



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

AMANDA DE ARAÚJO ROCHA

RASTREIO DE MUTAÇÃO DO GENE *BRCA1* EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA ATENDIDOS EM UMA UNIDADE DE SAÚDE DO ESTADO DO AMAZONAS

MANAUS
2019

AMANDA DE ARAÚJO ROCHA

**RASTREIO DE MUTAÇÃO DO GENE *BRCA1* EM PACIENTES COM CÂNCER DE
MAMA ATENDIDOS EM UMA UNIDADE DE SAÚDE DO ESTADO DO
AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

**Orientador: Prof^o Dr Cleiton Fantin Rezende
Coorientadora: Prof^a Dr Denise Correa Benzaquem**

**MANAUS
2019**



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPESP
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
DA AMAZÔNIA – PPGMBT

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DA
ALUNA AMANDA DE ARAÚJO ROCHA
EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA.

Aos vinte e nove dias do mês de março do ano de dois mil e dezenove às quatorze horas, realizou-se na Sala 3.1, localizada no 3º andar do prédio anexo da Escola Superior de Ciências da Saúde - ESA, situado na Avenida Carvalho Leal, n.º 1.777, Cachoeirinha, a Defesa Pública da dissertação de mestrado de Amanda de Araújo Rocha, sob o título “Rastreamento de Mutações do Gene BRCA1 em Pacientes com Câncer de Mama Atendidos na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON”, requisito exigido para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, tendo como orientador o Dr. Cleiton Fantin Rezende e coorientadora a Dra. Denise Corrêa Benzaquem, segundo encaminhamento da documentação à Coordenação do Curso e de acordo com os registros constantes na Secretaria Geral da Universidade do Estado do Amazonas - UEA. A banca examinadora foi constituída pelos seguintes professores: Dr. Cleiton Fantin Rezende, Dra. Fernanda Rodrigues Soares, Dr. Edson Junior do Carmo.

Após as arguições e encerrada a sessão de defesa, os referidos membros da banca emitiram o parecer final sobre a defesa da dissertação de mestrado, tendo a aluna sido

APROVADA.

Dr. Cleiton Fantin Rezende
CPF: 011830849-19

Dra. Fernanda Rodrigues Soares
CPF: 072.919.436-12

Dr. Edson Junior do Carmo
CPF: 000.297.201-84



GOVERNO DO ESTADO DO AMAZONAS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPESP
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ESA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
DA AMAZÔNIA – PPGMBT

Avaliação de Dissertação de Mestrado

Parecer Final

A banca examinadora da defesa pública da dissertação de mestrado de Amanda de Araújo Rocha, intitulada “Rastreamento de Mutação do Gene BRCA1 em Pacientes com Câncer de Mama Atendidos na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON”, tendo como presidente o Prof. Dr. Cleiton Fantin Rezende e como membros os professores: Dra. Fernanda Rodrigues Soares e Dr. Edson Junior do Carmo em sessão pública realizada aos vinte e nove dias do mês de março do ano de dois mil e dezenove às quatorze horas, realizou-se na Sala 3.1, localizada no 3º andar do prédio anexo da Escola Superior de Ciências da Saúde - ESA, situado na Avenida Carvalho Leal, n.º 1.777, Cachoeirinha, emitiu o seguinte parecer:

Considerações finais _____

Banca	Conceito	Assinatura
Dr. Cleiton Fantin Rezende	(X)Aprovado(a) () Reprovado(a)	
Dra. Fernanda Rodrigues Soares	(X)Aprovado(a) () Reprovado(a)	
Dr. Edson Junior do Carmo	(X)Aprovado(a) () Reprovado(a)	

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.

A484r Rocha, Amanda de Araújo
Rastreio de mutação do gene BRCA1 em pacientes com
câncer de mama atendidos em uma unidade de saúde do
Estado do Amazonas / Amanda de Araújo Rocha.
Manaus : [s.n], 2019.
61 f.: color.; 27 cm.

Dissertação - Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Recursos naturais da Amazônia -
Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.
Inclui bibliografia
Orientador: Cleiton Fantin Rezende
Coorientador: Denise Correa Benzaquem

1. Câncer de mama. 2. síndrome do cancer hereditário.
3. BRCA1. I. Cleiton Fantin Rezende (Orient.). II. Denise
Correa Benzaquem (Coorient.). III. Universidade do Estado
do Amazonas. IV. Rastreio de mutação do gene BRCA1 em
pacientes com câncer de mama atendidos em uma unidade
de saúde do Estado do Amazonas

*Dedico a meus pais,
Maria de Fátima e Fracisco Rocha*

*“Perchè tutto l'amore che prendi
Un giorno lo ridai”.*
Guilherme de Sá

AGRADECIMENTOS

A Deus!

A FAPEAM pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA.

Aos meus orientadores, Dr. Cleiton Fantin e Dra. Denise Benzaquem pela oportunidade, confiança e suporte nesses últimos anos.

A Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON) pelo espaço cedido para triagem dos participantes da pesquisa.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) por toda infraestrutura e apoio técnico necessário do Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM).

A minha mãe Maria de Fátima e meu padrasto Adriano Silva por todo apoio e amor incondicional.

A meu pai Francisco Rocha por todas as orações que fez por mim.

As minhas amigas Mayara Mâcedo, Karoline Monteiro e Esther Cavalcante pela amizade e companheirismo nesses anos.

Aos meus amigos “dos bastidores” Diana, Kledson e Naty! Vocês são pessoas incríveis que tive a oportunidade de conhecer! Obrigada por tudo o que vocês fizeram por mim.

Ao meu G.A por estarem comigo e orarem por mim para perseverar. Deus é bom o tempo todo!

A toda minha família, tios e primos, em especial a minha avó que mesmo não entendendo muito de todo esse processo, me apoiaram!

Ao meu cãopanheiro Salt por ficar comigo sempre! E ao meu gapanheiro tigrino por sempre subir no computador!

E todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma maneira para a minha formação!

O meu muito OBRIGADA!

RESUMO

O câncer de mama pode ser definido como uma doença heterogênea de caráter multifatorial, há uma série de fatores de risco reconhecidos para o desenvolvimento do câncer de mama, incluindo fatores hereditários, hormonais, idade, sedentarismo, álcool, radiação e obesidade. Mutações no gene *BRCA1* são responsáveis por 50% dos casos de câncer de mama hereditário. O objetivo desse estudo foi caracterizar um grupo de pacientes com câncer de mama atendidos na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON) quanto a fatores de risco para câncer de mama hereditário. Este estudo foi realizado no Laboratório de Proteômica e Genômica da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), utilizando sequenciamento direto de 8 éxons do gene *BRCA1*. Foram analisados 53 pacientes (51 mulheres e 2 homens) com idade variando entre 30 a 71 anos, a maioria destes pacientes nascidos no estado do Amazonas, com histórico familiar para predisposição e fator de risco hormonal. As alterações encontradas nos éxons estudados do gene foram verificadas em 3 bancos de dados *online* existentes para este gene (*ClinVar*, *BRCA Exchange* e *Varsome*). Foram identificadas o total de 4 tipos de mutações sendo elas mutação *missense* c.4304T>C éxon 13 (16 pacientes), mutação *missense* c.4837A>G éxon 16 (25 pacientes), mutação *frameshift* c.5266dupC éxon 20 (1 paciente) e mutação intrônica c.5277+48_5277+59dup (1 paciente). Dos 53 pacientes estudados 26 são portadores de mutações, onde apenas uma paciente apresentou a mutação fundadora Ashkenazi c.5266dupC, mutação esta já identificada em estudos genéticos na população brasileira, a mutação c.4837A>G foi frequente em 25 pacientes descartando a possibilidade de ser deletéria. Das mutações relatadas nesse estudo duas ainda não possuem dados sobre seus mecanismos moleculares na literatura, o que torna necessário estudos complementares, para se obter melhor entendimento da consequência dessas mutações no gene *BRCA1* na população brasileira e mundial. Portanto, acentua-se a importância de ampliar este estudo e estimular pesquisas futuras, para se refinar o conhecimento do padrão mutacional brasileiro para os genes de alta penetrância para o câncer de mama como o *BRCA1*.

Palavras chave: Câncer de mama, síndrome do cancer hereditário, *BRCA1*.

ABSTRACT

Breast cancer can be defined as a heterogeneous disease of multifactorial character, there are a number of risk factors for breast development, including hereditary factors, hormones, age, physical inactivity, alcohol, radiation and obesity. Mutations in the BRCA1 gene are responsible for 50% of hereditary breast cancer cases. The aim of this study was to characterize a group of patients treated at the Amazonas State Oncology Control Center Foundation (FCECON) regarding hereditary breast cancer risk factors. This study was carried out at the Proteomics and Genomics Laboratory of the EU, using direct sequencing of 8 exons of the BRCA1 gene. Patients with myocardial revascularization syndrome, with family history of predisposition and risk of hormonal life. Changes in gene data have been verified in existing databases for this gene (ClinVar, BRCA Exchange and Varsome). The 4 forms of mutation that are missense mutation c.4304T> C exon 13 (16 patients), missense mutation c.4837A> G exon 16 (25 patients), frameshift mutation c.5266dupC exon 20 (1 patient) and mutation were studied. intronic c.5277 + 48_5277 + 59dup (1 patient). Of the 53 patients studied, 26 had mutations, where only one patient had a disease-based mutation, a mutation of c.4837 A> G was frequent in 25 patients ruling out a possibility of being deleterious. As mutations have reported that studies have not yet had data on industry developments in the literature, which is particularly necessary so that they cannot have a BRCA1 gene in the Brazilian and worldwide population. Therefore, what is most important for the development of new future series is that the Brazilian knowledge pattern is mutational for high-capacity breast cancer genes such as BRCA1.

Key words: Breast cancer, hereditary cancer syndrome, BRCA1.

LISTA DE TABELAS

CAPITULO I

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para os éxons do gene *BRCA1*.

