, critérios de pontuação para classificação clínica da ACMG (*American College of Medical Genetics and Genomics and the association for molecular pathology*), e a pontuação final da variante que gera seu significado clínico.

Gene	dbSNP ID	HGVS nomenclature	Lat	Características clínicas			GnomAD	NCCN	ClinVar	Classificação variantes	
				idade	Sub.mol	Histologia				Critério ACMG	Pontuação final-ACMG
<i>ATM</i>	rs768748099	c.497-5_497-4del	Uni	36,58	TN, LB	CDI, CDI	7.65E-04	sim	VUS	PM2	VUS
	na	c.6099dup p.Arg2034ThrfsTer4	Uni	36	LB	CDI	Na	sim	P	PVS1, PM2, PP3	P
	rs144761622	c.6176C>T p.Thr2059Ile	Uni	31	LB	CDI	Na	sim	VUS	PM1, PM2	VUS
	rs138828590	c.6543G>T p.Glu2181Asp	Uni	33	LB	CDI	1.51E-04	sim	VUS	PM1, PM2, PP3	VUS
	rs730881383	c.7375C>G p.Arg2459Gly	Uni	29	LA	CDI	Na	sim	VUS	PM1, PM2, PP3	VUS
na	c.8170C>A p.Gln2724Lys	Uni	68	LA,	CDI	Na	sim	VUS	PM1, PM2, PP3	VUS	
<i>BRIP1</i>	rs587780247	c.316C>T p.Arg106Cys	Uni	63	LA	CDI	1.11E-04	sim	VUS	PM2	VUS
	rs542698396	c.3651G>T p.Trp1217Cys	Uni	57	HER2+	CDI	7.97E-06	sim	VUS	PM2	VUS
<i>CHEK2</i>	-	c.1229del p.Thr410MetfsTer15	Uni	49	LA	CLI	Na	sim	P	PVS1, PM2, PP3	P
<i>TP53</i>	rs155526001	c.534C>A p.His178Gln	Bi	48	LB	CDI	Na	sim	P	PM1,PM2,PM5,PP2,PP3	P
<i>PALB2</i>	rs180177100	c.1240C>T p.Arg414Ter	Uni	67	HER2+	CDI	7.98E-06	sim	P	PVS1, PP5, PP3	P
	na	c.2763_2764del p.His921GlnFsTer6	Uni	51	LB	CDI	Na	sim	P	PVS1, PM2, PP3	P
<i>RAD51</i>	rs140825795	c.26G>C p.Cys9Ser	Uni	32	TN	CDI	3.19E-05	sim	VUS	PM2, PP3	VUS
	<i>D</i> rs201313861	c.415T>C p.Cys139Arg	Uni	41	LB	CDI	6.37E-05	sim	VUS	BP4	VUS

Critério utilizados: PM2= ausente ou frequência extremamente baixa em controles ou bancos populacionais, PVS1= *nonsense, frameshift*, locais de *splicing* em genes em que a perda de função é um mecanismo conhecido da doença, PP3= várias linhas de evidência computacional mostram um efeito deletério no gene (conservação, evolução, alteração de *splicing*), PM1= variante localizada em domínio funcional do gene ou hot spot, PM5= variante *missense* presente em um resíduo de aminoácido onde uma *missense* diferente já foi classificada como patogênica, PP2= variante *missense* em gene com baixa taxa de variantes *missense* benigna, e onde variantes *missense* são um mecanismo comum da doença, PP5= fonte confiável relata a variante como patogênica, BP4= diversas linhas de evidência computacional sugerem nenhum impacto no gene. P= patogênica, lat= lateralidade, sub.mol= subtipo molecular, uni= unilateral, bi= bilateral, LA= luminal A, LB= luminal B, TN= triplo negativo, CDI= carcinoma ductal invasivo, CLI= carcinoma lobular invasivo.

6.2. Discussão

A frequência de VUS detectadas no presente estudo nos genes de reparo selecionados em pacientes brasileiras com câncer de mama negativas para variantes patogênicas em *BRCA1/2* foi alta (77%, 113/145) nas amostras do sul e sudeste, e similar a outro estudo com pacientes do sudeste (76,6% em 95 amostras, Carvalho et al. 2020). Essa frequência pode estar relacionada ao tamanho dos genes e falta de estudos com informação a respeito das variantes. Entre as 144 VUS detectadas no presente estudo, oito são *missense*, e entre elas seis se localizam nos domínios funcionais de *ATM*, *BRIP1* e *RAD51*, onde também detectamos variantes patogênicas, como em outros trabalhos (Kadri et al. 2021). Portadoras de VUS *missense* em domínios funcionais devem ser acompanhadas com maior cautela, devido a troca de aminoácidos localizados nos domínios funcionais dos genes, que são essenciais para interação com outro gene durante o reparo por recombinação homóloga, e a perda de sua função pode gerar um efeito em cascata e impactar no reparo correto da fita (Sadeghi et al. 2020). A classificação destas variantes de significado incerto é dificultada pela falta de estudos funcionais, dados epidemiológicos e diferentes abordagens clínicas (Fanale et al. 2021). A interpretação errônea das variantes de significado incerto pode resultar em um diagnóstico genético equivocado e tratamento inapropriado, e estudos como o aqui desenvolvido aumentam as evidências para a interpretação e classificação de variantes com significado clínico desconhecido (Campuzano et al. 2020).

Em relação a variantes patogênicas, detectamos uma frequência de 3,4% (5/145) nos genes da via de reparo em pacientes brasileiras negativas para variantes patogênicas em *BRCA1/2* no Sudeste (MG e RJ), similar a outro estudo do sudeste (3,97%, n=126) também com pacientes com histórico familiar de câncer de mama (Gomes et al. 2021). Outros estudos encontraram uma frequência maior no sudeste (23,4%, n=95), em pacientes com câncer de mama e histórico familiar de câncer de mama e ovário, analisando um número maior de genes (Carvalho et al. 2020), e no nordeste (9,5%, n=157), em pacientes com histórico familiar para câncer de mama (de Souza Timoteo et al. 2018). A frequência de variantes patogênicas em *ATM* na população brasileira também varia e difere de acordo com as regiões amostradas, sendo 0,6% (1/157) no nordeste do Brasil em pacientes com histórico familiar (Rio Grande do Norte, de Souza Timoteo et al. 2018), e 4,5% (1/22) no sudeste do Brasil em pacientes com histórico familiar de câncer de mama (São Paulo, Bandeira et al. 2021). No presente estudo, encontramos em *ATM* (0,7%, 1/145) a variante *frameshift* c.6099dup (p.Arg2034ThrfsTer4), que gera um códon de parada prematuro resultando na perda do domínio funcional FAT, já

descrita em uma publicação prévia (Gomes et al. 2021). A proteína de *ATM* truncada pode afetar a manutenção do reparo, bem como o controle da apoptose (Stucci et al. 2021). Sugerimos que a presença dessa *frameshift* pode estar associada ao desenvolvimento do câncer de mama dessa paciente, uma vez que a paciente com a presença dessa alteração tem apenas 36 anos, idade precoce, carcinoma ductal invasivo e subtipo luminal B.

No gene *CHEK2* detectamos uma frequência de variantes patogênicas (0,7%, 1/145) ligeiramente menor do que a relatada em outros estudos do Brasil, 1,7% (1/59) em pacientes do Sul com câncer de mama e histórico de câncer de mama e colorretal (Abud et al. 2012), 0,83% (1/120) no sudeste (Silva et al. 2014), e 14,3% (1/7) no sul (Palmero et al., 2016), todos com histórico de câncer de mama. A nova variante patogênica e *frameshift* c.1229del (p.Thr410Metfr15), detectada em *CHEK2*, leva à perda da função do gene, um mecanismo conhecido por ocorrer em doenças relacionadas ao *CHEK2*, como em pacientes portadores de Li-Fraumeni (Lee et al. 2001). Além disso, a nova variante c.1229del (p.Thr410Metfr15) está ausente no banco de dados de pessoas saudáveis GnomAD, e a abordagem *in silico* aqui realizada também previu a variante como patogênica, aumentando as evidências sobre sua patogenicidade. A paciente portadora desta variante foi diagnosticada com câncer de mama, carcinoma *lobular* invasivo e subtipo luminal A, em idade precoce (49 anos). Estudos mostram que alterações patogênicas *CHEK2* estão envolvidas no desenvolvimento do câncer de mama familiar aumentando o risco para o seu desenvolvimento em até 44% (Cybulski et al. 2011), e aqui sugerimos a possível associação da variante patogênica c.1229del (p.Thr410Metfr15), com o desenvolvimento do câncer de mama.

No gene *PALB2* detectamos duas variantes patogênicas, *frameshift* e *missense*, localizadas no domínio WD40 e no domínio de interação com *BRCA1* e *RAD51*, respectivamente. A variante patogênica *frameshift* *PALB2* c.2763_2764del (p.His921GlnFsTer6) é aqui descrita pela primeira vez, causa uma mudança na leitura da proteína e pode causar a perda da função gênica, um mecanismo conhecido por causar doenças, de acordo com vários critérios (tabela 6.1). Reforçamos a patogenicidade desta variante através do ensaio funcional, onde mostramos que essa variante no domínio WD40 de *PALB2* impede a interação de *PALB2* com *BRCA2* (figura 6.4 e 6.5, seção 6.1), e a perda de parte ou de toda a proteína *PALB2* (figura 6.4 e 6.5, seção 6.1). Variante *missense* ou *frameshift* nestes domínios podem ser patogênicas porque o domínio WD40 é crucial para a interação com a DNA polimerase, que é vital para o início da síntese homóloga de DNA mediada por recombinação e extensão D-loop de DNA (fita que substitui a região danificada) (Hellebrand et al. 2011). Além disso, a proteína *PALB2* interage com a região N-terminal do

BRCA2 através do domínio WD40, estabilizando sua função nuclear e reparo de DNA. Os pacientes que não possuem a proteína PALB2 funcional podem desenvolver câncer de mama familiar (Wu et al. 2020). Essa variante patogênica foi encontrada em uma paciente de 51 anos com histórico familiar de câncer de mama, carcinoma ductal invasivo e subtipo molecular luminal B, e está associada com o desenvolvimento do câncer de mama. A segunda variante patogênica em *PALB2*, a *missense* c.1240C>T (p.Arg414Ter) gera um códon de terminação, impedindo que a proteína seja totalmente produzida (veja critérios na tabela 2.1, seção 6.1). Também foi observado que as variantes em heterozigoses representam até quatro vezes mais aumento do risco de câncer de mama (Casadei et al., 2011; Bogdanova et al., 2011; Hellebrand et al., 2011). Estudos anteriores com pacientes europeus associaram essa variante ao desenvolvimento do câncer pancreático (Slater et al. 2010), e no presente estudo foi descrita pela primeira vez em pacientes brasileiras com câncer de mama.

A frequência das variantes patogênicas de *TP53* varia de acordo com as regiões brasileiras amostradas, e mesmo dentro dessas regiões. No sudeste varia de 0,7% (1/145, presente estudo), passando por 2% (1/54, estado de São Paulo, Carraro et al. 2013), e indo até 17% (50/294, estado de São Paulo, Nagai et al., 2003), enquanto no nordeste foi detectada a frequência de 0,94% (1/106, Felix et al. 2014), todos os estudos incluíram pacientes com histórico familiar. Essa variante c.534C>A (p.His178Gln) de *TP53* foi relatada em pacientes com rhabdomyosarcoma, e com câncer de mama (Wozniak et al. 2011; Hettmer et al. 2014; Gomes et al. 2021). E está localizada no domínio de ligação do DNA, considerado um *hot spot*, podendo afetar sua funcionalidade e interação com outras proteínas durante a reparação do DNA (veja critério tabela 6.1, seção 6.1). Corroborando essa evidência, o ensaio *in vitro* mostrou transcrição reduzida de mutantes quando comparado com o *TP53* normal (Fischer et al. 2018). A falta ou perda parcial da proteína de *TP53* pode comprometer o controle do ciclo celular, bem como senescência (Schon e Tischkowitz, 2018). No presente estudo foi detectada em uma paciente com 48 anos de idade, histórico de câncer familiar, câncer de mama bilateral e do subtipo luminal B. Idade precoce do desenvolvimento da neoplasia, uma das características de portadores de mutações em *TP53* (Schon e Tischkowitz, 2018).

Apesar de estudos mostrarem que *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51C*, *RAD51D* e *TP53* representam um aumento do risco para o câncer de mama (Hu et al. 2020), nem todos eles foram encontrados com variantes patogênicas no presente estudo, mostrando que não há uma uniformidade entre a frequência das variantes nesses genes. No presente estudo com 155 amostras de pacientes com câncer de mama, 1,9% dos casos foram explicados por alterações em *BRCA1* e *BRCA2*, e 3,2% por alterações em *ATM*, *CHEK2*,

PALB2 e *TP53*. *PALB2* foi o gene mais alterado no presente estudo, corroborando estudos previos que mostraram *PALB2* entre os genes com maior número de alterações depois de *BRCA1/2* (Slavin et al. 2017). *PALB2* também apresentou variantes patogênicas em um estudo com pacientes brasileiras com câncer de mama e negativas para mutações patogênicas para *BRCA1/2*, junto com *ATM*, *CHEK2* e *TP53*, nesse estudo *TP53* foi estatisticamente associado à um aumento do risco de câncer de mama (Santa et al. 2022). Nosso estudo, assim como esse último estudo, não detectou mutações patogênicas em *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1* e *RAD51D*, sugerindo que estes últimos genes tem uma frequência menor de alterações em pacientes com câncer de mama, em relação aos outros genes estudados. Esses resultados corroboram a hipótese de *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1* e *RAD51D* ter um risco moderado associado ao desenvolvimento do câncer de mama, baseado na baixa frequência de alterações patogênicas detectadas em pacientes (Shen et al. 2021). Entretanto, variantes patogênicas em *BARD1*, *BRIP1* e *RAD51* detectadas em pacientes com câncer de ovário já foram associadas com um aumento do risco de câncer de ovário (Turchiano et al. 2022). Em *BARD1* também foi detectado alterações patogênicas em outro estudo brasileiro, onde os autores mostraram que *BARD1* junto com *BRAXAS1*, *BRCA2*, *CHEK2*, *CDH1*, *MLH1*, *PALB2* e *PMS2* estavam associados com um risco aumentado para câncer de mama e ovário (Carvalho et al. 2020). Com isso podemos sugerir que ainda não está definido um padrão para os genes estudados (exceto *BRCA1/2*), e nem quais genes representam risco alto ou moderado.

7. Conclusão geral

Um maior número de variantes patogênicas foram detectadas nos genes *BRCA1* (n=2), *PALB2* (n=2), seguidos de *BRCA2* (1), *ATM* (1), *CHEK2* (1) e *TP53* (1), enquanto em *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1* e *RAD51D* não foram detectadas variantes patogênicas.

A presença de variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas (3,4%, 5/145) nos genes *ATM*, *CHEK2*, *PALB2* e *TP53* em pacientes negativas para alterações patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2*, explicam parte dos casos de câncer de mama, sendo duas delas ainda a descritas na literatura.

A variante de *PALB2* c.2763_2764del (p.His921GlnFsTer6) é patogênica por afetar a interação de *BRCA2* e *PALB2* e causar a perda da proteína de *PALB2*, podendo afetar o reparo por recombinação homóloga, como mostrado pelo nosso estudo funcional.

A região Sul do Brasil é heterogênea em relação a frequência de variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2*. Sugerimos que essa diferença se relaciona com o efeito fundador de determinadas variantes e/ou ao padrão de colonização de

cada região.