Tabela 2: Perfil de Temperatura para amplificar a Reação em Polimerase da Cadeia (PCR)

Tabela 3: Representação das etapas de temperatura da reação de sequenciamento de DNA

Tabela 4: Dados gerados através de sequenciamento direto dos éxons do gene *BRCA1*

Tabela 5: Alterações encontradas no gene *BRCA1*

Tabela 6: Distribuição das mutações em cada paciente com câncer de mama estudados

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração do tecido mamário, modificado de (ACS, 2016).

Figura 2: Taxa de incidência e mortalidade dos dez tipos de cânceres mais prevalentes no mundo, modificado de (GLOBOCAN, 2018).

Figura 3: Distribuição proporcional dos dez tipos de cânceres mais incidentes estimados para o Brasil em 2018/2019, por sexo, exceto câncer de pele não melanoma, modificado de (INCA, 2018).

Figura 4: Taxas brutas de incidência de cânceres estimadas para 2018 por sexo, para o estado do Amazonas, modificado de (INCA, 2018a).

Figura 5: Estrutura do gene *BRCA1*, modificado do Banco de dados do câncer de mama (BIC, 2019).

Figura 6: Estrutura da proteína *BRCA1* e seus domínios funcionais, modificado de Narod e Foulkes, 2004.

CAPITULO I

Figura 1: Repetição do sequenciamento da paciente A05 que apresentou mudança em sua sequência.

Figura 2: A) Eletroferograma mostrando a mutação *missense* c.4304A>G no éxon 13 do gene *BRCA1*. **B)** Eletroferograma sem alteração do mesmo éxon (sinalizado com uma seta).

Figura 3: A) Eletroferograma mostrando a mutação *missense* c.4837A>G no éxon 16 do gene *BRCA1*. **B)** Eletroferograma sem alteração do mesmo éxon (sinalizado com uma seta).

Figura 4: A) Eletroferograma mostrando a mutação intrônica c.5277+48_5277+59dup do gene *BRCA1*. A inserção de 12 pares de bases forma sobreposição nos picos no restante da leitura.

B) Eletroferograma sem alteração do mesmo éxon (sinalizado com uma seta).

Figura 5: A) Eletroferograma mostrando a mutação *missense* c.4304A>G no éxon 13 do gene *BRCA1*. **B)** Eletroferograma mostrando a mutação *missense* c.4837A>G no éxon 16 do gene *BRCA1*. **C)** Eletroferograma mostrando a mutação intrônica c.5277+48_5277+59dup do gene *BRCA1*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C - graus Celsius

ACS- American Cancer Society

ASP- Aspartato

ASCO- Sociedade Americana De Oncologia Clinica

ATM - *Ataxia telangiectasia mutated*

BIC - Breast cancer Information Core

BRCA 1- *Breast Cancer 1*

BRCA2- *Breast Cancer 2*

BRIP 1- *Helicase C-terminal de proteína de interação com BRCA1 1*

BRCT - *BRCA1 C-TERMINAL*

CDH1- *Cadherin-1*

CHEK2- *Checkpointquinase 2*

CM- câncer de mama

dbSNP- *Short Genetic Variations database*

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid / ácido etilendiamino tetra-acético

FCECON- Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas

FGFR2- *Fibroblast growth factor receptor 2*

GLY- *Glicina*

HBOC - Hereditary Breast and Ovarian Cancer (Síndrome hereditária do câncer de mama e ovário)

HER2 - Human Epidermal growth factor receptor 2

HGVS- *Human Genome Variation Society*

IHQ- imuno-histoquímica

INCA -Instituto Nacional do Câncer

LPS- Lipopolysaccharides

MA- Mamografia

MAP3K1- mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1, E3 ubiquitin protein ligase

MS- Ministério da Saúde Brasil

NCBI- *National Center for Biotechnology Information*

NCCN- National Comprehensive Cancer Network

OMS- Organização Mundial de Saúde

OPAS- Organização Pan Americana da Saúde

PALB2- *Partner and localizer of BRCA2*

pb- *Pares de bases*

PCR- Reação em cadeia da polimerase

PTEN- *Phosphatase and tensin homolog*

RE -Receptores para estrógeno

RM- Ressonância magnética

RP- Progesterona

SER- Serina

STK11- *Serine/threonine kinase 11*

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TP53- *Tumor Protein53*

TNRC9- *Trinucleotide-repeat-containing 9*

US - Ultrassonografia

V- Volts

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	Câncer de mama	18
2.2	Fatores de risco	21
2.3	Gene <i>Breast Cancer 1</i>	24
2.4	Mutações germinativas em genes supressores de tumor	25
2.5	Mecanismos de investigação do câncer de mama	27
2.6	Estudos genéticos sobre o gene <i>BRCA1</i> no Brasil	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	Geral	31
3.2	Específicos	31
4	CAPÍTULO I	32
6	REFERÊNCIAS	55
	ANEXO I	64
	TCLE	64
	ANEXO II	65
	Parecer Consubstanciado do CEP	65

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um grupo de doenças complexas, com comportamentos diferentes, conforme o tipo celular do qual se originam. As doenças que compõem o câncer variam em sua idade de início, velocidade de desenvolvimento, capacidade invasiva e de reposta ao tratamento e em seu prognóstico (INCA, 2019).

Classificam-se como principais tipos de tumores os sarcomas, nos quais o tumor surge em um tecido mesenquimal, como o osso, músculo ou tecido conjuntivo; os carcinomas, que se originam de tecido epitelial, como as células que revestem os intestinos, os brônquios ou os ductos das mamas; os linfomas que atingem o tecido linfático; os gliomas que afetam as células gliais do sistema nervoso central (SNC) e leucemias que acometem órgãos hematopoiéticos (THOMPSON e THOMPSON, 2007).

O surgimento do câncer está diretamente relacionado a mutações que ocorrem em genes que controlam o funcionamento celular e pode ter origem hereditária ou esporádica, cerca de 5-10% dos casos são hereditários onde a mutação inicial causadora do câncer é herdada através de linhagem germinativa, portanto já presente em cada célula do corpo. Cerca de 90% dos cânceres são causados por fatores esporádicos onde as mutações ocorrem em uma célula somática que então se divide e prossegue para desenvolver o câncer (ALVARENGA et al., 2003; THOMPSON e THOMPSON, 2007; BORGES-OSÓRIO e ROBINSON, 2013).

Mundialmente os cânceres são responsáveis por uma em cada seis mortes, ocasionando no ano de 2018 cerca de 9,6 milhões de mortes, estimativas apontam que mais de 14 milhões de pessoas desenvolvem câncer todos os anos e a projeção é que esse número cresça para mais de 21 milhões em 2030. Na região das Américas, quase 3 milhões de pessoas manifestam câncer a cada ano, valor que se elevaria a 4,5 milhões em 2030 (OPAS, 2018).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer de mama

O câncer de mama (CM) atinge a glândula mamária que é um órgão par que está situado na parede anterior e superior do tórax e está apoiado no músculo peitoral maior. É composta por lóbulos (glândulas produtoras de leite), ductos (pequenos tubos que transportam o leite dos lóbulos ao mamilo) e estroma (tecido adiposo e tecido conjuntivo que envolve os ductos e lobos, vasos sanguíneos e vasos linfáticos) (figura 1) (ACS, 2016).

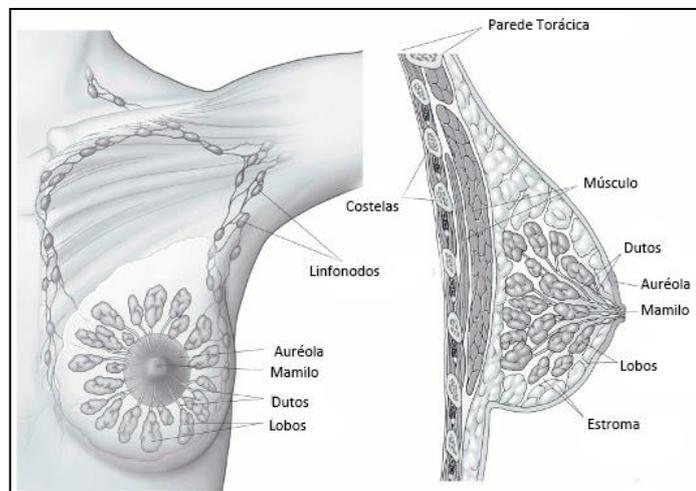


Figura 1: Ilustração do tecido mamário, modificado de (ACS, 2016).

A fase inicial da doença pode ser percebida, na maioria dos casos, por meio dos seguintes sinais e sintomas: Nódulo (caroço) fixo e geralmente indolor: é a principal manifestação da doença, estando presente em cerca de 90% dos casos quando o câncer é percebido pela própria mulher; pele da mama avermelhada, retraída ou parecida com casca de laranja; alterações no mamilo (bico do peito); pequenos nódulos nas axilas ou no pescoço; saída espontânea de líquido anormal pelos mamilos (INCA, 2018).

É provavelmente o tipo de câncer mais temido pelas mulheres, devido à sua alta frequência e, sobretudo, pelos seus efeitos psicológicos, que afetam a percepção da sua sexualidade, autoestima e estética, entretanto esse câncer pode afetar homens, porém é mais raro, apenas 1% do total de casos da doença. Em 2018, correspondeu a 24,2% de todos os novos cânceres diagnosticado em mulheres. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de casos novos tem

crescido globalmente, estima-se que de 2018 a 2040 haja um aumento na incidência do CM de 46,3% elevando o número de mortes de 7.9 milhões para 13 milhões anualmente (Figura 2) (GLOBOCAN, 2018; ABREU; KOIFMAN, 2002).