Devido à baixa frequência das variantes patogênicas e VUS nas pacientes analisadas, a maioria detectada em apenas um indivíduo, não foi possível mostrar associação entre essas variantes e os dados clínicos das pacientes, ou com sobrevida livre de recorrência.

As variantes patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2* detectadas em duas pacientes segregam entre os indivíduos da família, sendo possível estender o aconselhamento genético aos familiares, com o acompanhamento de uma médica geneticista em colaboração com nosso projeto. Com isso, o restante da família positivo para uma das alterações pode ser acompanhado, para uma detecção e tratamento precoce da neoplasia.

8. Referências

- Abud J, Koehler-santos P, Ashton-Prolla P (2012) *CHEK2* 1100DEL C GERMLINE MUTATION: a frequency study in hereditary breast and colon cancer Brazilian families. *Arq. Gastroenterol.* 49(4):273–278. <https://doi.org/10.1590/S0004-28032012000400008>
- Alemar B, Gregório C, Herzog J, Matzenbacher Bittar C, Brinckmann Oliveira Netto C, Artigalás O, D Schwartz IV, Coffa J, Alves Camey S, Weitzel J et al. (2017) *BRCA1* and *BRCA2* mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population? *PLoS One* 12:e0187630.
- Alemar B, Herzog J, Brinckmann Oliveira Netto C, Artigalás O, Schwartz IVD, Matzenbacher Bittar C, Ashton-Prolla P, Weitzel JN (2016) Prevalence of Hispanic *BRCA1* and *BRCA2* mutations among hereditary breast and ovarian cancer patients from Brazil reveals differences among Latin American populations. *Cancer Genet* 209:417–422.
- Alenezi WM, Fierheller CT, Recio N, Tonin PN (2020) Literature review of *BARD1* as a cancer predisposing gene with a focus on breast and ovarian cancers. *Genes (Basel)* 11:1–24.
- Alluri P, Newman LA (2014) Basal-like and triple-negative breast cancers. Searching for positives among many negatives. *Surg Oncol Clin N Am* 23:567–577.
- Angeli D, Salvi S, Tedaldi G (2020) Genetic predisposition to breast and ovarian cancers: How many and which genes to test? *Int J Mol Sci* 21:1120-1128.
- Aretini P, D’Andrea E, Pasini B, Viel A, Costantini RM, Cortesi L, Ricevuto E, Agata S, Bisegna R, Boiocchi M et al. (2003) Different expressivity of *BRCA1* and *BRCA2*: Analysis of 179 Italian pedigrees with identified mutation. *Breast Cancer Res Treat* 81:71–79.
- Ausubel F, M, Brent R, Kingston RE, Moore D, D et al. (2002) *Short Protocols in Molecular Biology*. Wiley Library 5th ed., vol. 1. Capítulo 1.
- Bandeira G, Rocha K, Lazar M, Ezquina S, Yamamoto G, Varela M, Takahashi V, Agüena M, Gollop T, Zatz M et al. (2021) Germline variants of Brazilian women with breast cancer and detection of a novel pathogenic *ATM* deletion in early-onset breast cancer. *Breast Cancer* 28:346–354.
- Baudi F, De Paola L, Quaresima B, Faniello MC, Fersini G, Gasparro S, Fabiani G, Driul L, D’Elia A, Casarsa S et al. (2003) A novel Q3034R *BRCA2* germline mutation identified in a fallopian tube cancer patient. *Cancer Lett* 191:211–214.

- Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP (2011) A continuum model for tumour suppression. *Nature* 476:163–169.
- Bergthorsson JT, Ejlersen B, Olsen JH, Borg A, Nielsen K V, Barkardottir RB, Klausen S, Mouridsen HT, Winther K, Fenger K et al. (2001) *BRCA1* and *BRCA2* mutation status and cancer family history of Danish women affected with multifocal or bilateral breast cancer at a young age *Jornal MedicineGenetic* 6:361–368.
- Biswas K, Das R, Eggington JM, Qiao H, North SL, Stauffer S, Burkett SS, Martin BK, Southon E, Sizemore SC et al. (2012) Functional evaluation of *BRCA2* variants mapping to the PALB2-binding and C-terminal DNA-binding domains using a mouse ES cell-based assay. *Hum Mol Genet* 21:3993–4006.
- Blumen H, Fitch K, Polkus V (2016) Comparison of Treatment Costs for Breast Cancer, by Tumor Stage and Type of Service. *Am Health Drug Benefits* 9: 23–32.
- Bogdanova N, Sokolenko AP, Iyevleva AG, Alysheva SN, Blaut M, Bremer M, Christiansen H, Rave-Fränk M, Dörk T, Imyanitov EN (2011) *PALB2* mutations in German and Russian patients with bilateral breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 126:545–550.
- Bose S (2015) Triple-negative Breast Carcinoma: Morphologic and Molecular Subtypes. *Adv Anat Pathol* 22:306–313.
- Brand R, Borazanci E, Speare V, Dudley B, Karloski E, Peters MLB, Stobie L, Bahary N, Zeh H, Zureikat A et al. (2018) Prospective study of germline genetic testing in incident cases of pancreatic adenocarcinoma. *Cancer* 124:3520–3527.
- Brandão RD, Van Roozendaal K, Tserpelis D, García EG, Blok MJ (2011) Characterisation of unclassified variants in the *BRCA1/2* genes with a putative effect on splicing. *Breast Cancer Res Treat* 129:971–982.
- Brosh RM, Cantor SB (2014) Molecular and cellular functions of the FANCD1 DNA helicase defective in cancer and in Fanconi anemia. *Front Genet* 5:1–14.
- Brzovic PS, Meza J, King MC and Klevit RE (1998) The cancer-predisposing mutation C61G disrupts homodimer formation in the NH2-terminal *BRCA1* RING finger domain. *J Biol Chem* 273:7795–7799.
- Caleca L, Putignano AL, Colombo M, Congregati C, Sarkar M, Magliery TJ, Ripamonti CB, Foglia C, Peissel B, Zaffaroni D et al. (2014) Characterization of an Italian Founder Mutation in the RING-Finger Domain of *BRCA1*. *Plos One* 9: e86924.
- Campuzano O, Sarquella-Brugada G, Fernandez-Falgueras A, Coll M, Iglesias A, Ferrer-Costa C, Cesar S, Arbelo E, García-Álvarez A, Jordà P et al. (2020) Reanalysis and reclassification of rare genetic variants associated with inherited arrhythmogenic syndromes. *EBioMedicine* 54:102732.
- Carraro DM, Aparecida M, Koike A, Cristina B, Lisboa G, Helena E, Olivieri R, Cristina A, Krepischi V, Carvalho AF De et al. (2013) Comprehensive Analysis of *BRCA1*, *BRCA2* and *TP53* Germline Mutation and Tumor Characterization: A Portrait of Early-Onset Breast Cancer in Brazil. *PLoS One* 8(3):7–9.
- Casadei S, Norquist BM, Walsh T, Stray S, Mandell JB, Lee MK, Stamatoyannopoulos JA, King MC (2011) Contribution of inherited mutations in the *BRCA2*-interacting protein *PALB2* to familial breast cancer. *Cancer Res* 71:2222–2229.
- Casaril CC (2017) the Social-Spatial Formation of the Southwest of Paraná. *Mercator* 16:1–20.
- Castilla LH, Couch FJ, Erdos MR, Hoskins KF, Calzone K, Garber JE, Boyd J, Lubin MB, Deshano ML, Brody LC et al. (1994) Mutations in the *BRCA1* gene in families with early-onset breast and ovarian cancer. *Nat Genet* 8:387–391.
- Caswell-Jin JL, Gupta T, Hall E, Petrovchich IM, Mills MA, Kingham KE, Koff R, Chun NM, Levonian P, Lebensohn AP et al. (2018) Racial/ethnic differences in multiple-gene sequencing results for hereditary cancer risk. *Genet Med* 20:234–239.

- Cha YJ, Kim HM, Koo JS (2017) Expression of lipid metabolism-related proteins differs between invasive lobular carcinoma and invasive ductal carcinoma. *Int J Mol Sci* 18:232-246.
- Cherbal F, Bakour R, Adane S, Boualga K, Benais-Pont G, Maillat P (2010) *BRCA1* and *BRCA2* germline mutations screening in Algerian breast/ovarian cancer families. *Dis Markers* 28:377–384.
- Couch FJ, Nathanson KL, Offit K (2014) Two Decades After BRCA: Setting Paradigms in Personalized Cancer Care and Prevention. *Science* 343:1466–1470.
- Csokay B, Tihomirova L, Stengrevics A, Sinicka O, Olah E (1999) Strong founder effects in *BRCA1* mutation carrier breast cancer patients from Latvia. *Mutation in brief no.258*. Online. *Hum Mutat* 14:92-96.
- Cybulski C, Wokołorczyk D, Jakubowska A, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, Masojć B, Dębniak T, Górski B, Blecharz P et al. (2011) Risk of breast cancer in women with a *CHEK2* mutation with and without a family history of breast cancer. *J Clin Oncol* 29:3747–3752.
- Carvalho C S, Cury NM, Brotto DB, De Araujo LF, Rosa RCA, Texeira LA, Praça JR, Marques AA, Peronni KC, Ruy PDC et al. (2020) Germline variants in DNA repair genes associated with hereditary breast and ovarian cancer syndrome: Analysis of a 21 gene panel in the Brazilian population. *BMC Med Genomics* 13:21-24.
- Dameri M, Ferrando L, Cirmena G, Vernieri C, Pruneri G, Ballestrero A, Zoppoli G (2021) Multi-gene testing overview with a clinical perspective in metastatic triple-negative breast cancer. *Int J Mol Sci* 13:7154-7178.
- De Juan I, Palanca S, Domenech A, Feliubadaló L, Segura Á, Osorio A, Chirivella I, de la Hoya M, Sánchez AB, Infante M et al. (2015) *BRCA1* and *BRCA2* mutations in males with familial breast and ovarian cancer syndrome. Results of a Spanish multicenter study. *Fam Cancer* 14:505–513.
- De Leeneer K, de Schrijver J, Clement L, Baetens M, Lefever S, de Keulenaer S, van Criekinge W, Deforce D, van Nieuwerburgh F, Bekaert S et al. (2011) Practical tools to implement massive parallel pyrosequencing of PCR products in next generation molecular diagnostics. *PLoS One* 6:1–7.
- De Souza Timoteo AR, Gonçalves AÉMM, Sales LAP, Albuquerque BM, de Souza JES, de Moura PCP, de Aquino MAA, Agnez-Lima LF, Lajus TBP (2018) A portrait of germline mutation in Brazilian at-risk for hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 172:637–646.
- Den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, Hart RK, Greenblatt MS, McGowan-Jordan J, Roux AF, Smith T, Antonarakis SE, Taschner PEM (2016) HGVS Recommendations for the Description of Sequence Variants: 2016 Update. *Hum Mutat* 37:564–569.
- Deng H, Chen M, Guo X, Heng J, Xu X, Peng L, Jiang H, Li G, Day JX, Li J et al. (2019) Comprehensive analysis of serum tumor markers and *BRCA1/2* germline mutations in Chinese ovarian cancer patients. *Mol Genet Genomic Med* 7:e672.
- Desmond A, Kurian AW, Gabree M, Mills MA, Anderson MJ, Kobayashi Y, Horick N, Yang S, Shannon KM, Tung N et al. (2015) Clinical actionability of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer risk assessment. *JAMA Oncol* 1:943–951.
- Domchek SM (2010) Association of Risk-Reducing Surgery in Mutation Carriers with Cancer Risk and Mortality. *JAMA* 304:967.
- Dossus L, Benusiglio PR (2015) Lobular breast cancer: incidence and genetic and non-genetic risk factors. *Breast Cancer Res* 17:30-37.
- Dufloth RM, Carvalho S, Heinrich JK, Shinzato JY, dos Santos CC, Zeferino LC and Schmitt F (2005) Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. *Sao Paulo Med J* 123:192–197.

- Dullens B, de Putter R, Lambertini M, Toss A, Han S, Van Nieuwenhuysen E, Van Gorp T, Vanderstichele A, Van Ongeval C, Keupers M et al. (2020) Cancer Surveillance in Healthy Carriers of Germline Pathogenic Variants in *BRCA1/2*: A Review of Secondary Prevention Guidelines. *J Oncol* 2020:1–13.
- Easton DF, Pharoah PDP, Antoniou AC, Tischkowitz M, Tavtigian S V., Nathanson KL, Devilee P, Meindl A, Couch FJ, Southey M et al. (2015) Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. *N Engl J Med* 372:2243–2257.
- Elsakov P, Kurtinaitis J, Petraitis S, Ostapenko V, Razumas M, Razumas T, Meskauskas R, Petrulis K, Luksite A, Lubiński J et al. (2010) The contribution of founder mutations in *BRCA1* to breast and ovarian cancer in Lithuania. *Clin Genet* 78:373–376.
- Eroles P, Bosch A, Alejandro Pérez-Fidalgo J, Lluch A (2012) Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev* 38:698–707.
- Esposito MV, Minopoli G, Esposito L, D’Argenio V, Di Maggio F, Sasso E, D’Aiuto M, Zambrano N, Salvatore F (2019) A Functional Analysis of the Unclassified Pro2767Ser *BRCA2* Variant Reveals Its Potential Pathogenicity that Acts by Hampering DNA Binding and Homology-Mediated DNA Repair. *Cancers (Basel)* 11:1450-1454.
- Esteves VF, Thuler LCS, Amêndola LC, Koifman RJ, Koifman S, Frankel PP, Vieira RJS (2009) Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations in families with medium and high risk of breast and ovarian cancer in Brazil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 42:453–457.
- Ewald IP, Cossio SL, Palmero EI, Pinheiro M, Nascimento IL de O, Machado TMB, Sandes KA, Toralles B, Garicochea B, Izetti P et al. (2016) *BRCA1* and *BRCA2* rearrangements in Brazilian individuals with hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *Genet Mol Biol* 39:223–231.
- Ewald IP, Izetti P, Vargas FR, Moreira MA, Moreira AS, Moreira-Filho CA, Cunha DR, Hamaguchi S, Camey SA, Schmidt A et al. (2011) Prevalence of the *BRCA1* founder mutation c.5266dup in Brazilian individuals at-risk for the hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *Hered Cancer Clin Pract* 9:1-12.
- Engbrecht J, Brent R, Kaderbhai MA 2001. Minipreps of plasmid DNA. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 1:Unit1.6.
- Fanale D, Fiorino A, Incorvaia L, Dimino A, Filorizzo C, Bono M, Cancelliere D, Calò V, Brando C, Corsini LR et al. (2021) Prevalence and Spectrum of Germline *BRCA1* and *BRCA2* Variants of Uncertain Significance in Breast/Ovarian Cancer: Mysterious Signals from the Genome. *Front Oncol* 11:1–12.
- Felix GES, Abe-Sandes C, Machado-Lopes TMB, Bomfim TF, Guindalini RSC, Santos VCS, Meyer L, Oliveira PC, Neiva JC, Meyer R et al. (2014) Germline mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* and *TP53* in patients at high-risk for HBOC: Characterizing a Northeast Brazilian Population. *Hum Genome Var* 1:1–8.
- Fernandes GC, Michelli RA, Galvão HC, Paula AE, Pereira R, Andrade CE, Felício PS, Souza CP, Mendes DR, Volc S et al. (2016) Prevalence of *BRCA1/BRCA2* mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. *Oncotarget* 7:80465–80481.
- Fischer NW, Prodeus A, Gariépy J (2018) Survival in males with glioma and gastric adenocarcinoma correlates with mutant p53 residual transcriptional activity. *JCI insight* 3:1–14.
- Foo TK, Tischkowitz M, Simhadri S, Boshari T, Zayed N, Burke KA, Berman SH, Bleuca P, Riaz N, Huo Y et al. (2017) Compromised *BRCA1*–*PALB2* interaction is associated with breast cancer risk. *Oncogene* 36:4161–4170.
- Foretova L, Machackova E, Navratilova M, Pavlu H, Hrubá M, Lukesova M, Valik D (2004) *BRCA1* and *BRCA2* mutations in women with familial or early-onset breast/ovarian