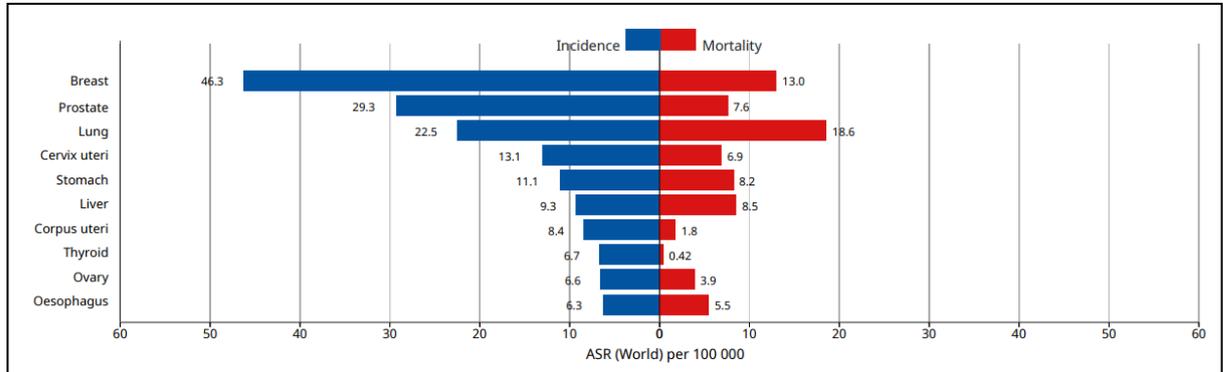


Figura 2: Taxa de incidência e mortalidade dos dez tipos de cânceres mais prevalentes no mundo, modificado de (GLOBOCAN, 2018).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer, a estimativa para o Brasil, biênio 2018/2019 aponta que ocorrerão cerca de 640 mil novos casos de câncer para cada ano. Desses novos casos cerca de 59.700 sejam relacionados ao CM, que corresponde a 29,5%, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2018) (Figura 3).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 3: Distribuição proporcional dos dez tipos de cânceres mais incidentes estimados para o Brasil em 2018/2019, por sexo, exceto câncer de pele não melanoma, modificado de (INCA, 2018).

No que diz respeito a incidência da doença na região Norte do Brasil, o CM é o segundo mais frequente entre as mulheres, sendo o primeiro o câncer de colo de útero. Para o biênio de 2018/2019 estima-se que ocorra 1.730 novos casos a cada 100 mil mulheres. Mais especificamente para o estado do Amazonas, a taxa de ocorrência estimada para 2018/2019 é de 420 novos casos de CM a cada 100 mil mulheres (Figura 4) (INCA, 2018).

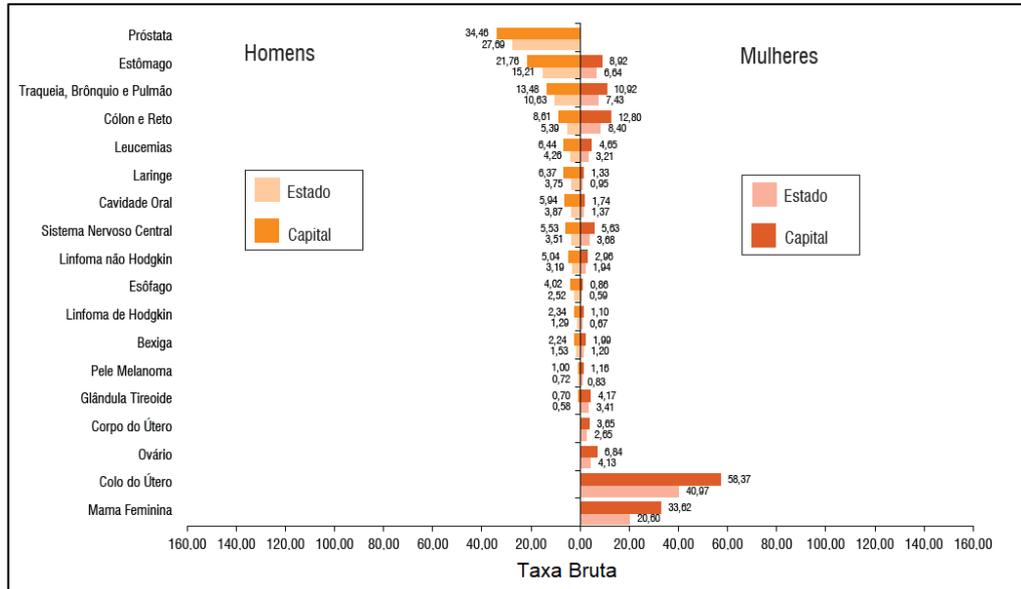


Figura 4: Taxas brutas de incidência de cânceres estimadas para 2018 por sexo, para o estado do Amazonas, modificado de (INCA, 2018a).

O câncer de mama também ocorre entre os homens, no entanto esta condição é extremamente rara, e é responsável por 1% dos cânceres masculinos e pode estar relacionado a mutações tanto no gene BRC1 como BRCA2, este último chega a ser responsável por 10% do risco de chances de um homem portador desenvolver câncer de mama em algum momento da vida. Levando-se em consideração a população masculina em geral para o surgimento de qualquer tipo de câncer, pode-se considerar que este risco é elevado. Os estudos sobre o câncer de mama masculino ainda são escassos, e o diagnóstico e tratamentos ainda são realizados baseados em estudos com câncer de mama feminino (TAI & PARMIGIANI, 2007; CASTRO & EELES, 2012; SIEGEL et al., 2012; RIZZOLO et al., 2013; KOTE-JARAI et al., 2011;).

A maioria dos CM são carcinomas, e podem ser adenocarcinoma, que é o carcinoma que se origina nas células do tecido glandular. De acordo com a morfologia das células cancerígenas, o CM pode ser classificado em diferentes tipos histológicos, entre eles o carcinoma ductal invasivo (CDI), é o que ocorre com maior prevalência, corresponde a 50-80% dos tumores diagnosticados, iniciando-se nos ductos podendo desenvolver metástase, seguido pelo carcinoma lobular invasivo (CLI) que representa de 5-15% dos tumores, ocorre inicialmente nos lóbulos podendo desenvolver câncer na outra mama ou nos ovários. Os carcinomas *in situ* ocorrem em uma menor proporção e caracterizam-se por não invadir os tecidos adjacentes, nesse caso é

considerada uma forma inicial da neoplasia (GOBBI et al., 2012; WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010; YERUSHALMI; HAYES; GELMON, 2009).

De acordo com o grau histológico, o sistema de classificação Bloom–Richardson–Elston, criado em 1957, atualizado e, atualmente, denominado como *Nottingham Histologic Score*, sugere que a classificação dos carcinomas de mama seja determinada pela formação de túbulo, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica, podendo-se atribuir até 3 pontos para cada aspecto analisado. Desta forma, o escore correspondente a soma dos 3 aspectos corresponderá ao grau histológico do tumor, sendo os seguintes: (a) Escores de 3 a 5: tumores de grau I, os quais são bem diferenciados e de bom prognóstico; escores 6 e 7: tumores de grau II, moderadamente diferenciados e de prognóstico intermediário; (c) escores 8 e 9: tumores de grau III, pobremente diferenciados e de pior prognóstico (BLOOM; RICHARDSON, 1957; RAKHA et al., 2014).

Os tumores de mama ainda podem ser classificados de acordo com a presença de receptores hormonais na membrana das células tumorais determinada por caracterização imuno-histoquímica (IHQ). Para esta classificação, analisa-se a presença dos receptores para estrógeno (RE), progesterona (RP) e HER2 (Human Epidermal growth factor receptor 2). Os tumores denominados triplo-negativos, que correspondem a 15-20% dos tumores de mama invasivos, são aqueles que não expressam nenhum destes receptores (HURVITZ; MEAD, 2015; PALMA et al., 2015; YADAV, 2015)

2.2 Fatores de risco

Alguns fatores biológicos de risco estão bem estabelecidos e envolvem: idade, características da vida reprodutiva da mulher (tempo de exposição ao estrógeno), densidade do tecido mamário, história familiar e presença de alterações genéticas. Com relação aos fatores de risco que dizem respeito aos hábitos de vida estão a nutrição, o sedentarismo, o uso de álcool, o tabaco e a exposição à radiação ionizante em mulheres mais jovens (M. S., 2014).

Os fatores relacionados à exposição ao estrogênio no decorrer da vida de uma mulher que podem influenciar no risco de CM são, antecipação da menarca (idade da primeira menstruação menor que 12 anos), menopausa tardia (após os 55 anos), primeira gravidez após os 30 anos, nuliparidade (não ter tido filhos), diminuição de

gestações e amamentação, e uso de contraceptivos orais e de terapia de reposição hormonal pós-menopausa, especialmente se por tempo prolongado (KEY; VERKASALO; BANKS, 2001).

Quanto a presença de fatores genéticos, os casos de CM podem ser classificados em esporádicos ou hereditários. Os cânceres do tipo esporádico correspondem a cerca de 90% dos casos de CM em todo o mundo, não apresenta, na maioria dos casos, um diagnóstico precoce, além do fato de o paciente não possuir histórico familiar para câncer. Recebem esta denominação por serem ocasionados por mutações esporádicas em células somáticas e/ou tumorais, não estando relacionado com a presença de mutações germinativas em genes relacionados com o desenvolvimento da doença (NCCN, 2016).

Por outro lado, o CM considerado hereditário, também denominado de Síndrome hereditária do câncer de mama e ovário, do inglês Hereditary Breast and Ovarian Cancer - HBOC, caracteriza-se pela presença de mutações germinativas associadas com uma maior probabilidade ao desenvolvimento da doença, além de um forte histórico familiar para CM e de outros tipos, como próstata e ovário. O diagnóstico é, em grande parte dos casos, precoce, e, ao submeter o paciente e seus familiares a testes genéticos, é observado um padrão de herança autossômica dominante (NCCN, 2016).

O CM hereditário foi inicialmente mencionado pelo francês Paul Broca o qual mostrou 10 casos de mulheres que foram diagnosticadas com CM, juntamente com outros casos de cânceres em suas respectivas famílias em quatro gerações consecutivas (BROCA, 1866). Estudos posteriores confirmaram a associação entre história familiar e a predisposição aumentada ao CM (OTTMAN et al. 1983; KOZAK et al. 1986; EISINGER et al. 1998).

Gradativamente a complexidade da herança genética do CM é reconhecida, a penetrância dos genes de susceptibilidade ao CM pode ser classificada em três grupos (genes de alta, moderada e baixa penetrância), de acordo com a frequência de indivíduos portadores de uma mutação patogênica que desenvolve o CM ao longo da vida (FOULKES, 2008).