- cancer in the Czech Republic. *Hum Mutat* 23:397–398.
- Fostira F, Tsitlaidou M, Papadimitriou C, Fountzilas G (2012) Prevalence of *BRCA1* mutations among 403 women with triple- negative breast cancer: implications for genetic screening selection criteria: a Hellenic Cooperative Oncology Group Study. *Breast Cancer Res Treat* 134:353-362.
- Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King M-C (1994) Confirmation of *BRCA1* by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet* 8:399–404.
- Friend SH, Bernards R, Rogelj S, Weinberg RA, Rapaport JM, Albert DM, Dryja TP (1986) A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323:643–646.
- Gabaldó Barrios X, Sarabia Meseguer MD, Marín Vera M, Sánchez Bermúdez AI, Macías Cerrolaza JA, Sánchez Henarejos P, Zafra Poves M, García Hernández MR, Cuevas Tortosa E, Aliaga Baño Á et al. (2017) Molecular characterization and clinical interpretation of *BRCA1/BRCA2* variants in families from Murcia (south-eastern Spain) with hereditary breast and ovarian cancer: clinical–pathological features in *BRCA* carriers and non-carriers. *Fam Cancer* 16:477–489.
- Gomes MCB, Costa MM, Borojevic R, Monteiro ANA, Vieira R, Koifman S, Koifman RJ, Li S, Royer R, Zhang S et al. (2007) Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in breast cancer patients from Brazil. *Breast Cancer Res Treat* 103:349–353.
- Gomes R, Spinola P da S, Brant AC, Matta BP, Nascimento CM, de Aquino Paes SM, Bonvicino CR, dos Santos ACE and Moreira MAM (2021) Prevalence of germline variants in consensus moderate-to-high-risk predisposition genes to hereditary breast and ovarian cancer in *BRCA1/2*-negative Brazilian patients. *Breast Cancer Res Treat* 185:851–861.
- Gorodetska I, Kozeretska I and Dubrovskaja A (2019) *BRCA* Genes: The Role in Genome Stability, Cancer Stemness and Therapy Resistance. *J Cancer* 10:2109–2127.
- Górski B (2006) Selected aspects of molecular diagnostics of constitutional alterations in *BRCA1* and *BRCA2* genes associated with increased risk of breast cancer in the Polish population. *Hered Cancer Clin Pract* 4:142–152.
- Greenblatt MS, Chappuis PO, Bond JP, Hamel N and Foulkes WD (2001) *TP53* Mutations in Breast Cancer Associated with *BRCA1* or *BRCA2* Germ-line Mutations: Distinctive Spectrum and Structural Distribution 1. *Cancer Research* 10:4092–4097.
- Grzybowska E, Zientek H, Jasinska A, Rusin M, Kozłowski P, Sobczak K, Sikorska A, Kwiatkowska E, Gorniak L, Kalinowska E et al. (2000) High frequency of recurrent mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes in Polish families with breast and ovarian cancer. *Hum Mutat* 16:482–490.
- Håkansson S, Johannsson O, Johannsson U, Sellberg G, Loman N, Gerdes A M, Holmberg E, Dahl N, Pandis N, Kristofferson U et al. (1997) Moderate frequency of *BRCA1* and *BRCA2* germ-line mutations in Scandinavian familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 60:1068–1078.
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144:646–674.
- Hellebrand H, Sutter C, Honisch E, Gross E, Wappenschmidt B, Schem C, Deißler H, Ditsch N, Gress V, Kiechle M et al. (2011) Germline mutations in the *PALB2* gene are population specific and occur with low frequencies in familial breast cancer. *Hum Mutat* 32:E2176-2188.
- Hettmer S, Archer NM, Somers GR, Novokmet A, Wagers AJ, Diller L, Rodriguez-Galindo C, Teot LA, Malkin D (2014) Anaplastic rhabdomyosarcoma in *TP53* germline mutation carriers. *Cancer* 120:1068–1075.

- Hoyer J, Vasileiou G, Uebe S, Wunderle M, Kraus C, Fasching PA, Thiel CT, Hartmann A, Beckmann MW, Lux MP et al. (2018) Addition of triple negativity of breast cancer as an indicator for germline mutations in predisposing genes increases sensitivity of clinical selection criteria. *BMC Cancer* 18:920-926.
- Hu C, Polley EC, Yadav S, Lilyquist J, Shimelis H, Na J, Hart SN, Goldgar DE, Shah S, Pesaran T et al. (2020) The Contribution of Germline Predisposition Gene Mutations to Clinical Subtypes of Invasive Breast Cancer from a Clinical Genetic Testing Cohort. *JNCI J Natl Cancer Inst* 112:1231–1241.
- Humphrey JS, Salim A, Erdos MR, Collins FS, Brody LC, Klausner RD (1997) Human *BRCA1* inhibits growth in yeast: potential use in diagnostic testing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:5820–5825.
- Hurst JH (2014) Pioneering geneticist Mary-Claire King receives the 2014 Lasker~Koshland Special Achievement Award in Medical Science. *J Clin Invest* 124:4148–4151.
- Jakimovska M, Kostovska IM, Popovska-Jankovic K, Kubelka-Sabit K, Karadjozov M, Stojanovska L, Arsovski A, Smichkoska S, Lazarova E, Dimitrovska MJ et al. (2018) *BRCA1* and *BRCA2* germline variants in breast cancer patients from the Republic of Macedonia. *Breast Cancer Res Treat* 168:745–753.
- Jara L, Ampuero S, Santibáñez E, Seccia L, Rodríguez J, Bustamante M, Lay-son G, Ojeda JM, Reyes JM, Blanco R (2004) Molecular analysis of the eighteen most frequent cancer families. *Biol Research* 1:469–481.
- Johannsson O, Ostermeyer EA, Håkansson S, Friedman LS, Johannsson U, Sellberg G, Brøndum-Nielsen K, Sele V, Olsson H, King MC et al. (1996) Founding *BRCA1* mutations in hereditary breast and ovarian cancer in Southern Sweden. *Am J Hum Genet* 58:441–450.
- Jagadeesh K, Wenger, A, Berger M, Guturu H, Stenson P, Cooper D, Bernstein J, Bejerano, G (2016) M-CAP eliminates a majority of variants with uncertain significance in clinical exomes at high sensitivity. *Nature Genetics* 12:1581-1586.
- Kadri MSN, Patel KM, Bhargava PA, Shah FD, Badgujar NV, Tarapara B V, Patel PS, Shaikh MI, Shah K, Patel A et al. (2021) Mutational Landscape for Indian Hereditary Breast and Ovarian Cancer Cohort Suggests Need for Identifying Population Specific Genes and Biomarkers for Screening. *Front Oncol* 10:1–10.
- Kawale AS, Sung P (2020) Mechanism and significance of chromosome damage repair by homologous recombination. *Essays Biochem* 64:779–790.
- Kim C, Baker J, Ph D, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller W, Fisher ER et al. (2004) A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 351:2817–26.
- Kluz T, Jasiewicz A, Marczyk E, Jach R, Jakubowska A, Lubiński J, Narod SA, Gronwald J (2018) Frequency of *BRCA1* and *BRCA2* causative founder variants in ovarian cancer patients in South-East Poland. *Hered Cancer Clin Pract* 16:6–9.
- Kote-Jarai Z, Leongamornlert D, Saunders E, Tymrakiewicz M, Castro E, Mahmud N, Guy M, Edwards S, O'Brien L, Sawyer E et al. (2011) *BRCA2* is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: Implications for genetic testing in prostate cancer patients. *Br J Cancer* 105:1230–1234.
- Kowalik A, Siołek M, Kocpczy J, Krawiec K, Kalisz J, Zi S, Kozak-klonowska B, Furma J, Nowak-ozimek E, Chłopek M et al. (2018) *BRCA1* founder mutations and beyond in the Polish population: A single-institution *BRCA1/2* next-generation sequencing study. *PLoS One* 13:1–14.
- Kwong A, Chen JW, Shin VY (2016) A new paradigm of genetic testing for hereditary breast/ovarian cancers. *Hong Kong Med J* 22:171–177.
- Lee SB, Kim SH, Bell DW, Wahrer DCR, Schiripo TA, Jorczak MM, Shannon KM, Harlow

- E, Haber DA, SgROI DC et al. (2001) Destabilization of *CHEK2* by a missense mutation associated with Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res* 61:8062–8067.
- Lener MR, Kashyap A, Kluźniak W, Cybulski C, Soluch A, Pietrzak S, Huzarski T, Gronwald J and Lubiński J (2017) The prevalence of founder mutations among individuals from families with familial pancreatic cancer syndrome. *Cancer Res Treat* 49:430–436.
- Li X, Liang C, Yang Y, Liu L, Du Y, Liang H, Li L, Zhang B, Li J, Zhao J (2018) No association between HMGB1 polymorphisms and cancer risk: evidence from a meta-analysis *Bioscience Reports* 38:1–11.
- Lourenço JJ, Vargas FR, Bines J, Santos EM, Lasmar CAP, Costa CH, Teixeira EMB, Maia MCM, Coura F, Silva CHD et al. (2004) *BRCA1* mutations in Brazilian patients *Human and Medical Genetics* 504:500–504.
- Lu K, Smith M, Kanderi T, Verbiar J, Laspe, J, Bair L, Torp L (2021) Genetic Variation and the Role of Multigene Panel Testing for Hereditary Breast Cancer: A Single-Institution Experience. *Cureus* 13:4–8.
- Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T (2008) Hereditary colorectal cancer syndromes: Molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer* 7:27–39.
- Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- Luo Y, Batalao A, Zhou H, Zhu L (1997) Mammalian two-hybrid system: a complementary approach to the yeast two-hybrid system. *Biotechniques* 22:350–352.
- Machackova E, Foretova L, Lukesova M, Vasickova P, Navratilova M, Coene I, Pavlu H, Kosinova V, Kuklova J, Claes K (2008) Spectrum and characterisation of *BRCA1* and *BRCA2* deleterious mutations in high-risk Czech patients with breast and/or ovarian cancer. *BMC Cancer* 8:1–11.
- Marchina E, Fontana MG, Speziani M, Salvi A, Ricca G, Di Lorenzo D, Gervasi M, Caimi L, Barlati S (2010) *BRCA1* and *BRCA2* genetic test in high risk patients and families: counselling and management. *Oncol Rep* 24:1661–1667.
- Masciari S, Dillon DA, Rath M, Robson M, Weitzel JN, Balmana J, Gruber SB, Ford JM, Euhus D, Lebensohn A et al. (2012) Breast cancer phenotype in women with *TP53* germline mutations: A Li-Fraumeni syndrome consortium effort. *Breast Cancer Res Treat* 133:1125–1130.
- McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GRS, Thormann A, Flicek P, Cunningham F (2016) The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol* 17:1–14.
- Meisel C, Sadowski CE, Kohlstedt D, Keller K, Stäritz F, Grübling N, Becker K, Mackenroth L, Rump A, Schröck E et al. (2017) Spectrum of genetic variants of *BRCA1* and *BRCA2* in a German single center study. *Arch Gynecol Obstet* 295:1227–1238.
- Merajver SD, Pham TM, Caduff RF, Chen M, Poy EL, Cooney K a, Weber BL, Collins FS, Johnston C, Frank TS (1995) Somatic mutations in the *BRCA1* gene in sporadic ovarian tumours. *Nat Genet* 9:439–443.
- Meyer P, Voigtlaender T, Bartram CR, Klaes R (2003) Twenty-three novel *BRCA1* and *BRCA2* sequence alterations in breast and/or ovarian cancer families in Southern Germany. *Hum Mutat* 22:250–259.
- Meyer R, Kopanos C, Albarca Aguilera M, Tsiolkas V, Massouras A, Kouris A, Chapple CE (2018) VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics* 2:1–3.
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W (1994) A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene *BRCA1*. *Science* 266:66–71.
- Momozawa Y, Iwasaki Y, Parsons MT, Kamatani Y, Takahashi A, Tamura C, Katagiri T,

- Yoshida T, Nakamura S, Sugano K et al. (2018) Germline pathogenic variants of 11 breast cancer genes in 7,051 Japanese patients and 11,241 controls. *Nat Commun* 9:4–6.
- Nagai MA, Schaer Barbosa H, Zago MA, Araújo Silva W, Nishimoto IN, Salaorni S, Guerreiro Costa LNF, Silva Araújo M, Caldas Oliveira AG, Mourão Neto M et al. (2003) *TP53* mutations in primary breast carcinomas from white and African-Brazilian patients. *Int J Oncol* 23:189–196.
- Nakamura S, Takahashi M, Tozaki M, Nakayama T, Nomizu T, Miki Y, Murakami Y, Aoki D, Iwase T, Nishimura S et al. (2015) Prevalence and differentiation of hereditary breast and ovarian cancers in Japan. *Breast Cancer* 22:462–468.
- Negrini S, Gorgoulis VG, Halazonetis TD (2010) Genomic instability — an evolving hallmark of cancer *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:220–228.
- Negură L, Uhrhammer N, Negură A, Arteni V, Carasevici E, Bignon YJ (2010) Complete BRCA mutation screening in breast and ovarian cancer predisposition families from a North-Eastern Romanian population. *Fam Cancer* 9:519–523.
- Nepomuceno TC, Carvalho MA, Rodrigue A, Simard J, Masson JY, Monteiro ANA (2020) PALB2 Variants: Protein Domains and Cancer Susceptibility. *Trends in Cancer* 1–10.
- Nepomuceno TC, De Gregoriis G, de Oliveira FMB, Suarez-Kurtz G, Monteiro AN, Carvalho MA (2017) The role of *PALB2* in the DNA damage response and cancer predisposition. *Int J Mol Sci* 18:1–20.
- Ngeow J, Eng C (2016) Precision medicine in heritable cancer: When somatic tumour testing and germline mutations meet. *npj Genomic Med* 1:2015–2017.
- Nielsen FC, van Overeem Hansen T, Sørensen CS (2016) Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. *Nat Rev Cancer* 16:599–612.
- Bogedanovă Nv, Nn A, Yi R, Jh K (2010) High frequency and allele-specific differences of *BRCA1* founder mutations in breast cancer and ovarian cancer patients from Belarus. *Clin Genet* 78:364–372.
- Neumann E, Schaefer-ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1:841–845.
- Obeng-Gyasi S, Ong C, Hwang ES (2016) Contemporary management of ductal carcinoma in situ and lobular carcinoma in situ. *Chinese Clin Oncol* 5:32–32.
- Palmero EI, Alemar B, Schüler-Faccini L, Hainaut P, Moreira-Filho CA, Ewald IP, Dos Santos PK, Ribeiro PLI, De Oliveira Netto CB, Kelm FLC et al. (2016) Screening for germline *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* and *CHEK2* mutations in families at-risk for hereditary breast cancer identified in a population-based study from Southern Brazil. *Genet Mol Biol* 39:210–222.
- Park JS, Nam EJ, Park HS, Han JW, Lee JY, Kim J, Kim T II, Lee ST (2017) Identification of a novel *BRCA1* pathogenic mutation in Korean patients following reclassification of *BRCA1* and *BRCA2* variants according to the ACMG standards and guidelines using relevant ethnic controls. *Cancer Res Treat* 49:1012–1021.
- Patel VL, Busch EL, Friebel TM, Cronin A, Leslie G, McGuffog L, Adlard J, Agata S, Agnarsson BA, Ahmed M et al. (2020) Association of genomic domains in *BRCA1* and *BRCA2* with prostate cancer risk and aggressiveness. *Cancer Res* 80:624–638.
- Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, Zhao W, Yilmaz A, Miller K, Bacher J, Bigley C, Nelsen L, Goodfellow PJ et al. (2017) Prevalence and spectrum of germline cancer susceptibility gene mutations among patients with early-onset colorectal cancer. *JAMA Oncol* 3:464–471.
- Pellegrino B, Musolino A, Llop-Guevara A, Serra V, De Silva P, Hlavata Z, Sangiolo D, Willard-Gallo K, Solinas C (2020) Homologous Recombination Repair Deficiency and the Immune Response in Breast Cancer: A Literature Review. *Transl Oncol* 13:410–422.

- Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy F de SG, Kohlrausch F, Magno LAV, Montenegro RC, Moraes MO et al. (2011) The Genomic Ancestry of Individuals from Different Geographical Regions of Brazil Is More Uniform Than Expected. *PLoS One* 6:e17063.
- Perkowska M, BroZek I, Wysocka B, Haraldsson K, Sandberg T, Johansson U, Sellberg G, Borg A, Limon J (2003) *BRCA1* and *BRCA2* mutation analysis in breast-ovarian cancer families from northeastern Poland. *Hum Mutat* 21:553–554.
- Piccinin C, Panchal S, Watkins N, Kim RH (2019) An update on genetic risk assessment and prevention: the role of genetic testing panels in breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* 19:787–801.
- Piccioletto N De, Cacheux W, Roth A, Chappuis PO, Labidi-galy SI (2016) Critical Reviews in Oncology / Hematology Ovarian cancer: Status of homologous recombination pathway as a predictor of drug response. 101:50–59.
- Pohlreich P, Zikan M, Stribrna J, Kleibl Z, Janatova M, Kotlas J, Zidovska J, Novotny J, Petruzalka L, Szabo C et al. (2005) High proportion of recurrent germline mutations in the *BRCA1* gene in breast and ovarian cancer patients from the Prague area. *Breast Cancer Res* 7:R728-36.
- Prakash R, Zhang Y, Feng W, Jasin M (2015) Homologous Recombination and Human Health. *Perspect Biol* 1–29.
- Prat A, Adamo B, Fan C, Peg V, Vidal M, Galván P, Vivancos A, Nuciforo P, Palmer HG, Dawood S et al. (2013) Genomic Analyses across Six Cancer Types Identify Basal-like Breast Cancer as a Unique Molecular Entity. *Sci Rep* 3:3040-3544.
- Provenzano E, Ulaner GA, Chin SF (2018) Molecular Classification of Breast Cancer. *PET Clin* 13:325–338.
- Pukkala E, Kesminiene A, Poliakov S, Ryzhov A, Drozdovitch V, Kovgan L, Kyyrönen P, Malakhova I V., Gulak L, Cardis E (2006) Breast cancer in Belarus and Ukraine after the Chernobyl accident. *Int J Cancer* 119:651–658.
- Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D (1997) Improved Splice. *J Comput Biol* 4:311–323.
- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E et al. (2015) 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* 17:405–423.
- Rizzarda AD (2018) Um olhar valioso sobre a terra: Sudoeste do Paraná 1930-1940. *Ágora* 20:90-94.
- Roy R, Chun J, Powell SN (2012) *BRCA1* and *BRCA2*: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* 12:68–78.
- Rummel S, Varner E, Shriver CD, Ellsworth RE (2013) Evaluation of *BRCA1* mutations in an unselected patient population with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 137:119–125.
- Sadeghi F, Asgari M, Matloubi M, Ranjbar M, Karkhaneh Yousefi N, Azari T, Zaki-Dizaji M (2020) Molecular contribution of *BRCA1* and *BRCA2* to genome instability in breast cancer patients: Review of radiosensitivity assays. *Biol Proced Online* 22:1–28.
- Santa R, Guindalini C, Viana DV, Paulo J, Whitaker F, Rocha VM, Verónica R, López M, Zheng Y, Freitas É et al. (2022) Detection of germline variants in Brazilian breast cancer patients using multigene panel testing. *Sci Rep* 1–12.
- Schayek H, De Marco L, Starinsky-Elbaz S, Rossette M, Laitman Y, Bastos-Rodrigues L, da Silva Filho AL, Friedman E (2016) The rate of recurrent *BRCA1*, *BRCA2*, and *TP53* mutations in the general population, and unselected ovarian cancer cases, in Belo

- Horizonte, Brazil. *Cancer Genet* 209:50–52.
- Schon K, Tischkowitz M (2018) Clinical implications of germline mutations in breast cancer: TP53. *Breast Cancer Res Treat* 167:417–423.
- Scully R, Panday A, Elango R, Willis NA (2019) DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* volume 20:698–714.
- Serova-Sinilnikova OM, Boutrand L, Stoppa-Lyonnet D, Bressac-de-Paillerets B, Dubois V, Lasset C, Janin N, Bignon YJ, Longy M, Maugard C et al. (1997) *BRCA2* mutations in hereditary breast and ovarian cancer in France. *Am J Hum Genet* 60:1236–9.
- Serova O, Montagna M, Torchard D, Narod SA, Tonin P, Sylla B, Lynch HT, Feunteun J, Lenoir GM (1996) A high incidence of *BRCA1* mutations in 20 breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 58:42–51.
- Serova OM, Mazoyer S, Puget N, Dubois V, Tonin P, Shugart YY, Goldgar D, Narod SA, Lynch HT, Lenoir GM (1997) Mutations in *BRCA1* and *BRCA2* in breast cancer families: Are there more breast cancer-susceptibility genes? *Am J Hum Genet* 60:486–495.
- Shen L, Zhang S, Wang K, Wang X (2021) Familial Breast Cancer: Disease Related Gene Mutations and Screening Strategies for Chinese Population. *Front Oncol* 11:1–19.
- Shenoy S (2019) *CDH1* (E-cadherin) mutation and gastric cancer: Genetics, molecular mechanisms and guidelines for management. *Cancer Manag Res* 11:10477–10486.
- Shimelis H, LaDuca H, Hu C, Hart SN, Na J, Thomas A, Akinhanmi M, Moore RM, Brauch H, Cox A et al. (2018) Triple-Negative Breast Cancer Risk Genes Identified by Multigene Hereditary Cancer Panel Testing. *JNCI J Natl Cancer Inst* 110:1–8.
- Silva FC, Lisboa BCG, Figueiredo MCP, Torrezan GT, Santos ÉMM, Krepschi AC, Rossi BM, Achatz MI, Carraro DM (2014a) Hereditary breast and ovarian cancer: Assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. *BMC Med Genet* 15:1–11.
- Silva FC, Lisboa BCG, Figueiredo MCP, Torrezan GT, Santos ÉMM, Krepschi AC, Rossi Slater EP, Langer P, Niemczyk E, Strauch K, Butler J, Habbe N, Neoptolemos JP, Greenhalf W, Bartsch DK (2010) *PALB2* mutations in European familial pancreatic cancer families. *Clin Genet* 78:490–494.
- Slavin TP, Maxwell KN, Lilyquist J, Vijai J, Neuhausen SL, Hart SN, Ravichandran V, Thomas T, Maria A, Villano D et al. (2017) The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. *npj Breast Cancer* 3:10–22.
- Smith SE, Mellor P, Ward AK, Kendall S, McDonald M, Vizeacoumar FS, Vizeacoumar FJ, Napper S, Anderson DH (2017) Molecular characterization of breast cancer cell lines through multiple omic approaches. *Breast Cancer Res* 19:1–12.
- Stadler ZK, Schrader KA, Vijai J, Robson ME, Offit K (2014) Cancer Genomics and Inherited Risk. *J Clin Oncol* 32:687–698.
- Steinmann D, Bremer M, Rades D, Skawran B, Siebrands C, Karstens JH, Dörk T (2001) Mutations of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in patients with bilateral breast cancer. *Br J Cancer* 85:850–858.
- Stolarova L, Kleiblova P, Janatova M, Soukupova J, Zemankova P, Macurek L, Kleibl Z (2020) *CHEK2* Germline Variants in Cancer Predisposition: Stalemate Rather than Checkmate. *Cells* 12:2670-2675.
- Strom CM, Rivera S, Elzinga C, Angeloni T, Rosenthal SH, Goos-Root D, Siaw M, Platt J, Braastadt C, Cheng L et al. (2015) Development and validation of a next-generation sequencing assay for *BRCA1* and *BRCA2* variants for the clinical laboratory. *PLoS One* 10:1–16.
- Stucci LS, Internò V, Tucci M, Perrone M, Mannavola F, Palmirotta R, Porta C (2021) The

- atm gene in breast cancer: Its relevance in clinical practice. *Genes* 2:720-727.
- Szwiec M, Jakubowska A, Górski B, Huzarski T, Tomiczek-Szwiec J, Gronwald J, Debniak T, Byrski T, Kluźniak W, Wokołorczyk D et al. (2015) Recurrent mutations of *BRCA1* and *BRCA2* in Poland: An update. *Clin Genet* 87:288–292.
- Tavtigian S V., Oefner PJ, Babikyian D, Hartmann A, Healey S, Le Calvez-Kelm F, Lesueur F, Byrnes GB, Chuang SC, Forey N et al. (2009) Rare, Evolutionarily Unlikely Missense Substitutions in ATM Confer Increased Risk of Breast Cancer. *Am J Hum Genet* 85:427–446.
- Tedaldi G, Tebaldi M, Zampiga V, Danesi R, Arcangeli V, Ravegnani M, Cangini I, Pirini F, Petracci E, Rocca A et al. (2017) Multiple-gene panel analysis in a case series of 255 women with hereditary breast and ovarian cancer. *Oncotarget* 8:47064–47075.
- Trujillano D, Weiss MER, Schneider J, Köster J, Papachristos EB, Saviouk V, Zakharkina T, Nahavandi N, Kovacevic L, Rolfs A (2015) Next-generation sequencing of the *BRCA1* and *BRCA2* genes for the genetic diagnostics of hereditary breast and/or ovarian cancer. *J Mol Diagnostics* 17:162–170.
- Turchiano A, Loconte DC, De Nola R, Arezzo F, Chiarello G, Pantaleo A, Iacoviello M, Bagnulo R, De Luisi A, Perrelli S et al. (2022) Beyond *BRCA1/2*: Homologous Recombination Repair Genetic Profile in A Large Cohort of Apulian Ovarian Cancers. *Cancers (Basel)* 14:1–14.
- Uglanitsa N, Oszurek O, Uglanitsa K, Savonievich E (2010) The contribution of founder mutations in *BRCA1* to breast cancer in Belarus. *Clin Genet* 78: 377–380.
- Villarreal-Garza C, Weitzel JN, Llacuachaqui M, Sifuentes E, Magallanes-Hoyos MC, Gallardo L, Alvarez-Gómez RM, Herzog J, Castillo D, Royer R et al. (2015) The prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* mutations among young Mexican women with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 150:389–94.
- Wagner TMU, Möslinger RA, Muhr D, Langbauer G, Hirtenlehner K, Concin H, Doeller W, Haid A, Lang AH, Mayer P et al. (1998) *BRCA1*-related breast cancer in Austrian breast and ovarian cancer families: Specific *BRCA1* mutations and pathological characteristics. *Int J Cancer* 77:354–360.
- Wen WX, Allen J, Lai KN, Mariapun S, Hasan SN, Ng PS, Lee DSC, Lee SY, Yoon SY, Lim J et al. (2018) Inherited mutations in *BRCA1* and *BRCA2* in an unselected multiethnic cohort of Asian patients with breast cancer and healthy controls from Malaysia. *J Med Genet* 55:97–103.
- Wojcik P, Jasiowka M, Strycharz E, Sobol M, Hodorowicz-Zaniewska D, Skotnicki P, Byrski T, Blecharz P, Marczyk E, Cedrych I et al. (2016) Recurrent mutations of *BRCA1*, *BRCA2* and *PALB2* in the population of breast and ovarian cancer patients in Southern Poland. *Hered Cancer Clin Pract* 14:1-14.
- Wolf-Dietrich Heyer (2007) *Molecular Genetics of Recombination*. 17:163–169.
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature* 378:789–792.
- Wozniak A, Fryer A, Grimer R, Mc Dowell H (2011) Multiple malignancies in a child with de novo *TP53* mutation. *Pediatr Hematol Oncol* 28:338–343.
- Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MCW, Hwang LY, Bowcock AM, Baer R (1996) Identification of a RING protein that can interact in vivo with the *BRCA1* gene product. *Nat Genet* 14:430–440.
- Wu S, Zhou J, Zhang K, Chen H, Luo M, Lu Y, Sun Y, Chen Y (2020) Molecular Mechanisms of *PALB2* Function and Its Role in Breast Cancer Management. *Front Oncol* 10:1–13.
- Wu Y, Zhang N, Yang Q (2017) The prognosis of invasive micropapillary carcinoma

- compared with invasive ductal carcinoma in the breast: A meta-analysis. *BMC Cancer* 17:1–9.
- Yeo G, Burge CB (2004) Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol* 11:377–394.
- Yersal O (2014) Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol* 5:412.
- Yoshida R (2020) Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis *Breast Cancer* 6:1167-1180.
- Zavala VA, Serrano-Gomez SJ, Dutil J, Fejerman L (2019) Genetic epidemiology of breast cancer in Latin America. *Genes* 2:150-153.
- Zhang B, Zhang X, Jin M, Hu L, Zang M, Qiu W, Wang S, Liu B, Liu S, Guo D (2019) CagA increases DNA methylation and decreases *PTEN* expression in human gastric cancer. *Mol Med Rep* 19:309–319.
- Zhang S, Royer R, Li S, McLaughlin JR, Rosen B, Risch HA, Fan I, Bradley L, Shaw PA, Narod SA (2011) Frequencies of *BRCA1* and *BRCA2* mutations among 1,342 unselected patients with invasive ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 121:353–357.
- Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW, editors (2020). *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://publications.iarc.fr/586>.

9. ANEXOS

9.1. **ANEXO I.** Aprovação do projeto “Mapeamento do câncer de mama familiar no sudoeste do Paraná e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional à agrotóxico” pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade do Oeste do Paraná

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
OESTE DO PARANÁ/



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Mapeamento do câncer de mama familiar no sudoeste do Paraná e estudo de associação de risco com a exposição ocupacional à agrotóxicos.

Pesquisador: CAROLINA PANIS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35524814.4.0000.0107

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 810.501

Data da Relatoria: 25/09/2014

Apresentação do Projeto:

Neste estudo pretende-se avaliar todas as mulheres diagnosticadas com câncer de mama, atendidas no Hospital de Câncer de Francisco Beltrão (Ceonc), em um período de 48 meses. A partir da análise de anotações em prontuários serão selecionadas para investigação dos genes de interesse aquelas mulheres com história de câncer de mama familiar com ou sem exposição ocupacional à agrotóxicos. Atende aos requisitos teóricos, metodológicos e éticos.