O CM hereditário possui achados clínicos distintos: a idade de acometimento é consideravelmente precoce em relação ao câncer esporádico; maior prevalência de bilateralidade; e a associação com outros tipos de tumores em famílias afetadas, como câncer de ovário e próstata (BLACKWOOD; WEBER, 1998).

Segundo a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO), famílias que apresentem um ou mais dos critérios listados abaixo são classificadas clinicamente como portadoras da Síndrome Hereditária do Câncer de Mama e Ovário e deverão ser acompanhadas de forma adequada. Os critérios propostos pela ASCO são:

- Três ou mais casos de câncer de mama e um caso de câncer de ovário em qualquer idade ou;
- Mais de três casos de câncer de mama em idade menor ou igual a 50 anos ou;
- Irmãs (ou mãe e filha) com uma das seguintes combinações de tumores diagnosticados em idade inferior a 50 anos:
 - Dois casos de câncer de mama ou;
 - Dois casos de câncer de ovário ou;
 - Um caso de câncer de mama mais um caso de câncer de ovário (ASCO, 2015).

Além dos critérios preconizados pela ASCO, existem os critérios propostos pela National Comprehensive Cancer Network (NCCN), que são mais abrangentes que os propostos pela ASCO e incluem:

- Família com mutação detectada em *BRCA1* e *BRCA2*;
- História pessoal de câncer de mama associada a um ou mais dos seguintes critérios:
 - Diagnóstico antes dos 45 anos;
 - Diagnóstico antes dos 50 anos com segundo tumor primário;
 - Um ou mais familiares com câncer de mama em qualquer idade.
 - Diagnóstico antes dos 60 anos com:
 - Câncer de mama triplo negativo.
 - Diagnóstico em qualquer idade com:
 - Um ou mais familiares com câncer de mama antes dos 50 anos;
 - Dois ou mais familiares com câncer de mama em qualquer idade;
 - Um ou mais familiares com câncer de ovário epitelial;
 - Dois ou mais familiares com câncer de pâncreas e/ou câncer de próstata em qualquer idade;
 - Um caso de câncer de mama masculino;
 - Ascendência étnica associada a uma alta frequência de mutações deletérias.
 - História pessoal de câncer de ovário do tipo epitelial.
 - História pessoal de câncer de mama masculino.

- História pessoal de câncer de pâncreas ou próstata em qualquer idade com 2 ou mais familiares com câncer de mama e/ou ovário e/ou pâncreas ou próstata em qualquer idade (NCCN, 2016).

2.3 Gene *Breast Cancer 1*

Um dos primeiros genes de predisposição ao CM a ser mapeado foi o *BRCA1* estudado por Hall e colaboradores, em 1990 a partir de análises de ligação envolvendo famílias com numerosos casos de CM, sendo caracterizado, quatro anos mais tarde por Miki e colaboradores, em 1994.

O *BRCA1* é um gene supressor tumoral localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21), constituído por mais de 81kb, distribuídos em 24 éxons dos quais 22 codificam uma proteína com 1.863 aminoácidos com peso molecular de 220kd (os éxons 1 e 4 não codantes) (figura 5). Tem como função evitar a formação de tumores através do reparo de DNA. A proteína codificada pelo gene interage com inúmeras proteínas para reparar as quebras no DNA, no entanto quando não realizam o reparo induzem a apoptose celular (ECONOMOPOULOU; DIMITRIADIS; PSYRRI, 2015; HALL et al., 1990; LYNCH; SNYDER; CASEY, 2013; MIKI et al., 1994).

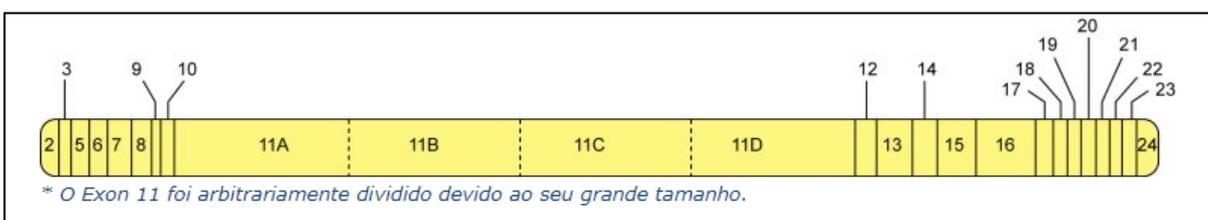


Figura 5: Estrutura do gene *BRCA1*, modificado do Banco de dados do câncer de mama (BIC, 2019).

A proteína codificada pelo gene *BRCA1* possui um domínio dedo-de-zinco (*zinc finger* ou *ring finger domain*) importante para a atividade de degradação via ubiquitina-ligase e interação com outras proteínas na porção amino-terminal. Além disso, dois domínios de localização nuclear importantes para a interação com proteínas de controle do ciclo celular, como a p53, um domínio de ligação ao DNA na região central da proteína que permite a checagem do ciclo celular, uma região SCD (*cluster*) de seqüências de serinas e treoninas importantes para a fosforilação de ATM, e na porção carboxi-terminal, dois domínios BRCT (*BRCA1 C-terminal*) formados por

aminoácidos de carga negativa e importantes para a manutenção da estabilidade da proteína e processos de transcrição celular (figura 6). Por meio destes domínios, o *BRCA1* forma complexos com diversas proteínas, participando de múltiplas funções celulares, tais como transcrição, regulação, ativação dos pontos de checagem do ciclo celular e na via de reparo de DNA por recombinação homóloga (NAROD; FOULKES, 2004; VENKITARAMAN, 2014).



Figura 6: Estrutura da proteína *BRCA1* e seus domínios funcionais, modificado de Narod e Foulkes, 2004.

Quando sofre alguma mutação o gene *BRCA1*, perde sua capacidade de suprimir o surgimento de tumores, deixando o indivíduo mais exposto ao desenvolvimento de cânceres, como as neoplasias de mama e ovário, próstata, pâncreas, tireóide e intestino (CORNEJO-MORENO; URIBE-ESCAMILLA; SALAMANCA-GÓMEZ, 2014). De acordo com Kourou (2015) a prevalência de mutações *BRCA1* e *BRCA2* variam significativamente entre países e etnias, mas o mais relevante é a identificação destes polimorfismos para possibilitar um tratamento preventivo ao câncer.

O CM é considerado uma doença de bom prognóstico quando diagnosticado e tratado adequadamente, entretanto, ainda apresenta taxa de mortalidade elevada no Brasil. Isto se deve pelo fato de a doença ainda ser diagnosticada em estágios avançados, retardando a implementação do tratamento satisfatório o qual, resulta no retardo do desenvolvimento da doença e, até mesmo, na cura, permanecendo o paciente sob acompanhamento médico por alguns anos após a finalização do tratamento (TIMOTEO, 2016).

2.4 Mutações germinativas em genes supressores de tumor

As mutações germinativas são associadas aos cânceres hereditários e, são alterações genéticas que ocorrem nas células germinativas progenitoras e são

herdadas pela prole. As mutações podem ser gênicas ou cromossômicas de acordo com seu efeito na sequência nucleotídica ou na estrutura do cromossomo, respectivamente. As mutações gênicas são modificações na sequência de nucleotídeos de determinado gene e podem ser classificadas de acordo com diversos aspectos, como efeito na síntese proteica e significância clínica. A partir de seu efeito na síntese da proteína, podem ser dos seguintes tipos: **Mutação por perda de sentido (missense)** acarretada pela substituição de um nucleotídeo que dependendo de sua natureza química (purina ou pirimidina) terá um efeito mais grave ou não na função da proteína; **Mutação sem sentido (nonsense)** a substituição de um nucleotídeo adiciona um códon de parada prematuro, gerando uma proteína truncada; **Mutação por mudança do quadro de leitura (frameshift)** provocada por indels (inserção ou deleção) de um ou mais nucleotídeos (NCCN, 2016; PIERCE, 2016).

Conforme sua significância clínica, as mutações podem ser denominadas da seguinte forma: **Variantes patogênicas**: alterações na sequência nucleotídica considerada de significância clínica patogênica; **Variantes provavelmente patogênicas**: variantes não reportadas pelos bancos de dados, mas que, por seu tipo, podem ser patogênicas (nonsense e frameshift); **Variantes de significância incerta ou VUS (Variation of Uncertain Significance)**: variantes que não possuem informação suficiente sobre seu efeito ou apresentam informação conflitua em mais de um banco de dados. Desta forma, a presença desta variante não justifica a adoção de intervenções cirúrgicas redutoras de risco; **Variante provavelmente benigna**: variantes não reportadas pelos bancos de dados. Geralmente, são variantes para as quais não foi reconhecida ou não se espera nenhuma patogenicidade (silenciosas, intrônicas); **Variantes benignas**: variantes testadas e reportadas pelos bancos de dados como benignas (LI et al., 2017; WALLIS et al., 2013).

Estima-se que cerca de 20% das mutações que predisõem a HBOC ocorram nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (*Breast Cancer 1/2*) que são responsáveis pela maioria das famílias de alto risco ao câncer de mama precoce e são genes supressores tumorais e estão envolvidos nas etapas de reparo, replicação e transcrição do DNA. Os portadores de mutações da linhagem germinativa em qualquer um desses dois genes possuem um risco cumulativo de desenvolver a doença em até 85% e um risco de desenvolver câncer de ovário em até 45%. Outros genes importantes que estão associados ao risco aumentado para o carcinoma de mama e ovário são: *TP53*(*Tumor*

Protein53) e *CHEK2* (*Checkpointquinase 2*) (REBBECK et al., 2015; RICH et al., 2015).

2.5 Mecanismos de investigação do câncer de mama

Os métodos de diagnósticos mais utilizados no processo carcinogênico mamário são: mamografia (MA), ultrassonografia (US) e ressonância magnética (RM), o mais usado para o rastreamento e diagnóstico precoce é a MA. O exame mamográfico é realizado a partir de aparelhos de baixa intensidade de emissão de raios-x. A mama é comprimida sob um receptor de imagem (podendo ser de filme ou digital) e uma base transparente de compressão da mama. Os raios-x não absorvidos marcam o filme ou são revelados pelo detector digital produzindo uma fotografia similar a um negativo (DELMONICO; ALVES; AMARAL, 2015; HEYWANG-KÖBRUNNER et al., 2008).