Objetivo da Pesquisa:

Mapear os casos de câncer de mama familiar na região Sudoeste do Paraná e identificar possível associação a exposição ocupacional à agrotóxicos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos diretos aos sujeitos, uma vez que serão estudados materiais coletados durante cirurgias oncológicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Relevante para a área de oncologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos apresentados.

Endereço: UNIVERSITARIA

Bairro: UNIVERSITARIO

UF: PR

Telefone: (45)3220-3272

Município: CASCAVEL

CEP: 85.819-110

E-mail: cep.prppg@unioeste.br

ANEXO I. cont.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO
OESTE DO PARANÁ/



Continuação do Parecer: 810.501

Recomendações:

Não há recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado. O projeto não necessita adequações.

CASCADEL, 29 de Setembro de 2014

Assinado por:
João Fernando Christofolletti
(Coordenador)

9.2. **ANEXO II.** Aprovação do comitê de ética em pesquisa da Fundação Cristiano Varela Hospital do câncer de Muriaé, MG.

FACULDADE DE MINAS -
FAMINAS - MURIAÉ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação da frequência de alterações genéticas nos genes BRCA 1 e 2 e TP53 em indivíduos portadores de câncer de Mama, Ovário, Próstata e Pâncreas no Hospital do Câncer de Muriaé

Pesquisador: Luciana de Andrade Agostinho

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP:);

Versão: 1

CAAE: 62262416.3.0000.5105

Instituição Proponente: Faculdade de Minas - FAMINAS

Patrocinador Principal: FUNDACAO CRISTIANO VARELLA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.843.906

Apresentação do Projeto:

Câncer de mama é um dos maiores problemas de saúde no mundo, aproximadamente 1.67 milhões de novos casos foram diagnosticados em 2012,

o que representa 25% de todos os tipos de câncer. No Brasil, novos casos de câncer de mama foram estimados com 51.120 em 2014 conforme o

INCa. As regiões Sul e Sudeste do Brasil possuem as taxas de incidência mais altas com 70.98 e 71.98/100.000, respectivamente. Além dos genes

acima, o gene TP53 (síndrome de Li-Fraumeni) também está associado com o aumento do risco de ocorrência de câncer de mama [5]. Por isso,

para o correto aconselhamento genético e cálculo do risco de predisposição em ser afetado ou não, é interessante analisar não só o BRCA 1 e 2

como também o gene TP53 [6]. O objetivo deste projeto será investigar a frequência das alterações genéticas nos genes BRCA1 e 2 e no gene

TP53 em pacientes brasileiros portadores de Câncer de Mama, Ovário, Próstata e Pâncreas no Hospital de Câncer de Muriaé-MG. O objetivo deste

Endereço: Avenida Cristiano Varela, 555

Bairro: Bairro Universitário

CEP: 36.880-000

UF: MG

Município: MURIAE

Telefone: (32)3729-7618

Fax: (32)3729-7547

E-mail: pesquisa@faminas.edu.br

ANEXO II. Cont.

FACULDADE DE MINAS -
FAMINAS - MURIAÉ



Continuação do Parecer: 1.843.906

projeto será investigar a frequência das alterações genéticas nos genes BRCA1 e 2 e no gene TP53 em pacientes brasileiros portadores de Câncer de Mama, Ovário, Próstata e Pâncreas no Hospital de Câncer de Muriaé-MG. Os indivíduos terão uma ficha preenchida com seus dados pessoais e clínicos conforme Apêndice A. Esta ficha foi elaborada com os achados mais frequentes apontados em literatura de pacientes com câncer de Mama/ovário e deverá ser preenchida no ato da anamnese realizada pelo corpo clínico da FCV. O sangue periférico será coletado em 2-3 tubos de EDTA. A extração do DNA do sangue será processada por meio do kit QIAamp DNA Mini Kit da Thermo Fisher Scientific utilizando 200 µL do sangue total. A biblioteca será preparada e a amostra será inserida em um chip no equipamento Ion Chef da Thermo Fisher, e depois será inserida na PGM (Personal Genome Machine) da Thermo Fisher, para seqüenciamento completo dos dois genes. A amostra será analisada em um servidor que possui um banco de dados genômico para comparação das variantes encontradas. Para evitar interpretação errada dos resultados, contaminação e não eficiência do protocolo, as novas variantes genéticas e amostras controle negativo serão validadas pelo seqüenciamento Sanger

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo deste projeto será investigar a frequência das alterações genéticas nos genes BRCA1 e 2 e no gene TP53 em pacientes brasileiros portadores de Câncer de Mama, Ovário, Próstata e Pâncreas no Hospital de Câncer de Muriaé-MG.

Objetivo Secundário:

Investigar as alterações genéticas relacionadas ao câncer de Mama e Ovário; Construir heredogramas de casos familiares; Relacionar a alteração genética com outros tipos de câncer: pâncreas e próstata. Investigar alterações genéticas nos genes BRCA 1 e 2 e TP53 em pacientes com câncer de próstata e pâncreas

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos deste projeto ao paciente são mínimos, mas podem ser representados pela

Endereço: Avenida Cristiano Varalla, 555

Bairro: Bairro Universitário

CEP: 36.880-000

UF: MG Município: MURIAE

Telefone: (32)3729-7518

Fax: (32)3729-7547

E-mail: pesquisa@faminas.edu.br

ANEXO II. Cont.

FACULDADE DE MINAS -
FAMINAS - MURIAÉ



Continuação do Parecer: 1.843.906

estigmatização do paciente portador de câncer de mama, ovário, próstata ou pâncreas caso acidentalmente seus dados sejam expostos, além do desconforto durante a coleta do sangue periférico. Além disso, caso a amostra não seja suficiente para a análise, o paciente pode ser convidado a ceder mais amostra biológica. Poderá ocorrer desconforto ao responder o questionário.

Benefícios:

Os benefícios deste projeto estão diretamente ligados a qualidade de vida de pacientes e de seus familiares com câncer de mama/ovário/pâncreas/próstata, pois existem relatos em literatura de tratamento e progressão de acordo com as variantes genéticas identificadas. Tais orientações podem ser relatadas ao paciente e sua família em forma de aconselhamento genético para que todos possam realizar a prevenção mais cedo, caso exista uma predisposição genética para o câncer em questão.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa vem preencher uma importante lacuna de pesquisas na área. Representa um acréscimo de conhecimento importante na área oncológica

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos em consonância com as resoluções

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências ou inadequações

Considerações Finais a critério do CEP:

Este projeto deverá gerar relatórios semestrais e ao término do projeto. Com entrega junto ao CEP

9.3. ANEXO III. Aprovação do projeto “Rastreamento de alterações genéticas e epigenéticas em múltiplos genes em pacientes portadores de câncer de mama familiar” pelo comitê de ética em pesquisa do Instituto Nacional de Câncer.

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Rastreamento de alterações genéticas e epigenéticas em múltiplos genes em pacientes portadores de câncer de mama familiar

Pesquisador: Cibele Rodrigues Bonvicino

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);
(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniente com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Versão: 9

CAAE: 00655812.7.0000.5274

Instituição Proponente: Instituto Nacional de Câncer/ INCA/ RJ

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ
CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.825.493

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas do documento contendo as Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1197559_E2.pdf de 05/05/2021) e do Projeto Detalhado.

RESUMO

O câncer de mama é uma doença heterogênea com relação ao prognóstico e resposta ao tratamento dos pacientes. De acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) 2012, o câncer de mama é o segundo mais frequente no mundo, e o mais comum entre as mulheres, respondendo por 22% de novos casos a cada ano. Em 2012, esperam-se, para o Brasil, 52.680 casos novos de câncer da mama, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Ganhos e perdas genômicas são resultado de instabilidade genômica em vários tipos de câncer, e vários genes supressores de tumor contribuem para a tumorigenese da mama. O RB1 é

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

ANEXO III. Cont.

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.825.493

um gene supressor de tumor que codifica a proteína pRb, responsável pelo controle do ciclo celular entre as fases G1 e S, inibindo a proliferação celular. Mutações somáticas ou germinativas neste gene têm sido detectadas em diferentes malignidades, incluindo o câncer de mama. Diversos estudos têm relatado o gene RB1 alterado na neoplasia de mama e dentre essas alterações as mais frequentes são LOH, duplicações de éxons, deleção parcial ou total do gene, presença de SNPs. Alterações em RB1 podem contribuir para o desenvolvimento de sensibilidade à quimioterapia em câncer de mama, entretanto o conhecimento de como essas alterações podem influenciar nesse aspecto do tratamento dessas pacientes ainda é limitado. O RB1 pode ser um importante marcador para informar decisões do tratamento. Compreender como alterações em RB1 afetam o tratamento quimioterápico é o primeiro passo para uma melhor percepção deste mecanismo em pacientes portadores de câncer de mama. Este projeto tem como objetivo avaliar as consequências das alterações presentes em RB1 em pacientes portadoras de câncer de mama não familiar em relação à sensibilidade ao tratamento quimioterápico. As amostras a serem avaliadas são de origem do Instituto do Câncer de Londrina/Universidade Estadual de Londrina. Serão analisadas amostras de pacientes com câncer de mama não familiar, incluindo amostras de plasma sanguíneo, tecido tumoral e tecido adjacente mamário. As amostras serão amplificadas e sequenciadas para que se detecte, ou não, a presença de alterações no gene RB1, que depois serão relacionadas com a evolução do quadro clínico das pacientes através da análise dos prontuários.

HIPÓTESE

Avaliar se alterações em múltiplos genes em pacientes portadores de câncer de mama estão relacionadas com a eficiência do tratamento quimioterápico, já que não há registro deste tipo de estudo na população brasileira envolvendo múltiplos genes estão relacionadas ao desenvolvimento do câncer de mama, e que estudos integrativos, como o aqui proposto, são fundamentais para o avanço no conhecimento dessa neoplasia, especialmente para diferenciar mecanismos envolvidos em câncer de mama familiar e esporádico. Para tanto, uma coorte de pacientes com câncer de mama proveniente dos hospitais do Centro de Oncologia de Francisco Beltrão (CEONC) do Paraná, do Instituto Nacional de Câncer, e do Hospital do Câncer de Muriaé de Minas Gerais, serão incluídos nesse estudo. As amostras de pacientes com câncer de mama familiar serão analisadas para alterações genéticas nos genes-alvos e as negativas para alterações patogênicas em BRCA1/2 e com câncer de mama esporádico serão utilizadas para análises de alterações epigenéticas.

METODOLOGIA

155 amostras de 25 pacientes estão disponíveis na Divisão de Genética, INCA. Este estudo faz

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conepe@saude.gov.br

ANEXO III. Cont.

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.825.493

parte do projeto "Caracterização do perfil proteômico e do estresse oxidativo em plasma e tecido tumoral de pacientes portadoras de câncer de mama" aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Londrina, sob número de registro FR - 463464. As pacientes que aceitaram participar do estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. A extração de DNA genômico seguirá o protocolo descrito por Sambrook et al (1989), e as amplificações serão realizadas com o protocolo descrito por Barbosa (2010). Em seguida, os produtos da PCR serão purificados e submetidos à eletroforese em gel de agarose para a verificação da presença de bandas inespecíficas, a qualidade do DNA, e o tamanho da amostra. O sequenciamento será realizado com protocolo descrito por Barbosa (2010), as sequências serão editadas no ChromsPro, alinhadas manualmente no Mega 4 e comparadas com a sequência referência do gene RB1 depositadas no GenBank sob o número de acesso L11910. Os prontuários dos pacientes investigados serão analisados, relacionando as alterações encontradas em RB1 com a evolução do quadro clínico dessas pacientes e a resposta ao tratamento quimioterápico.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios de inclusão foram: presença de carcinoma ductal infiltrativo de mama, coleta de material antes do início da quimioterapia, incidência unilateral da doença e ausência de história familiar sugestiva de câncer familiar.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

As mulheres fumantes, com doença hepática, disfunção cardíaca ou renal, obesidade, uso de drogas, hipertensão, sedentarismo, diabetes e outras eventuais condições crônicas foram excluídas do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

Detectar alterações em múltiplos genes, através do sequenciamento, em pacientes portadoras de câncer de mama familiar, e investigar se as mutações detectadas possuem associação quanto ao desenvolvimento da doença.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Relacionar as alterações encontradas na população com as alterações descritas para o RB1;

Avaliar se os SNPs encontrados são comuns na população, comparando com indivíduos não portadores da doença (dados disponíveis no nosso laboratório) e com dados da literatura;

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Anexo III. Cont.

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.825.493

Relacionar as alterações encontradas com a evolução do quadro clínico através da análise dos prontuários.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Não há riscos para os pacientes.

BENEFÍCIOS

O conhecimento das alterações em múltiplos genes podem ser um importante marcador para informar decisões do tratamento quimioterápico.

Através deste estudo pretende-se reunir mais informações sobre essas alterações em pacientes com câncer de mama, para no futuro esses dados auxiliarem no tratamento de portadores de tumores de mama.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Emenda 2

Justificativa: "Análise adicionais de alterações epigenéticas, que possam explicar ou adicionar informações relacionadas ao desenvolvimento do câncer de mama que foram negativas para alterações patogênicas nos genes já estudados. Nesse contexto, para dar continuidade e ampliar o projeto, necessitamos de aprovação para o envio de amostras de pacientes com câncer de mama para a Edinburgh Clinical Research Facility para serem sequenciadas, e com isso, possibilitará encontrarmos perfis de metilação que possam ou não, estar relacionado ao desenvolvimento do câncer de mama. O presente projeto irá investigar o perfil epigenético constitutivo de pacientes Brasileiras com câncer de mama familiar, e que não sejam portadoras de mutações genéticas patogênicas em genes de susceptibilidade a câncer de mama (BRCA1, BRCA2, ATM, CHEK2, PALB2, TP53, CDH1, BARD1, BRIP1 e RAD51). Os resultados pretendidos podem gerar informações relevantes sobre perfis de metilação e possíveis epimutações que aumentem o risco para câncer de mama familiar".

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide campo "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Caso a pesquisadora pretenda realizar futuras transferências de material biológico ou coleta de amostras para o próprio estudo, recomenda-se à pesquisadora responsável elaborar um Termo de

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

Anexo III. Cont.

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.825.493

consentimento livre e esclarecido para as participantes de pesquisa, conforme as Resoluções CNS n° 466 de 2012, CNS n° 441 de 2011 e CNS n° 340 de 2004.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. Quanto ao projeto detalhado, arquivo "projeto_destacado.pdf":

1.1. Nas páginas 7 e 8 de 14, lê-se: "Amostras de DNA e isolamento do DNA O DNA foi isolado de amostras de sangue, tecido mamário adjacente ao tumor, e tumor, utilizando o conjunto de reagente AllPrep DNA/RNA Mini kit (50) QIAGEN seguindo as recomendações do fabricante. Estão disponíveis para análises 155 amostras de sangue provenientes do Centro de Oncologia de Francisco Beltrão (CEONC)- Paraná e do Instituto Nacional de Câncer (INCA)- Rio de Janeiro aprovadas pelos comitês de éticas (35524814.4.0000.0107/, 810.501 e 114/07). Apenas as amostras de sangue serão utilizadas no presente projeto, uma vez que o objetivo é caracterizar o perfil de metilação constitutivo. Caso sejam encontradas epimutações relevantes, as amostras

tumorais e de tecido mamário adjacente ao tumor poderão ser analisadas através de técnicas de análise de metilação direcionadas para o gene ou região alvo". Observa-se que houve transferência de material biológico entre Biorrepositórios de estudos aprovados pelo Sistema CEP/Conep, porém, não existe descrição adequada do quantitativo de amostras transferidas por estudo, período de transferência, perfil das participantes que forneceram o material biológico e se ainda ocorre a transferência de material. Portanto, para adequada submissão do projeto detalhado:

1.1.1. Solicita-se encaminhar o quantitativo de amostras coletadas por estudo, e período de transferência (Norma Operacional CNS n° 001 de 2013, itens 3.4.1.5, 3.4.1.6 e 3.4.1.8).

1.1.2. Solicita-se informar se existe a previsão de futuras transferências de material biológico advindos de outros estudos. Caso positivo, solicita-se declaração da pesquisadora responsável de que a transferência de material seguirá os procedimentos previstos na Resolução CNS n° 441 de 2011, em especial no que se refere a solicitação de anuência à participante de pesquisa para uso do material biológico.

1.2. Considerando que a participante da pesquisa tem direito à privacidade e confidencialidade e a equipe de pesquisa tem o dever de garanti-las, solicita-se que sejam indicados os procedimentos que garantam o sigilo, confidencialidade e segurança no tratamento dos dados (Resolução CNS n°

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conept@saude.gov.br

Página 05 de 10

Anexo III. Cont.

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.825.493

466 de 2012, item III.2.i e Norma Operacional CNS nº 001 de 2013, item 3.4.1.7).

1.3. Por haver armazenamento de dados genéticos das participantes de pesquisa, solicita-se informar como ocorrerá o armazenamento destes dados (Resolução CNS nº 340 de 2004, itens III.2 e III.7).

2. Quanto ao documento: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1197559_E2%20.pdf, no item RISCO, é informado que a pesquisa "Não há riscos para os pacientes". Para o Sistema CEP/Conep não existe pesquisa livre de risco. É necessário observar que risco é qualquer possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer pesquisa e dela decorrente (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.2 e II.22). Sendo assim, solicita-se que sejam descritos os possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa, podendo-se citar os riscos inerentes à manutenção de sigilo e à confidencialidade durante a coleta e uso dos dados (Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.22 e IV.3.b).

3. Dentre as alterações propostas pela emenda, haverá o envio de material biológico para o exterior. Entretanto, não foi realizada a solicitação para essa análise às participantes de pesquisa que são as proprietárias das amostras que estão sob guarda da pesquisadora responsável. Portanto, solicitam-se esclarecimentos sobre a não realização do processo de consentimento, não apresentação de um TCLE destinado às participantes de pesquisa ou responsáveis legais pelas amostras das participantes que foram a óbito e a não apresentação da solicitação da Dispensa do TCLE com a sua justificativa. Ressalta-se que a justificativa deve ser baseada na Resolução CNS nº 466 de 2012, item IV.8.

4. Apesar do quantitativo de amostra ser de um micrograma de ADN, de o método de análise destruir e consumir toda a amostra e da pesquisadora acompanhar a amostra em todas as etapas, para o Sistema CEP/Conep ocorrerá a formação de Biorrepositório no exterior, portanto:

4.1. No projeto detalhado, solicita-se incluir as condições associadas ao armazenamento de material biológico humano e se ocorrerá o compartilhamento de dados associados às amostras (Resolução CNS nº 441 de 2011, item 4).

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.719-040
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5877 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Anexo III. Cont.

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.825.493

4.2. Quanto à documentação pertinente:

4.2.1. Solicita-se incluir a Declaração de que o material biológico não será destinado para patenteamento ou utilização comercial (Resolução CNS n° 441 de 2011, item 16).

4.2.2. Solicita-se incluir o Regulamento do biorrepositório mantido no exterior assinado pela instituição depositária em sua versão original e traduzida para a língua portuguesa (Resolução CNS n° 441 de 2011, item 2.IV).

5. Quanto ao Biorrepositório formado no Brasil, apesar da pesquisa estar ocorrendo desde 2012 com as sucessivas aprovações do CEP do centro coordenador para fins de adequação do protocolo de pesquisa:

5.1. No protocolo de pesquisa:

5.1.1. Solicita-se informar previsão de prazo de armazenamento do material sobressalente, se houver, e destino das amostras após este período. Ressalta-se que o prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa correspondente e pode ser autorizado por até dez anos (Resolução CNS n° 441 de 2011, item 12).

5.1.2. Solicita-se a explicitação da justificativa quanto à necessidade e oportunidade para utilização futura, caso se pretenda continuar o armazenamento das amostras vinculadas a este protocolo (Resolução CNS n° 441 de 2011, item 2.I).

5.1.3. Solicita-se incluir as condições associadas ao armazenamento de material biológico humano (Resolução CNS n° 441 de 2011, item 4).

5.2. Quanto à documentação pertinente:

5.2.1. Solicita-se incluir a Declaração de que toda nova pesquisa a ser realizada com o material armazenado será submetida para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa institucional e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Resolução CNS n° 441 de 2011, item 2.III).

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

9.4. ANEXO IV. Termo de Consentimento livre e esclarecido.

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO E DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PLASMA E TECIDO TUMORAL DE MAMA.

Prezada Senhora:

Gostaríamos de convidá-la a participar da pesquisa “**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL PROTEÔMICO E DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PLASMA E TECIDO TUMORAL DE MAMA**”, realizada pela Universidade Estadual de Londrina em parceria com o Instituto do Câncer de Londrina. O objetivo da pesquisa é identificar os fatores que desencadeiam a toxicidade ao tratamento com a droga trastuzumab. A sua participação é muito importante e ela se daria através da doação de 10 mL de sangue, coletado pelo serviço de enfermagem do setor de quimioterapia do Instituto do Câncer de Londrina e pela retirada de uma porção do tecido tumoral e adjacente já coletados pelo médico para análise patológica durante sua cirurgia. O médico responsável pela sua cirurgia também fornecerá dados sobre o seu estado clínico de saúde e informações que ajudem a avaliar os resultados das análises deste material coletado. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

O material coletado será utilizado para realização de exames laboratoriais para identificação de substâncias que possam estar relacionadas à evolução do câncer de mama para os estadios avançados da doença. Nossa expectativa é de que este estudo traga como benefício a identificação de genes, proteínas e substâncias relacionadas com a evolução desta doença, para no futuro contribuir para o entendimento do comportamento da doença nas suas formas mais agressivas, que levam à resistência ao tratamento quimioterápico e menor tempo de sobrevida. Além disso, o material extraído será armazenado para futuras análises que possam ajudar a esclarecer novas questões que surgirão durante a análise dos resultados.

Informamos que o(a) senhor(a) não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa. Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode contatar o Prof. Dr Rubens Cecchini e a Dra Carolina Panis, que podem ser encontrados no Laboratório de Fisiopatologia de Radicais Livres, localizado na Rod. Celso Garcia Cid, 445, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, telefones: 43 33714521 ou 21 82300641, email: carolpanis@sercomtel.com.br, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 33712490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, ___ de _____ de 201 .

_____ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): _____

Data: _____

Dra. Ana Cristina da Silva do Amaral Herrera,
Cirurgiã responsável pela coleta de material, Instituto do Câncer de Londrina, CRM 15214-PR_
Dr. Rubens Cecchini. Pesquisador Responsável, Universidade Estadual de Londrina, CPF
51212927834. Dra. Carolina Panis Pesquisador Co-Responsável
Universidade Estadual de Londrina, CPF 03249502928

9.5. ANEXO V. Iniciadores (I) utilizados para amplificação de *BRCA1* e *BRCA2*, discriminando os éxons amplificados, a sequência, tamanho do fragmento (pb) e posição genômica (Pos.gen) segundo a sequência referência NM_007294.3 (*BRCA1*), NM_00059.3 (*BRCA2*).

<i>I BRCA1</i>	Sequência 5' 3'	pb	Pos. geno	<i>I BRCA2</i>	Sequência 5' 3'	pb	Pos. geno
2F	GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT	258	41275961	2F	TGTTCCCATCCTCACAGTAAG	347	32890429
2R	TGTCTTTTCTTCCCTAGTATGT		41276173	2R	GTACTGGGTTTTTTAGCAAGCA		32890722
5-7F	GTTTAGGTTTTTGTCTTATGCAGCATCCA	3081	41255689	3F	GGTTAAAATAAAGGTGGGA	390	32893198
5-7R	TCAGGTACCCTGACCTTCTCTGAAC		41258716	3R	ATTTGCCCAGCATGACACA		32893549
8F	TGTTAGCTGACTGATGATGGT	267	41251769	4F	ATCTAAAGTAGTATCCAACA	1778	32900378
8R	ATCCAGCAATTATTATTAATAAC		41251990	7R	ATTGTCAGTTACTAACACAC		32900867
9F	CCACAGTAGATGCTCAGTAAATA	211	41249240	8F	GTGTCATGTAATCAAATAGT	2044	32903496
9R	TAGGAAAATACCAGCTTCATAGA		41249404	9R	GTCAAGAAAGGAAAGGTAA		32905500
10F	TGGTCAGCTTTCTGTAATCG	241	41247778	10.1F	CTATGAGAAAGGTTGTGAG	1324	32906349
10R	GTATCTACCCACTCTCTTCTTCAG		41248024	10.3R	AGTGGTCTTAAGATAGTCAT		32911980
11-AF	CCACCTCCAAGGTGTATGAAGTATG	2580	41244405	11.1F	AACTTAGTGAAAAATATTTAGTGA	1704	32910352
11-ER	GGAGCCCACTTCATTAGTAC		41246939	11.4R	CTTGCTGCTGTCTACCTG		32912014
11FF	CCAGTACAGTGAGCACAATTA	1550	41243885	11.5AF	GGCTTTTATTCTGCTCATGGC	1903	32912165
11FR	GTGTTGGAAGCAGGGAAGCTCTTC		41244465	11.5AR	CCAAAAAAGTTAAATCTGACA		32912642
11GF	GAAGAGCTTCCCTGCTTCCAACAC		41243401	11.5BF	CCATAATTTAACACCTAGCCA		32911813
11GR	GTGCTCCCAAAGCATAAA		41243871	11.7R	TTCGGAGAGATGATTTTTGTC		32913673
12F	GTCCTGCCAATGAGAAGAAA	265	41242893	11.8F	GCCTTAGCTTTTTACACAA	1975	32913513
12R	TGTCAGCAAACCTAAGAATGT		41243116	11.11R	CCCCAAACTGACTACACAA		32915448
13F	AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA	320	41234350	12F	ACTCTTCAAACATTAGGTCA	340	32918561
13R	ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC		41234627	12R	TTTGAGAGGCAGGTGGAT		32918861
14F	CTAACCTGAATTATCACTATCA	312	41228407	13F	TTTATGCTGATTTCTGTTGTAT	709	32920761
14R	GTGTATAAATGCCTGTATGCA		Pos. geno	13R	ATAAACGGGAAGTGTTAACT		32921132

I BRCA1	Sequência 5' 3'	pb	Pos. geno	I BRCA2	Sequência 5' 3'	pb	Pos. geno
15F	TGGCTGCCCAGCAAGTATG	338	41228675	14F	GAATACAAAACAGTTACCAGA	647	32928895
15R	AACCAGAATATCTTTATGTAGGA		41226298	14R	CACCACCAAAGGGGAAA		32929502
16F	AATTCTTAACAGAGACCAGAAC	450	41226593	15F	ATTTCAATTTTATTTTGGCT	1640	32912572
16R	AAAACCTCTTTCCAGAATGTTGT		41222904	16R	TAGTTCGAGAGACAGTTAAG		32932127
17F	GTGTAGAACGTGCAGGATTG	263	41223309	17F	CAGAGAATAGTTGTAGTTGTT	1191	32936603
17R	TCGCCTCATGTGGTTTTA		41219584	18R	GAAATTGAGCATCCTTAGTAA		32937751
18F	GGCTCTTTAGCTTCTTAGGAC	799	41219808	19F	ATATTTTTAAGGCAGTTCTAGA	977	32944457
19R	CATTGTAAAGGAAAGTGGTGC		41215269	20R	CTTGTTGCTATTCTTTGTCTA		32945390
20F	ATATGACGTGTCTGCTCCAC	401	41216025	22F	TTTGTTGTATTTGTCCTGTTA	825	32953380
20R	GGGAATCCAAATTACACAGC		41208852	23R	CCGTGGCTGGTAAATCTG		32954164
21F	AAGCTCTTCCTTTTTGAAAGTC	298	41209212	24F	ACCGGTACAAACCTTTCATTG	324	32954068
21R	GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT		41202970	24R	CTGGTAGCTCCAACATAATC		32954351
22F	TCCCATTGAGAGGTCTTGCT	1751	41203223	25F	CTATTTTGATTTGCTTTTATTATT	447	32968722
23R	ACTGTGCTACTCAAGCACCA		41199591	25R	GCTATTTCTTGATACTGGAC		32969123
24F	ATGAATTGACACTAATCTCTGC	280	41199806	26F	TTGGAAACATAAATATGTGGG	336	32970995
24R	GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA		41197602	26R	ACTTACAGGAGCCACATAAC		32971300
				27F	CTACATAATTATGATAGGCT	737	32972278
				27R	GTACTAATGTGTGGTTTAAA		32972973

9.6. **ANEXO VI.** Lista das reações (R) das PCR multiplex para *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *RAD51*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1* e *TP53* discriminando os éxons envolvidos e o tamanho do fragmento amplificado em pares de base (T pb).

<i>BRCA1</i>			<i>BRCA2</i>			<i>ATM</i>			<i>RAD51</i>				
R	Éxon	T pb	R	Éxon	T pb	R	Éxon	T pb	R	Éxon	T pb		
1	11a (11A-11F)	2580	1	8-9	2044	1	36-37	2213	1	1-3	1635		
	14	312		11b	1551		60-61	1346		4-6	1190		
	2	258		13	415		57	585		7-8	515		
										9-10	1824		
2	22-23	1751	2	11c	1975	2	54-56	2288					
	16	450		10	1324		48-49	1944					
	12	265		19-20	977		58-59	1810					
3	18-19	799	3	26	324	3	54-56	2288	<i>PALB2</i>				
	3	339		11a	1704		41-43	1935	R	Éxon	T pb		
	21	298		22-23	825		46-47	1325	1	5-6	453		
4	8	267	2	336	62-63	973	13	867					
	10	241	25	447	41-43	1935	2-3	571					
	9	211	4	4-7	1778	4	14-16	3180	1	428			
5	13	320	4	17-18	1191	4	44-45	1782	11	290			
	17	263		14	647		27-29	2376	2	4	1683		
	11b (11E-G)			1550	24		324	14-16		3180	8-9	1279	
6	20	401	5	15-16	1623	5	34-35	2703	12	375			
	24	280		27	737		10-13	3662	7	271			
	15	338		21	340		6	32-33	2670	3	10	453	
7	5-7	3081	6	3	390	6	2-4	2040					
				12	301		6-7	1411					
								7	39-40	2639			
<i>BARD1</i>			<i>BRIP1</i>			<i>ATM</i>							
R	Éxon	T pb	R	Éxon	T pb	R	Éxon	T pb					
1	5-6	2159	1	5-6	2348	7	19-22	1996					
	2	393		2-3	1920		30-31	1090					
	8-9	1076		17	596		8	8-9	2293				
	7	480		12-13	959		23-24	1848	8	38	720		
2	2	393	2	4	416	8-9	2293						
				7	570	9	25-26	2090					
<i>CDH1</i>			<i>BRIP1</i>			<i>ATM</i>							
R	Éxon	T pb	R	Éxon	T pb	R	Éxon	T pb					
1	8-10	3849	3	8-9	2538	9	17-18	1621					
	12-13	1850		14	521		5	600					
	3	524		15-16	1739		25-26	2090					
	16	361		4	11		414	10	50-53	2854			
2	14-15	3610	4	20	1090	10	5	600	<i>TP53</i>				
	4-7	3610		18	535		R	Éxon	T pb				
	11	503					1	2-4	778				
3	1-2	1370							5-9	1803			
										10-11	1215		

9.7. **ANEXO VII.** Iniciadores utilizados para amplificação dos genes *ATM*, *CHEK2*, *CDHI*, *PALB2*, *RAD51D*, *TP53*, *BARD1* e *BRIP1*, discriminando os éxons amplificados, a sequência do iniciador, e o tamanho do fragmento em pares de base (T pb).