A US tornou-se o exame mais sensível para o diagnóstico das doenças mamárias, com sensibilidade de 92%, a técnica baseia-se nos transdutores de ondas com frequência média que varia de 5 para 15 MHz. Permite uma visualização em profundidade do tecido analisado e sua resolução garante a aplicação da técnica em mamas densas e em estágio de lactação (TEJERINA BERNAL et al., 2012).

A RM atualmente é uma técnica utilizada para o acompanhamento do estadiamento local e vigilância da lesão mamária. Possui sensibilidade superior, ou mesmo equiparada à US, e especificidade inferior aos demais exames (LEHMAN, 2010).

No Brasil o CM ainda possui uma taxa de mortalidade elevada, muito provavelmente por que a doença tem o diagnóstico em estágio avançado. Os métodos de diagnóstico ficaram mais modernos e específicos, desde imagiologia até técnicas de biologia molecular, o que tem permitido um diagnóstico apurado, acompanhamento adequado e avaliação de prognósticos (NASCIMENTO; PITTA; RÊGO, 2015).

Nos últimos anos o desenvolvimento de biomarcadores em oncologia vêm desempenhando papel fundamental na compreensão dos mecanismos moleculares e celulares que conduzem ao crescimento e a progressão do tumor. O diagnóstico molecular e a identificação de novos marcadores estão avançando rapidamente à medida que são elucidados os mecanismos que induzem a transformação de uma célula normal em uma célula tumoral. Devido aos avanços moleculares foram

desenvolvidos novos alvos terapêuticos bem como novas estratégias de tratamento (KALIA, 2015).

Das novas metodologias que vem sendo desenvolvidas merecem destaques as que elucidam mecanismos envolvendo genes da regulação e diferenciação celular. Entre as principais alterações da carcinogênese podem ser citadas: a expressão aumentada de oncogenes, inibição de supressores tumorais, instabilidades cromossômicas, alterações epigenéticas, alterações nas vias de reparo, entre outras (DELMONICO; ALVES; AMARAL, 2015).

Os marcadores oncogênicos, são em sua grande maioria genes que codificam proteínas que atuam como supressores tumorais, pois tem função na reparação do DNA, além de controlar a proliferação e morte celular programada (apoptose), ou ambos impedindo o surgimento de tumores. Mutações nestes genes resultam na predisposição e até mesmo no desenvolvimento de CM precoce (BAGCI; KURTGÖZ, 2015).

A pesquisa de mutações germinativas em *BRCA1* é considerada como laboriosa, de alta complexidade e cara. Essa dificuldade deve-se, principalmente, ao tamanho do gene e extensa heterogeneidade molecular que a doença apresenta. Com raríssimas exceções (ex. população de judeus Ashkenazi), o gene *BRCA1* não possui *hotspots*, de forma que toda a extensão do gene deve ser analisada. Mais de 4.000 alterações pontuais e grandes rearranjos gênicos já foram descritos no gene (SCHWEIGER et al., 2011).

O padrão para a detecção de mutações se baseava no sequenciamento bidirecional convencional desenvolvido por Sanger e Coulson em 1975, que consistia em uma reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se uma fita molde de DNA, um *primer* (iniciador) específico para a sequência nucleotídica que se deseja analisar, desoxinucleotídeos marcados com ^{32}P ou ^{35}S , dideoxinucleotídeos e uma DNA polimerase. Durante a reação de síntese da nova molécula de DNA, a incorporação de dideoxinucleotídeos inibe a atividade da DNA polimerase, gerando produtos de diferentes tamanhos que, após serem submetidos a separação em gel de agarose, eram analisados por radiografia por meio da marcação dos nucleotídeos com isótopos radioativos (TIMOTEO, 2016).

No sequenciamento automático, os nucleotídeos passaram a ser marcados com fluorocromos distintos que ao serem excitados por um laser emitem luz em diferentes comprimentos de onda, os quais são detectados por um fotomultiplicador e

a informação gerada é processada através de um computador, através dessa técnica cada gene é analisado de forma individual. (HERMAN et al., 2012).

2.6 Estudos genéticos sobre o gene *BRCA1* no Brasil

Após o gene *BRCA1* ser mapeado, surgiu um grande interesse na identificação de pacientes com predisposição para câncer hereditário e que poderiam ser encaminhados para um serviço de apoio. Este se inicia na identificação dos indivíduos acometidos, sendo necessárias várias sessões pré e pós-teste genético para esclarecer as possibilidades. O conhecimento do grau de risco é importante para as decisões quanto à realização ou não do teste genético, indicação de condutas de rastreamento clínico e uso de medidas de prevenção (LOESCHER, 1999).

A abordagem mais comumente utilizada para se encontrar indivíduos com alto risco de serem portadores de mutações deletérias que predispõem ao câncer é a de analisar indivíduos selecionados com base no número e no grau de parentesco e familiares com câncer, idade de diagnóstico de tumores de mama nos indivíduos e a existência de outros tumores (ESCOBAR, 2011).

O estudo realizado no Brasil por Dufloth e colaboradores (2005) analisando mutações nos éxons 2, 3, 5, 11 e 20 do gene *BRCA1* e 10 e 11 do gene *BRCA2* em 30 mulheres e 1 homem com CM no Estado de São Paulo com histórico familiar confirmado, relataram a presença de uma mutação no gene *BRCA1* e três em *BRCA2*. Este estudo indicou que o rastreio mutacional restrito a mutações predominantes mundialmente, que foram previamente descritos na literatura, não pode ser recomendado na população brasileira. A população brasileira, como a população dos Estados Unidos, é etnicamente mista, e as mutações fundadoras são, portanto, raras ou mesmo ausentes.

Gomes e colaboradores (2011) publicaram um estudo com 402 mulheres com CM escolhidos aleatoriamente no estado do Rio de Janeiro, em que investigaram quanto à presença de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. No total foram identificadas nove mutações, seis no *BRCA1* e três no *BRCA2*, representando 2,3% do total de pacientes. A mutação mais frequente foi a 5382insC (descrita como c.5266dupC) no *BRCA1* presente em cinco pacientes, correspondendo a 56% das mutações identificadas.

Um estudo realizado por Carraro e colaboradores (2013) com um grupo de 54 mulheres brasileiras com CM triplo negativo com menos de 35 anos, atendidas no Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa do Câncer (A.C.Camargo) e em outras instituições, onde o resultado do rastreamento no gene *BRCA1* indicou que 50% das mulheres com tumores triplo negativo apresentavam mutações germinativas nesse gene. De acordo com os autores da pesquisa, o CM triplo negativo é bastante agressivo e corresponde a, aproximadamente, 20% dos casos de CM. Esse subtipo de CM está associado com mutações no gene *BRCA1*.

Silva Felicio e colaboradores (2017) relataram a caracterização genética e da epigenética do gene *BRCA1* em mulheres brasileiras em situação de risco para o CM hereditário, sobre suas características clínicas e moleculares (mutação e metilação no gene *BRCA1*), testando possíveis associações com características patológicas e morfológicas do CM. A maioria dos tumores mutantes era triplo negativo e tinham grau histológico III. Em relação ao perfil de metilação, foi observada em apenas dois pacientes e nenhum teve associação com a mutação patológica no gene *BRCA1*. Não foi encontrada associação entre os níveis de *BRCA1*, a expressão do gene e a história familiar de câncer.

Embora, o panorama de frequência e prevalência das mutações germinativas deletérias na população brasileira não esteja claro, observa-se que nos últimos anos estudos estão sendo realizados e publicados, o que demonstra um interesse em modificar este cenário de falta de conhecimento no Brasil (SILVA et al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Caracterizar um grupo de pacientes com câncer de mama atendidos na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON) quanto a fatores de risco genético para câncer de mama hereditário.

3.2 Específicos

- Verificar a presença de mutações nos pacientes atendidos na FCECON.
- Identificar as mutações presentes em 8 éxons do gene *BRCA1*, em pacientes com câncer de mama, através de sequenciamento direto.
- Classificar as mutações encontradas de acordo com o banco de dados do *ClinVar*, *BRCA Exchange* e *Varsome*.
- Comparar as mutações presentes nos pacientes estudados com as mutações já descritas na população brasileira.

4. CAPÍTULO I

Identificação de mutações germinativas em 8 éxons do Gene *BRCA1* em pacientes com câncer de mama no Estado do Amazonas, utilizando sequenciamento direto.

Identificação de mutações germinativas em 8 éxons do gene *BRCA1* em pacientes com câncer de mama no Estado do Amazonas, utilizando sequenciamento direto.

Rocha, A.A.; Benzaquem, D.C.; Fantin, C

Grupo de pesquisa em Genética Molecular e Citogenética, Laboratório de Biologia Molecular, Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Avenida Carvalho Leal 1777 - Cachoeirinha, Manaus, Brasil.

Resumo

O câncer de mama pode ser definido como uma doença heterogênea de caráter multifatorial, há uma série de fatores de risco reconhecidos para o desenvolvimento do câncer de mama, incluindo fatores hereditários, hormonais, idade, sedentarismo, álcool, radiação e obesidade. Mutações no gene *BRCA1* são responsáveis por 50% dos casos de câncer de mama hereditário. O objetivo desse estudo foi caracterizar um grupo de pacientes com câncer de mama atendidos na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON) quanto a fatores de risco para câncer de mama hereditário. Este estudo foi realizado no Laboratório de Proteômica e Genômica da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), utilizando sequenciamento direto de 8 éxons do gene *BRCA1*. Foram analisados 53 pacientes (51 mulheres e 2 homens) com idade variando entre 30 a 71 anos, a maioria destes pacientes nascidos no estado do Amazonas, com histórico familiar para predisposição e fator de risco hormonal. As alterações encontradas nos éxons estudados do gene foram verificadas em 3 bancos de dados *online* existentes para este gene (*ClinVar*, *BRCA Exchange* e *Varsome*). Foram identificadas o total de 4 tipos de mutações sendo elas mutação *missense* c.4304T>C éxon 13 (16 pacientes), mutação *missense* c.4837A>G éxon 16 (25 pacientes), mutação *frameshift* c.5266dupC éxon 20 (1 paciente) e mutação *intrônica* c.5277+48_5277+59dup (1 paciente). Dos 53 pacientes estudados 26 são portadores de mutações, onde apenas uma paciente apresentou a mutação fundadora Ashkenazi c.5266dupC, mutação esta já identificada em estudos genéticos na população brasileira, a mutação c.4837A>G foi frequente em 25 pacientes descartando a possibilidade de ser deletéria. Das mutações relatadas nesse estudo duas ainda não possuem dados sobre seus mecanismos moleculares na literatura, o que torna necessário estudos complementares, para se obter melhor entendimento da consequência dessas mutação no gene *BRCA1* na população brasileira e mundial. Portanto, acentua-se a importância de ampliar este estudo e estimular pesquisas futuras, para se refinar o conhecimento do padrão mutacional brasileiro para os genes de alta penetrância para o câncer de mama como o *BRCA1*.