Gene	Éxon	Primer F	Primer R	T pb
<i>ATM</i>	2-4	5' GACCAGAATGTGCCTCTAATTGT 3'	5' AACTCACGCGACAGTAATCTGTT 3'	2040
	5	5' CGTTGGCAAACCTTACTGTGTAAAG 3'	5' CTGTAAACTGTCAGGTCAGTCTGG 3'	600
	6-7	5' CTGGTGCTCTCACAGCAGTTTAT 3'	5' AACCAGAGAAATCCAGAGGAAAG 3'	1411
	8-9	5' GGGAGCTAGCAGTGTAACAGAG 3'	5' GTTGAGATGAAAGGATTCCACTG 3'	2293
	10-13	5' CTGCCAATTTAGGAAGTAGGACA 3'	5' ATTTAGAGCCCTTTACTGCCACT 3'	3662
	14-16	5' CAGGATATGCCACCTTTAACTCA 3'	5' ACCTGGCCTTAATTTCCACAT 3'	3180
	17-18	5' GTGCCCAGCCTGATTAGGTAAAT 3'	5' CTTCAAAGACACCATGTGATTC 3'	1621
	19-22	5' TGCACCCGGCCTATGTTTAT 3'	5' GGCACACCGTATATACTCAACAA 3'	1996
	23-24	5' GGAATATGCTTTGGAAAGTAGGG 3'	5' AAGTGCCACTCAGAAAATCTAGC 3'	1843
	25-26	5' GTGTCAGATACTGTGCCAGTTGA 3'	5' TGGGTTGGCTATGCTAGATAATG 3'	2090
	27-29	5' CCTTTTGAGCTGTCTTGACGTT 3'	5' GCGGACAGAGTGAGTCTTTGTCT 3'	2376
	30-31	5' GAGATGCTGAACAAAAGGACTTC 3'	5' GTGCCTGGCCTACGTATATATTTT 3'	1090
	32-33	5' GTAGGGTTTGCAGTGGAAGAAAT 3'	5' CTGTCCTATATGTGATCCGCAGT 3'	2670
	34	5' TTTTCTTTTGTACCCAGGCTA 3'	5' CTGTGTAGAACCATCTGGCATT 3'	845
	35	5' TTGAATGAAGGGAATTGCAG 3'	5' CCTCCCCAAAATCAACTACTAT 3'	602
	36-37	5' GTAGGAAAGGTACAATGATTTCCAC 3'	5' GGCAACTTTTATCTCCATTCCA 3'	2213
	38	5' CCAGGCTAGTCAGTGAGTTCTGT 3'	5' CCTGAATATGGATTACTGCAAGG 3'	720
	39-40	5' GGTATATATTGGGGAAATGTGG 3'	5' GGTATATATTGGGGAAATGTGG 3'	2639
	41-43	5' CAAACTCGTGTTTGAACACTG3'	5' TGTTGTTTAGAATGAGGAGAGAGG3'	1935
	44-45	5' GAGCATATTTAGAACCAGGCAGA 3'	5' GCCCCGCCTATAGTTTTTATTT 3'	1782
	46-47	5' CTGACCGCATAGCATTGTTGTAGT 3'	5' TCGACCACATGATGGACTGAT 3'	1325
	48-49	5' AGCCTTTACAAAAGTGTCTGACATA 3'	5' GACCAAGTCACTCTTTCTATGCAA 3'	1944
	50-53	5' CCTGGGATAAAAACCCAACCTTT 3'	5' TCTCTACAGAGAGTAACACAGCAAGA 3'	2854
	54-56	5' ATCAGAGCCTGAACCACAGATTA 3'	5' GCATTATGAATATGGGCATGAG 3'	2288
	57	5' CTCTCAAACATCTAGGCAGCAG 3'	5' CATTCTTATCTGACAAGGGTTGAC 3'	585
	58-59	5' CCTGTTTCATCTTTATTGCCCTA 3'	5' TCTTGGTAGGCAAACAACATTC 3'	1810
	60-61	5' GCAGCCAGAGCAGAAGTAAACTA 3'	5' GCTCTTCACATCAGTGACTTCCT 3'	1346
62-63	5' GGCCCTACAAAGCAAATACACTA 3'	5' AAGAGTGAAAGCAGAGATGTTCC 3'	973	
<i>CDHI</i>	1-2	5' ACCCACCTAGACCCTAGCAACTC3'	5' GTGTGGGAGTGCAATTTCTCG3'	1395
	3	5' GTGTTTGGTTTTGTGGGAGTCTTC 3'	5' AACTGGTGGAAAGTGCTACTGGTG 3'	524

Gene	Exon	Primer F	Primer R	T pb
	4-7	5' CTGTCTGGCTAGGTTGGACTGTT 3'	5' GACAACCTGGCCTAGCAGGATTTT 3'	3610
	8-10	5' CTAGGCCAAAGGTGGCTAGTGTT 3'	5' GAACAGGTGAAAGGAGCACAGAT 3'	3849
	11	5' GACCGGCCTATTGTTGGTTTTTC 3'	5' YATGTTATTTGGGTGAYGGATACC 3'	503
	12-13	5' ACCACTGAAGAGCCAGGACAA3'	5' TCTCTTTCCCACATCAGCTAACC 3'	1850
	14-15	5' GTGAGTGTACGTGGATTGACAT 3'	5' GCTCAGGCAAGCTGAAAACATAG 3'	1907
	16	5' GGGTGCATTGTCGTACCTTACAT 3'	5' CCTCTTTCTCCACGTTTTGACTG 3'	2442
<i>CHEK2</i>	9-15	5' TTACATTTCTGTCYGTGTGAAGAGTTG 3'	5' CTAAGAACCRRATTATCAAGCAGAAGC 3'	9556
<i>PALB2</i>	1	5' ACAGCGCGGCTCTCCTTTAG 3'	5' GGAGGGGGTGGTCAGATGATAC 3'	428
	2-3	5' TTCCCTCTGACTCCACCTTTCC 3'	5' ATCACTTGAGCCTGGGAGTTGG 3'	571
	4	5' GCCTGAATGAAATGTCACTGATTCT 3'	5' AAAGGAAGTGCCAGGCAAATAGT 3'	1683
	5-6	5' TTTCTGAGTCATGGATGGGAAAAG 3'	5' CTTGCCAATAGGTTGGCATAGAAA 3'	1759
	7	5' GCTTTGCATAAAACAGCACTCG 3'	5' TATCAGGCAAATGGCTGCAAAG 3'	271
	8-9	5' CCAAGCATAATTTTTGGCTGCT 3'	5' TGCTTATATTACACCCCAGCACA 3'	1279
	10	5' CAGTTCAACAATGCGGAGAAGG 3'	5' AGGCTGAGGCAGGAGAATCACT 3'	453
	11	5' TCCCTGGTCACCTCCTAAGACA 3'	5' CACGGGGAAGGTTTGTTCATTA 3'	290
	12	5' GTTCCTAGACGGCAGGGAAAAA 3'	5' TGTTTGCACAGTGCCTTTCAGA 3'	375
	13	5' TTTTGGGAACATGGTTTTGACC 3'	5' TGGCATGAAAGATGCATGAGAA 3'	867
<i>RAD51D</i>	1-3	5' AAGGCTCTTTAGAAGGTCGGTGT 3'	5' AGCATCAAAGCAGAGCTGAGAG 3'	1635
	4-6	5' CTTGGTACCTTTTCCCCTGTCTT 3'	5' GCCCACAGAGATAGCACCTAGAA 3'	1190
	7-8	5' GTCCTAGAGGCTGACAGGTTTCAT 3'	5' AGACGATTCCTGATTCCCTTAGC 3'	515
	9-10	5' AGTTCAGACCTGCCATTAGGTT 3'	5' CTTTCCTGCAGCCAAGACATAAC 3'	1824
<i>TP53</i>	2-4	5' CCAGGTGACCCAGGGTTGGA 3'	5' AGAGGAATCCCAAAGTTCCA 3'	778
	5-9	5' TGTTCACTTGTGCCCTGACT 3'	5' AGTGTTAGACTGGAAACTTT 3'	1803
	10-11	5' CAATTGTAACCTGAACCATC 3'	5' AGGCTGTCAGTGGGGAACAA 3'	1215
<i>BARD1</i>	1	5'CGAGTCCCTATTTTGGGAGCAT3'	5' AATACTATATCCCCGGCAGGT3'	508
	2	5' GTAGTGTTGGGCCTTGGATGAA3'	5' CTCCAATTTGGCAAAGCTGTCT3'	393
	3	5' TCTGCTGAATGGGTTGCTTTTT3'	5' AGTCCGGCTTGGACAACATAGA3'	380
	4	5' GAGCTCCATGTGGGAGCAATAA3'	5' GTTGGCCTCATTCTGAGATGGT3'	1065
	5-6	5' ACCACACCCGGCCTAATAATTT3'	5' ACCACACCCGGCCTAATAATTT3'	2156
	7	5' TTCTCCTTTGAGTTCAGCAGCTTT3'	5' GCCTAAAATACAGAGTGGGCTCAA3'	480
	8-9	5' GGTTCCTGGGTGTAGATTCAATGG3'	5' CAGAAGCTTTTCCAAAATGCAG3'	1076
	10-11	5' CTGCCATGAAGAAGAAAAACCA3'	5' CTCTCACAACCGTGCAAATTC3'	2340
<i>BRIP1</i>	2-3	5'GGTTTTCTTTGTAAGGCGTGTCT3'	5' GACAGCATGGCTGAACCAGT3'	1920

Gene	Éxon	Primer F	Primer R	T pb
	4	5'CTGGGTGAACTGGGCTGTAG3'	5'GGATTTTTGACCACTCTGTGC3'	416
	5-6	5'CATCCTGGTTCCAGTTTTCTTC3'	5'TGGGTGCTACTGTCCTTTG3'	2348
	7	5'TTCCATGTGAGGTTTGATAACG3'	5'TCCAAGCTTTAAGACCAAATC3'	570
	8-9	5'GGTGGCGTAGCCAGTAAAAT3'	5'GGCAGCACAAATACACTAATAGAC3'	2538
	10	5'AGGATGATACTGGTTGACACAA3'	5'CACCCACAATTTACCCATGC3'	356
	11	5'CCCTCCAACCCCTCTATAC3'	5'GCCTGGGTGACAGAGAAGTC3'	414
	12-13	5'TGGGAAGGTACCAGCTCTTT3'	5'TTACTTGCTGGCACTTCAGG3'	959
	14	5'AGAAAACCCCTGACAATTT3'	5'CCAGCCTTGCTCTTTCAGAC3'	521
	15-16	5'GCCGTAGTCACATTGGCTTA3'	5'GGGATCCCTGCAATTAACCTTT3'	1739
	17	5'GGGATAAGAGGGAACCTTTTGG3'	5'CCAGTTCCTATGGTTCCAGTT3'	596
	18	5'CTGTCCCACTGGAAAACCTGG3'	5'AAGAAGGAAATCCTGCAACA3'	535
	19	5'CCCTGGGTTTACCTTTTTCTTT3'	5'CAACCCAACCTGAAGGGATA3'	671
	20	5'GCAATTATGTTAGCTAGGAGCAG3'	5'GGCAACAGACCAAGACTCTG3'	1090

Leg.: As sequências de referência utilizadas foram NM_000051.3 (ATM), NM_001007194.4 (CHEK2), NM_004360.4 (CDH1), NM_024675.3 (PALB2), NM_001142571.1 (RAD51D), NM_000546.5 (TP53), NM_000465.4 (BARD1), NM_032043.2 (BRIP1).

9.8. **Anexo VIII.** Lista de variantes nos genes *ATM*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *PALB2*, *RAD51D* e *TP53*, com identificação (dbSNP), posição do transcrito (cDNA), proteína, posição, classificação Varsome/ClinVar, por pacientes do Sul (Paraná – PR) e Sudeste (Minas Gerais– MG ou Rio de Janeiro - RJ).

Gene	dbSNP	cDNA	Proteína	Posição	Varsome/ClinVar	Nº paciente
<i>ATM</i>	Sem	c.4109+334A>T	-	Intrônica	VUS	PR 1
	Sem	c.4109+335G>T	-	Intrônica	VUS	RJ 1
	Sem	c.4109+628G>A	-	Intrônica	VUS	RJ2, PR1
	Sem	c.4109+629G>A	-	Intrônica	VUS	RJ 1
	Sem	c.4109+630_4109+631del	-	Intrônica	VUS	RJ 1
	Sem	c.4110-307C>G	-	Intrônica	VUS	RJ 1
	rs202068074	c.4110-374_4110-371del	-	Intrônica	VUS	RJ2
	rs77033857	c.4110-473T>C	-	Intrônica	VUS	MG1
	Sem	c.4110-630_4110-629insAT	-	Intrônica	VUS	RJ1
	Sem	c.4110-630C>T	-	Intrônica	VUS	PR5, RJ11, MG1
	Sem	c.4436+83G>A	-	Intrônica	VUS	MG1
	Sem	c.4437-14del	-	Intrônica	VUS	PR1
	rs766101886	c.4777-27A>G	-	Intrônica	VUS	MG1
	rs768748099	c.497-5_497-4del	-	Intrônica	VUS	RJ2
	rs140641762	c.5352C>T	p.Asn1784	Sinônima	VUS	MG1
	rs144761622	c.6176C>T	p.Thr2059Ile	missense	VUS	MG1
	rs763451341	c.6347+19_6347+20del	-	Intrônica	VUS	RJ1
	rs763451341	c.6347+30_6347+31del	-	Intrônica	VUS	PR6, RJ9, MG1
	rs138828590	c.6543G>T	p.Glu2181Asp	Missense	VUS	MG1
	rs11366542	c.6573-60_6573-57del	-	Intrônica	VUS	PR1
	rs553744385	c.6976-114del	-	Intrônica	VUS	PR2, RJ2
	rs1000706162	c.6976-144G>A	-	Intrônica	VUS	PR1
	rs730881383	c.7375C>G	p.Arg2459Gly	Missense	VUS	RJ 1
Sem	c.7992C>G	p.Val2664	Sinônima	VUS	RJ 1	
Sem	c.8170C>A	p.Gln2724Lys	Missense	VUS	RJ 1	
<i>BARD1</i>	Sem	c.1314+21T>A	-	Intrônica	VUS	RJ 9, PR 14
<i>BRIP1</i>	rs763913233	c.1935+22del	-	Intrônica	VUS	MG3, RJ57, PR25