Palavras chave: Câncer de mama, síndrome do câncer hereditário, *BRCA1*.

4.1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é provavelmente o tipo de câncer mais temido pelas mulheres, devido à sua alta frequência e, sobretudo, pelos seus efeitos psicológicos, que afetam a percepção de sexualidade, sua autoestima e estética (ABREU; KOIFMAN, 2002).

Segundo a organização mundial de saúde (OMS), é o segundo câncer mais comum e mais frequente entre as mulheres em todo mundo, atrás apenas do câncer de pele não melanoma, podendo afetar homens, porém é mais raro, apenas 1% do total de casos da doença. Em 2018, esse câncer correspondeu a 24,2% de todos os novos cânceres diagnosticado em mulheres, estima-se que de 2018 a 2040 haja um aumento na incidência do CM de 46,3% elevando o número de mortes de 7.9 milhões para 13 milhões (GLOBOCAN, 2018; BERTOLI; CAVA; CASTIGLIONI, 2015).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (2018), estima-se que no Brasil 59.700 novos casos de cânceres sejam apenas de CM, que corresponde a 29,5%. No que diz respeito a incidência da doença na região Norte do Brasil, o CM é o segundo mais frequente entre as mulheres, sendo o primeiro o câncer de colo de útero. Para o biênio de 2018/2019 estima-se que ocorra 1.730 novos casos a cada 100 mil mulheres. Mais especificamente para o estado do Amazonas, a taxa de ocorrência estimada para 2018/2019 é de 420 novos casos de CM a cada 100 mil mulheres (INCA, 2018).

Alguns fatores biológicos de risco estão bem estabelecidos e envolvem: idade, características da vida reprodutiva da mulher (tempo de exposição ao estrogênio), densidade do tecido mamário, história familiar e presença de alterações genéticas. Com relação aos fatores de risco que dizem respeito aos hábitos de vida estão a nutrição, o sedentarismo, o uso de álcool, o tabaco e a exposição à radiação ionizante em mulheres mais jovens (M. S., 2004).

Pelo menos 10% dos CM ocorrem em indivíduos com mutações germinativas em genes de alta penetrância. Mutações nos genes do CM de início precoce *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis por até metade das mutações hereditárias no CM. Um dos primeiros genes de predisposição ao CM a ser mapeado foi o *BRCA1* estudado por Hall e colaboradores, em 1990 a partir de análises de ligação envolvendo famílias com numerosos casos de CM, sendo caracterizado,

quatro anos mais tarde por Miki e colaboradores, em 1994 (VENKITARAMAN, 2014; CGAN, 2012).

O *BRCA1* é um gene supressor tumoral localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21), constituído por mais de 81kb, distribuídos em 24 éxons dos quais 22 codificam uma proteína com 1.863 aminoácidos com peso molecular de 220kd (os éxons 1 e 4 são não codantes) HALL et al., 1990; MIKI et al., 1994). Recentemente, estimativas avaliaram que mulheres que herdaram uma mutação no *BRCA1* têm uma chance de 72% de desenvolver CM e de 44% de desenvolver câncer de ovário (CO) em sua vida (KUCHENBAECKER et al., 2017). Mutações no gene *BRCA1* também podem predispor ao desenvolvimento de outros cânceres, como o câncer endometrial, pancreático, colorretal, gástrico e de pele (SUSZYNSKA et al., 2019; BLAIR et al., 2018). O teste genético é, portanto, essencial para identificar indivíduos em risco para garantir um diagnóstico precoce ou reduzir o risco de câncer, incluindo cirurgias profiláticas (mastectomia e/ou ooforectomia) (WONG et al., 2017).

A abordagem mais comumente utilizada para se encontrar indivíduos com alto risco de serem portadores de mutações deletérias que predisõem ao câncer é a de analisar indivíduos selecionados com base no número e no grau de parentesco e familiares com câncer, idade de diagnóstico de tumores de mama nos indivíduos e a existência de outros tumores (ESCOBAR, 2011).

No Brasil o panorama de frequência e prevalência das mutações germinativas deletérias na população não está claro, mas, observa-se que nos últimos anos estudos estão sendo realizados e publicados, o que demonstra um interesse em modificar este cenário de falta de conhecimento no Brasil (SILVA et al., 2014).

Embora os estudos genéticos no Brasil estejam aumentando, não existem trabalhos moleculares investigativos na população do estado do Amazonas que demonstrem a evidência genética da causa dos cânceres atendidos no estado. A identificação e caracterização destas mutações na população amazonense são cruciais para um melhor tratamento e prevenção. Pelo exposto, o objetivo do presente estudo foi de caracterizar um grupo de pacientes com câncer de mama atendidos na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON) quanto a fatores de risco para CM hereditário.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Tipo de Estudo

Foi realizado um estudo descritivo de pacientes atendidos no ambulatório da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON), diagnosticados com CM com história familiar e/ou diagnóstico em idade jovem (<40 anos), comprovados por exame clínico e histopatológico em qualquer fase de estadiamento tumoral ou relatório de encaminhamento médico.

A execução do estudo teve aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa das instituições envolvidas, tendo como número de parecer: 510.432 (ANEXO I). Os indivíduos abordados foram informados dos objetivos do estudo por meio da apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), o qual também esclarece os riscos e benefícios do estudo (ANEXO II). Os Critérios de inclusão e exclusão seguram as diretrizes publicadas em 2016 pela organização NCCN intitulada “Diretrizes de Prática Clínica NCCN em Oncologia”. Já os critérios de exclusão foram: pacientes incapacitados de compreender o TCLE; indivíduos com diagnóstico de câncer de mama e/ou ovário com idade maior que 40 anos e sem história familiar para estes cânceres; ou indivíduos que não se enquadraram nos critérios de inclusão.

4.2.2 Coleta e tratamento das amostras

Foram coletados 5mL de sangue periférico de cada voluntário em tubo K3 EDTA, no ano de 2014, realizada no Laboratório de Coleta da Fundação Centro de Controle em Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON.

Em seguida o DNA genômico foi extraído do sangue periférico utilizando o protocolo CTAB 2% padronizado de Doyle e Doyle (1990). A verificação qualitativa do DNA extraído foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com azul de bromofenol/GelRed.

4.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após realizada a revisão de literatura (FIEDMAN et al., 1994, ALNOLD et al., 1999, DUFLOTH et al., 2005; ESCOBAR, 2011) foram selecionados os *primers* que apresentavam índices polimórficos de acordo com a literatura, os quais estão listados na tabela 1. As sequências do *primers* foram retiradas do trabalho de Dufloth et al.,

(2005). Os pares de *primers* dos fragmentos do gene *BRCA1* estão localizados a uma distância de 50 a 100 pares de bases de cada éxon. Isto permite que toda a área de interesse seja rastreada, inclusive regiões intrônicas próximas aos éxons, onde eventuais alterações podem ser importantes por estarem localizadas em sítios de *splicing* alternativo.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada para amplificar e isolar os 8 éxons de interesse do gene *BRCA1* de cada paciente. A reação foi realizada em microtubos de 0,2 mL, com os seguintes reagentes e suas concentrações finais: Tampão 1X; Cloreto de magnésio (MgCl₂) (2mM); DNTPs (0,2mM); *Primer F* (0,5μM); *Primer R* (0,5μM); Taq DNA Polimerase (1,25U) (*DNA express Biotecnologia*®). A ciclagem seguiu-se como descrito na tabela 2. O produto da amplificação foi quantificado em gel de agarose 1% corado com GelRed, com a concentração de 1:1, utilizando 2μL do produto da PCR e 2μL de azul de bromofenol/GelRed. A purificação do produto de PCR foi realizada pelo método Polietilenoglicol 20% (PEG 8000) (SAMBROOK; GREEN, 1989).

Tabela 1: Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para os éxons do gene *BRCA1*.

Primers	Sequência	Tamanho (Pb)	TA*
Éxon 2	F: 5'GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT3' R: 5'TGTCTTTTCTTCCCTAGTATGT3'	250	60°C
Éxon 3	F: 5'TCCTGACAGAGCAGACATTTA3' R: 5'TTGGATTTTCGTTCTCACTTA3'	340	60°C
Éxon 8	F: 5'AAGCACAGAACTGGCCAACAA 3' R: 5'CACTTCCCAAAGCTGCCTAC 3'	274	60°C
Éxon 9	F: 5' TGCCACAGGTAGATGCTCAGT 3' R: 5' CACATACATCCCTGAACCTAAA 3'	292	58°C
Éxon 13	F: 5'AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA 3' R: 5'ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC 3'	322	62°C
Éxon 16	F: 5'AAAACCTTTTCCAGAATGTTGT3' R: 5'AATTCTTAACAGAGACCAAGAAC3'	452	56°C
Éxon 19	F: 5'CTGTCATTCTTCCTGGTGCTC3' R: 5'CATTGTTAAGGAAAGTGGTGCTC3'	250	60°C
Éxon 20	F: 5'ATATGACGTGTCTGCTCCAC3' R: 5'GGGAATCCAAATTACACAGC3'	322	60° C

TA*: Temperatura de anelamento

Tabela 2: Perfil de Temperatura para amplificar a Reação em Polimerase da Cadeia (PCR).

	Etapa	Temperatura	Tempo
	1	94°C	05:00 min
40X {	2	94°C	00:35 seg
	3	TA*	00:40 seg
	4	72°C	00:40 seg
	5	72°C	05:00 min

TA*: Temperatura de anelamento

4.2.4 Sequenciamento de DNA direto

Para sequenciamento do DNA direto, foram realizadas duas reações de sequenciamento *Forward* e *Reverse* utilizando os mesmos *primers* da PCR, água ultrapura, Tampão 5X e kit *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing*, ambas reações tiveram o mesmo material de PCR purificado. A reação de sequenciamento de DNA ocorreu em termociclador com o perfil de temperatura apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Representação das etapas de temperatura da reação de sequenciamento de DNA

	Etapa	Temperatura	Tempo
35X {	1	96°C	2min
	2	96°C	30seg
	3	50°C	20seg
	4	60°C	4min

Após a reação de sequenciamento foi realizada a precipitação, com a finalidade de eliminar reagentes não incorporados na reação. A precipitação foi realizada com EDTA/ETANOL seguindo o protocolo estabelecido pela *Applied Biosystems*. E seguiu-se a corrida eletroforética por capilar no sequenciador automático *ABI 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems)*.

4.2.5 Análise dos dados

Ao término do sequenciamento automático, no qual foram geradas as sequências nucleotídicas dos éxons do gene *BRCA1*, as mesmas foram verificadas utilizando a ferramenta *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmar a identidade das sequências.

As mesmas foram conferidas, alinhadas, editadas e analisadas com o auxílio do programa Bioedit 7.2.6 (HALL, 1999) tendo como sequência referência *BRCA1*: NM_007294.3 depositada no GenBank do *National Center for Biotechnology Information*, ou NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>), essa sequência *wild type* não apresenta mudanças ao longo da mesma, dessa forma, fornece informações para comparar acerca das mutações presentes nos indivíduos estudados.

4.2.6 Descrição das Mutações

Todas as alterações encontradas no gene *BRCA1* foram pesquisadas no banco de dados do ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), do BRCA Exchange (<https://brcaexchange.org/variants>) e do Varsome (<https://www.varsome.com/>) para que pudessem ser classificadas quanto a sua nomenclatura, bem como a interpretação e determinação da significância clínica das mutações encontradas nas sequências nucleotídicas. Esses bancos de dados têm por objetivo fornecer dados de livre acesso, com registros confiáveis acerca de variantes interpretadas para um fenótipo de alta penetrância.

5 RESULTADOS

3.1 Caracterização geral da amostra

Participaram do estudo 53 pacientes selecionados após consulta no ambulatório da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON), os mesmos foram incluídos conforme os critérios descritos no item 2.3, para o CM hereditário.

O grupo está caracterizado da seguinte forma 51 mulheres e 2 homens. A idade dos pacientes variou de 30 a 71 anos, ainda que uma das principais características das síndromes hereditárias de predisposição ao câncer seja o acometimento dos pacientes em idade jovem (25 a 40 anos), não era intenção restringir a população a uma determinada faixa etária, tendo em vista que os pacientes com idade >40 atendiam aos demais critérios expostos no item 2.3.

Quanto a procedência dos pacientes, 38 eram nascidos no estado do Amazonas, 7 no Pará, 1 de Roraima, 1 de Rondônia, 1 do Ceará e 1 da Paraíba e 4 não relataram sua naturalidade. Em relação ao histórico familiar para predisposição ao CM hereditário 69,8% dos pacientes apresentaram alguma relação com o CM, enquanto em 30,2% houve ausência. Quanto ao fator de risco hormonal pôde ser observado que 37,2% das mulheres estavam na menopausa no momento do diagnóstico.

3.2 Rastreamento do gene *BRCA1* por sequenciamento direto

3.2.1 Caracterização das sequências

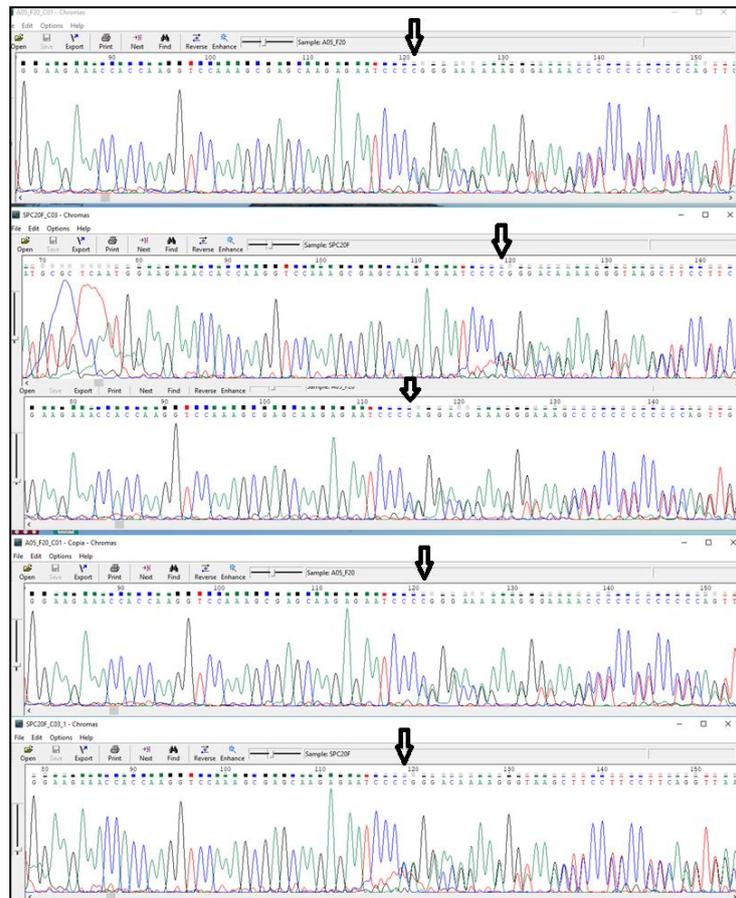
Os dados das sequências do gene *BRCA1* obtidos através de sequenciamento direto foram analisadas no programa BioEdit 7.2.6. (HALL, 1999). Individualmente cada éxon foi analisado e gerada suas próprias matrizes, ao total foram analisados 2.305pb. Para os 53 pacientes foi realizada duas reações de sequenciamento bidirecional para cada éxon, se apresentada alguma variação na sequência a mesma era repetida de 2 a 4 vezes para que a mutação fosse confirmada, dando credibilidade aos dados encontrados, gerando um total de 895 reações (tabela 4).

Tabela 4: Dados gerados através de sequenciamento direto dos éxons do gene *BRCA1*

	Éxon 2	Éxon 3	Éxon 8	Éxon 9	Éxon 13	Éxon 16	Éxon 19	Éxon 20	Total
Nº de sequências	106	106	106	106	117	121	106	127	895
Nº de pb após a edição	258pb	319pb	272pb	160pb	307pb	419pb	248pb	322pb	2.305pb

3.2.2 Caracterização das mutações

As sequências geradas foram analisadas por inspeção visual de cada eletroferograma, e a comparação por alinhamento com a sequência referência NM_007294.3, que possibilitou a visualização de cada mudança presente nos pacientes. Ressaltamos que as sequências que apresentavam mudanças passaram por nova reação de sequenciamento para então confirmar a presença da mesma (Figura 1).

**Figura 1:** Repetição do sequenciamento da paciente A05 que apresentou mudança em sua sequência.

As alterações encontradas nos éxons estudados do gene *BRCA1* foram verificadas nos bancos de dados online deste gene *ClinVar*, *BRCA Exchange* e *Varsome*, que armazenam informações uteis para os grupos de pesquisas que o acessam. Foram identificadas o total de 4 mutações sendo elas 2 missenses, 1 frameshift e 1 variante intrônica (tabela 4).

Tabela 4: Alterações encontradas no gene *BRCA1*.

Localização	HGVS*	dbSNP**	Base trocada	Aminoácido trocado	Tipo de mutação	Significância	Nº de pacientes afetados
Éxon 13	c.4304A>G	rs87666080 g	T→C	Asp→Gly	Missense	Significado incerto	16
Éxon 16	c.4837A>G	rs1799966	A→G	Ser→Gly	Missense	Benigna	25
Éxon 20	c.5266dupC	rs80357906	insC	Stop codon	Frameshift	Patogênica	1
Intron 20	c.5277+48_ 5277+59dup p	rs57276635 5	dupGTA TTCCA CTCC		Intrônica	Provavelmente benigna	1

Human Genome Variation Society*; *Short Genetic Variations database*

3.2.3 Distribuição das mutações nas amostras

3.2.3.1 Mutações *Missenses*

A mutação *missense* localizada no éxon 13 é descrita como c.4304A>G e caracteriza-se por uma troca de T→C (Timina por Citosina) levando a troca do aminoácido Asp → Gly (Aspartato por uma Glicina) (Figura 2), esta mutação foi encontrada em 16 pacientes, todos do sexo feminino, em sua maioria naturais da região norte, 12 do Amazonas, 1 do Pará, 1 de Rondônia e 2 não relataram a naturalidade, a faixa etária destes pacientes variou de 33 a 59 anos e todos apresentaram histórico pessoal e/ou familiar.

Quanto à patogenicidade desta mutação, há uma divergência entre os bancos de dados *online ClinVar*, *BRCA Exchange* e *Varsome* o primeiro e o segundo mostram como uma variação de significado incerto (VUS) enquanto o terceiro supõe ser provavelmente benigna, sabe-se que as VUS são classificadas dessa forma por não possuírem informações suficientes sobre o seu efeito, já as variantes provavelmente benignas são as que não foram reconhecidas ou não se espera

nenhuma mutação patogênica (silenciosas e intrônicas), em vista disso, neste trabalho foi considerado a classificação do banco *ClinVar*, do NCBI e do *BRCA Exchange*.