Gene	dbSNP	cDNA	Proteína	Posição	Varsome/ClinVar	Nº paciente
	rs776579803	c.1935+22dup	-	Intrônica	VUS	RJ 1
	rs786203170	c.1972C>A	p.Arg658	Sinônima	VUS	MG 1
	rs770467563	c.206-30T>C	-	Intrônica	VUS	PR1
	rs1064793669	c.2098-16del	-	Intrônica	VUS	RJ1
	rs587780247	c.316C>T	p.Arg106Cys	Missense	VUS	RJ1
	rs542698396	c.3651G>T	p.Trp1217Cys	Missense	VUS	PR1
	rs45566938	c.36G>T	p.Gly12	Sinônima	VUS	PR1
<i>CDHI</i>	rs1027713288	c.*110del	-	Deleção	VUS	RJ1
	rs145920869	c.*220_*221del	-	Deleção	VUS	PR1
	rs1320523802	c.1137+504C>T	-	Intrônica	VUS	MG1
	rs191798782	c.1138-125G>T	-	Intrônica	VUS	RJ1
	Sem	c.1138-203T>G	-	Intrônica	VUS	PR1
	Sem	c.1138-204C>T	-	Intrônica	VUS	PR1
	rs748393673	c.1320+365A>T	-	Intrônica	VUS	MG1
	rs1409093806	c.1320+611G>A	-	Intrônica	VUS	MG1
	Sem	c.1320+617del	-	Deleção/Intrônica	VUS	RJ1
	Sem	c.1321-414C>G	-	Intrônica	VUS	RJ1
	rs1161708784	c.1321-958del	-	Deleção/Intrônica	VUS	MG20, RJ30, PR12
	rs1462728220	c.1321-96A>G	-	Intrônica	VUS	MG1
	rs34212204	c.1566-38T>G	-	Intrônica	VUS	RJ1
	rs1360937602	c.532-25T>C	-	Intrônica	VUS	RJ1
	rs981792194	c.-57C>T	-	5'UTR	VUS	RJ1
	Sem	c.687+392_687+394del	-	Deleção/Intrônica	VUS	RJ1
	Sem	c.687+456T>C	-	Intrônica	VUS	MG3
	Sem	c.687+457G>A	-	Intrônica	VUS	MG3
	rs907689107	c.687+468T>C	-	Intrônica	VUS	MG1
	Sem Id	c.687+625A>G	-	Intrônica	VUS	MG1
	rs188949437	c.688-367A>G	-	Intrônica	VUS	PR1
	Sem	c.832+321A>G	-	Intrônica	VUS	MG1
	Sem	c.832+536_832+537del	-	Deleção/Intrônica	VUS	MG1, RJ2

Gene	dbSNP	cDNA	Proteína	Posição	Varsome/ClinVar	Nº paciente
	rs949458172	c.832+537A>T	-	Intrônica	VUS	RJ1
	rs930343696	c.832+537del	-	Deleção/Intrônica	VUS	MG7, RJ25, PR12
	rs891663461	c.833-309A>G	-	Intrônica	VUS	MG1
	rs1054603239	c.833-310C>T	-	Intrônica	VUS	MG1
	Sem	c.833-372G>A	-	Intrônica	VUS	MG7
	Sem	c.833-373T>C	-	Intrônica	VUS	MG7
	Sem	c.833-457G>A	-	Intrônica	VUS	MG2
	rs556275263	c.833-458T>C	-	Intrônica	VUS	MG2
	Sem	c.833-459C>T	-	Intrônica	VUS	MG2
	Sem	c.833-465G>A	-	Intrônica	VUS	MG2
	Sem	c.833-466A>T	-	Intrônica	VUS	MG2
<i>CHEK2</i>	Sem	c.1225-470G>A	-	Intrônica	VUS	RJ1
	rs1481969887	c.1225-483G>T	-	Intrônica	VUS	RJ2, MG1
	Sem	c.1389-226C>G	-	Intrônica	VUS	MG1
	rs1482783928	c.1504+432T>C	-	Intrônica	VUS	MG1
	rs1161739296	c.1590+1056C>T	-	Intrônica	VUS	MG1
	rs139885343	c.1590+131G>T	-	Intrônica	VUS	PR1
	rs576299845	c.1590+1726_1590+1731del	-	Deleção/Intrônica	VUS	MG1
	rs556335113	c.1590+173del	-	Deleção/Intrônica	VUS	MG21, RJ31, PR18
	rs111466304	c.1590+174del	-	Deleção/Intrônica	VUS	RJ1
	rs111317257	c.1590+1937T>C	-	Intrônica	VUS	RJ1
	rs186826166	c.1590+215G>A	-	Intrônica	VUS	MG1
	rs201520475	c.1590+936dup	-	Insertion/Intrônica	VUS	PR1
	rs890652695	c.1591-842T>G	-	Intrônica	VUS	PR1
	rs554779856	c.1671+276A>G	-	Intrônica	VUS	MG1
	rs914857068	c.1671+463del	-	Deleção/Intrônica	VUS	MG10, RJ9, PR5
	rs554426567	c.1672-368A>G	-	Intrônica	VUS	RJ1
	rs554426567	c.1672-368A>G	-	Intrônica	VUS	RJ1
<i>PALB2</i>	rs1336079225	c.*209G>A	-	3'UTR	VUS	RJ1
	Sem	c.1685-180G>A	-	Intrônica	VUS	PR1

Gene	dbSNP	cDNA	Proteína	Posição	Varsome/ClinVar	Nº paciente
	Sem	c.1685-90A>G	-	Intrônica	VUS	RJ1
	rs773179377	c.211+23T>C	-	Intrônica	VUS	RJ1
	rs587782765	c.2401G>A	-	Missense	VUS	RJ1
	rs536644825	c.2506G>A	-	Missense	VUS	RJ1
	Sem	c.2514+111G>A	-	Intrônica	VUS	MG1, PR3
	rs1039859397	c.2514+114G>A	-	Intrônica	VUS	PR1
	Sem	c.2514+131T>C	-	Intrônica	VUS	PR1
	Sem	c.2514+142T>A	-	Intrônica	VUS	MG1
	rs978973239	c.2835-220C>T	-	Intrônica	VUS	RJ1
	rs1189941589	c.2835-372dup	-	Insertion/Intrônica	VUS	MG1
	rs1189941589	c.2835-374_2835-372del	-	Deleção/Intrônica	VUS	MG1
	rs1189941589	c.2835-376_2835-372del	-	Deleção/Intrônica	VUS	RJ3, PR1, MG1
	Sem	c.2835-377_2835-372del	-	Deleção/Intrônica	VUS	RJ1
	Sem	c.2835-400_2835-396del	-	Deleção/Intrônica	VUS	PR1
	Sem	c.2835-404G>T	-	Intrônica	VUS	RJ1
	rs754470879	c.2835-75_2835-71del	-	Deleção/Intrônica	VUS	PR1
	Sem	c.3351-55_3351-53del	-	Deleção/Intrônica	VUS	RJ1
<i>RAD51D</i>	rs575313654	c.*178G>A	-	3'UTR	VUS	MG1
	rs185961963	c.144+213T>C	-	Intrônica	VUS	PR1
	Sem	c.144+34T>C	-	Intrônica	VUS	PR1
	rs140825795	c.26G>C	-	Missense	VUS	PR1
	rs201313861	c.415T>C	-	Missense	VUS	RJ1
	Sem	c.82+105T>C	-	Intrônica	VUS	PR1
<i>TP53</i>	rs183276131	c.673-100C>T	-	Intrônica	VUS	RJ2
	Sem	c.673-236del	-	Deleção/Intrônica	VUS	RJ1
	rs752774596	c.673-73_673-71del	-	Deleção/Intrônica	VUS	RJ2

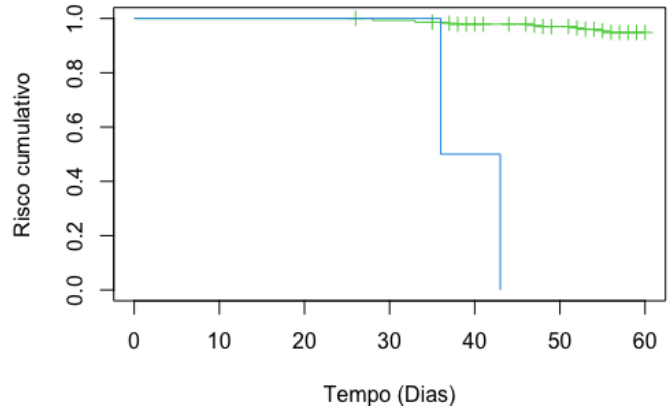
9.9. **Anexo IX.** Correlação das variantes com dados clínicos como óbito, grau histológico, idade e sobrevida. As análises foram ajustadas para idade ao diagnóstico, grau histológico e presença de mais de uma VUS ou variante patogênica em cada paciente.

Gene	Variável	No.de casos	No.de casos	IC	P value		
ATM	c.6099dup	x	145	8	0.000581	0.0685	0,8
	óbito		1	0	0.067890	0.0685	
	rs138828590	x	145	8	0.000581	0.0685	0,8
	óbito		1	0	0.067890	0.0685	
	rs730881383	x	145	8	0.000581	0.0685	0,8
	óbito		1	0	0.067890	0.0685	
	rs763451341	x ATT	131	7	0.00356	0.0339	
	óbito	T	13	1	0.08791	0.0970	0,9
		TT	2	0	0.09606	0.0973	
	c.8170C>A	x CC	145	8	2.43e-05	0.014	0,9
	óbito	CA	1	0	1.39e-02	0.014	
	rs766101886	x AA	144	6	0.475	66.3	4e-16
	óbito	AG	2	2	65.495	66.3	
	rs202068074	X C	144	8	0.00163	0.115	0,7
	Óbito	CTAAA	2	0	0.11332	0.115	
	rs768748099	x A	144	8	0.00234	0.138	0,7
	óbito	ATT	2	0	0.13578	0.138	
	rs553744385	x CT	143	8	0.0042	0.185	0,7
óbito	C	3	0	0.1812	0.185		
rs52755855	x GG	145	8	9.96e-05	0.0284	0,9	
óbito	GT	1	0	2.82e-02	0.0284		
rs537265031	x GT	143	8	0.0016	0.114	0,7	
óbito	G	30		0.1122	0.114		
rs34325032	x CT	145	8	0.000168	0.0368	0,8	
óbito	C	1	0	0.036576	0.0368		
RAD51D	rs185961963	x TT	145	8	0.000581	0.0685	0,8
	óbito	TC	1	0	0.067890	0.0685	
	rs140825795	x GG	145	8	0.000259	0.0458	0,8
óbito	GC	1	0	0.045425	0.0458		
TP53	rs575313654	x GG	145	8	0.000581	0.0685	0,8
	óbito	GA	1	0	0.067890	0.0685	
	rs183276131	x CC	144	7	0.108	11.6	7e-04
	óbito	CT	2	1	11.438	11.6	
	rs752774596	x CTTT	144	8	0.00234	0.138	0,7
óbito	C	2	0	0.13578	0.138		
BARD1	c.1314+21T>A	x TT	108	7	0.184	0.719	0,4
	óbito	TA	38	1	0.535	0.719	
CDH1	rs930343696	x CA	110	6	0.00156	0.00657	0,9
	óbito	C	36	2	0.00500	0.00657	
	rs34212204	x TT	145	8	0.000259	0.0458	0,8
	óbito	TG	1	0	0.045425	0.0458	
	rs191798782	x GG	145	8	0.000393	0.0563	0,8
	óbito	GT	1	0	0.055842	0.0563	
	rs1360937602	x TT	145	8	0.000581	0.0685	0,8
	óbito	TC	1	0	0.067890	0.0685	
c.833-372G>A	x GG	144	7	0.108	11.2	8e-04	
óbito							

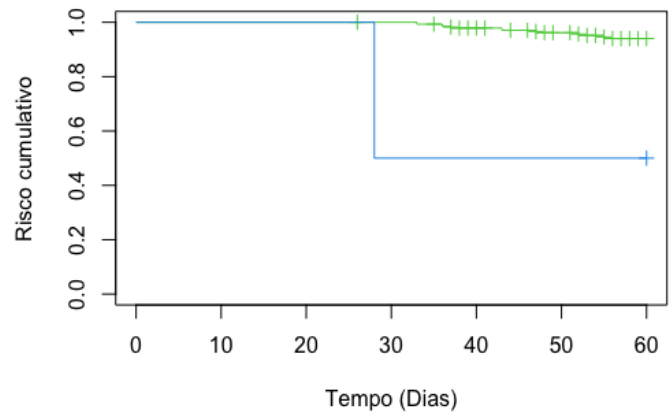
		GA	2	1	11.086	11.2	
CHEK2	rs914857068	x GA	131	8	0.0949	0.921	0,3
	óbito	G	15	0	0.8250	0.921	
	rs554779856	x AA	145	8	0.000581	0.0685	0,8
	óbito	AG	1	0	0.067890	0.0685	
	rs139885343	x GG	145	8	0.000259	0.0458	0,8
	óbito	GT	1	0	0.045425	0.0458	
	rs1482783928	x TT	145	8	9.96e-05	0.0284	0,9
	óbito	TC	1	0	2.82e-02	0.0284	
	rs890652695	x TT	145	8	9.96e-05	0.0284	0,9
	óbito	TG	1	0	2.82e-02	0.0284	
TP53	rs1481969887	x GG	144	7	0.105	9.45	0,02
	óbito	GT	2	1	9.335	9.45	
	c.1229del	x óbito ACT	145	8	0.000259	0.0458	0,8
		A_T	1	0	0.045425	0.0458	
TP53	rs1555526001	x CC	145	8	0.000581	0.0685	0,8
	óbito	CA	1	0	0.067890	0.0685	
PALB2	rs180177100	x CGA	145	8	0.000581	0.0685	0,8
	óbito	TGA	1	0	0.067890	0.0685	
	rs1336079225	x GG	145	8	0.000393	0.0563	0,8
	óbito	GA	1	0	0.055842	0.0563	
	rs773179377	x GG	145	8	0.000581	0.0685	0,8
	óbito	GA	1	0	0.067890	0.0685	
	rs773179377	x TT	145	8	0.000581	0.0685	0,8
	óbito	TC	1	0	0.067890	0.0685	
	rs1189941589	x CTTTTT	141	7	0.0734	2.39	0,1
óbito	C	5	1	2.3144	2.39		
PALB2	rs1039859397	x GG	142	8	0.00692	0.239	0,6
	óbito	GA	4	0	0.23184	0.239	

9.9. Anexo IX. Correlação das variantes com dados clínicos como óbito, grau histológico, idade e sobrevida. A análise foi ajustada levando em consideração idade, grau histológico, óbito e presença de mais de uma VUS ou variante patogênica.

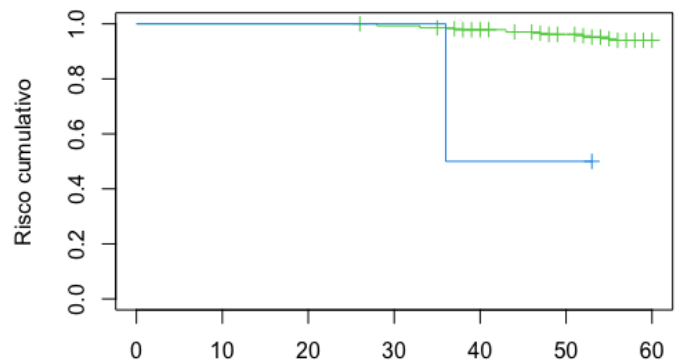
ATM - rs766101886 (IC= 9.679-359.7)
 p=4e-16. AA – verde, AG - azul



TP53 - rs183276131 (IC = 1.862-124.8)
 p= 7e-04. CC- verde, CT – azul



CDH1 - c.833-372G>A (IC= 1.807-126.9) p=8e-04, GG- verde, GA- azul



CHEK2 - rs1481969887 (IC= 1.564-104.7) p=0.002
 GG- verde, GA- azul