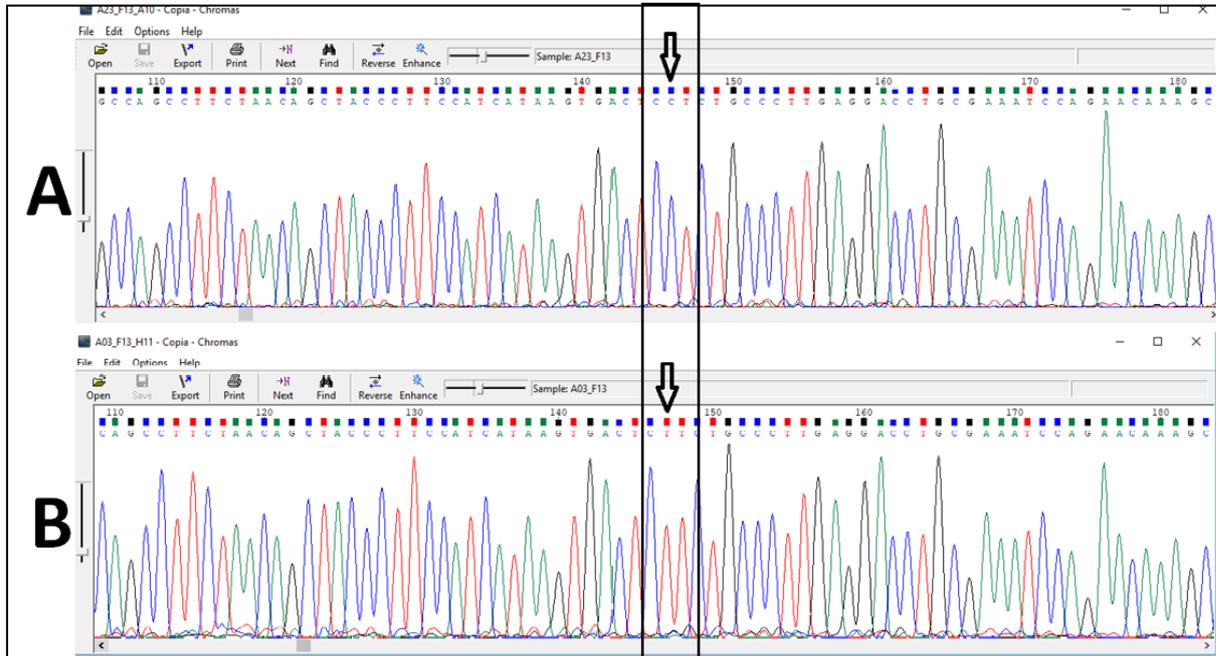


Figura 2: A) Eletroferograma mostrando a mutação *missense* c.4304A>G no éxon 13 do gene *BRCA1*. **B)** Eletroferograma sem alteração do mesmo éxon (sinalizado com uma seta).

Outra mutação *missense* encontrada é descrita como c.4837A>G é localizada no éxon 16 e caracteriza-se por uma troca de A→G (Adenina por Guanina) levando a troca do aminoácido Ser→Gly (Serina por uma Glicina) (Figura 3), esta mutação esteve presente em 25 pacientes, todos do sexo feminino, em grande parte naturais da região norte, 17 do Amazonas, 2 do Pará, 1 de Roraima, 1 de Rondônia e 4 não informaram sua naturalidade, a faixa etária destes pacientes variou de 33 a 69 anos e todos apresentaram histórico pessoal e/ou familiar. Os bancos de dados consultados *ClinVar*, *Varsome* e *BRCA Exchange* não possuem divergência de classificação para esta mutação, sendo então considerada benigna.

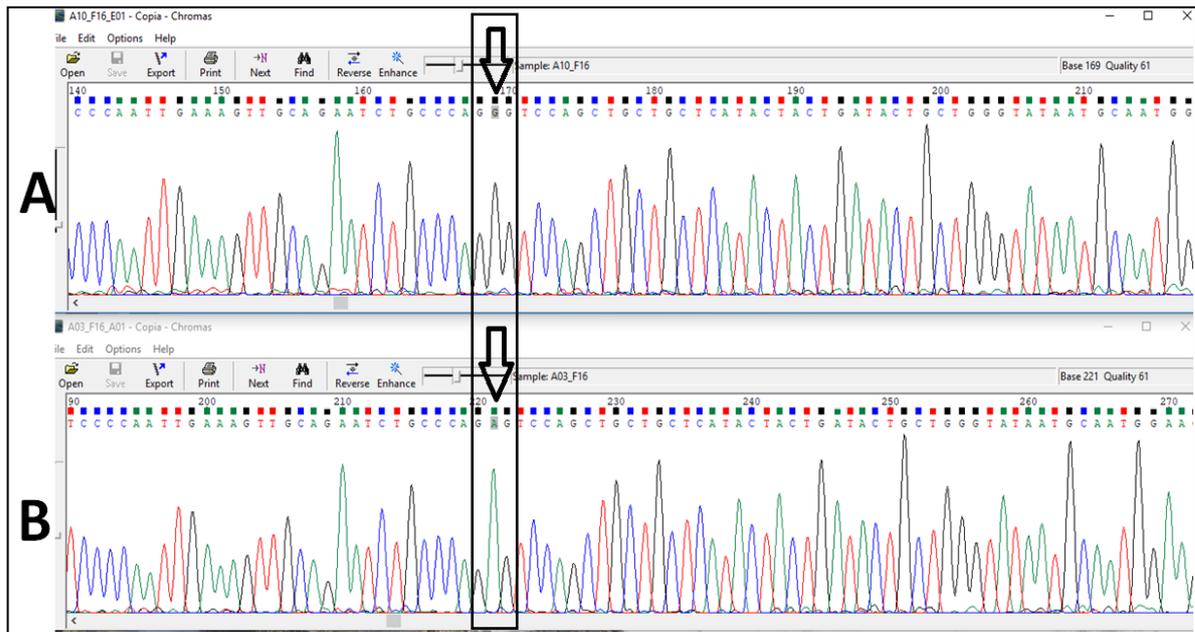


Figura 3: **A)** Eletroferograma mostrando a mutação *missense* c.4837A>G no éxon 16 do gene *BRCA1*. **B)** Eletroferograma sem alteração do mesmo éxon (sinalizado com uma seta).

3.2.3.2 Mutação Frameshift

A mudança *frameshift* localizada no éxon 20 é conhecida como 5382insC é descrita como c.5266dupC, caracteriza-se pela inserção do nucleotídeo C e leva a um erro de leitura a partir deste ponto e ao aparecimento de um *stop códon* na posição 1829aa (Figura 4). Esta alteração foi encontrada em uma paciente do sexo feminino diagnosticada aos 63 anos, natural de Manaus/AM, possui histórico familiar de câncer de mama (mãe e filha), não foi possível realizar o rastreamento da mutação em seus familiares, pois não obtivemos contato com as mesmas. Os bancos de dados consultados *ClinVar*, *Varsome* e *BRCA Exchange* não possuem divergência de classificação para esta mutação, sendo então considerada patogênica.

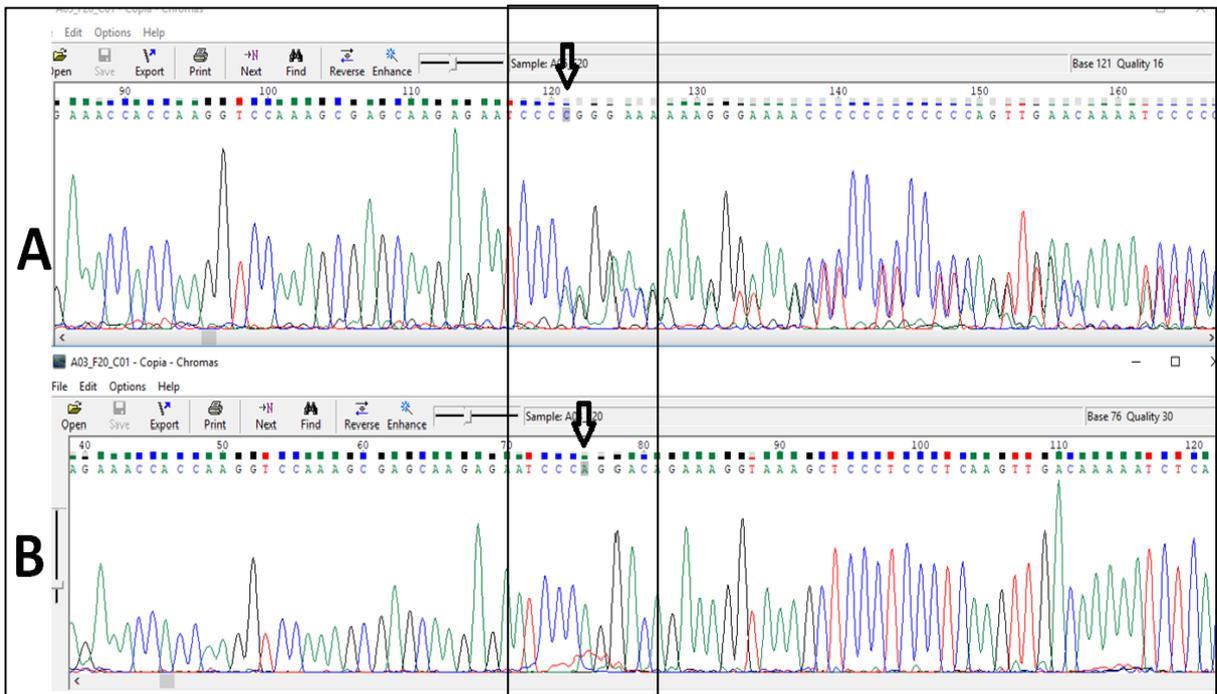


Figura 1: **A)** Eletroferograma mostrando a mutação *frameshift* c.5266dupC no éxon 20 do gene *BRCA1*. A inserção da citosina forma sobreposição dos picos no restante da leitura. **B)** Eletroferograma sem alteração do mesmo éxon (sinalizado com uma seta).

3.2.3.3 Mutação Intrônica

A mutação intrônica localizada no intron 20 é descrita como c.5277+48_5277+59dup (figura 5) consiste na inserção de 12 pares de bases neste intron (GTATTCCATCC), foi detectada em apenas uma paciente do sexo feminino, a mesma apresentou as mutações *missenses* dos éxons 13 e 16. Nos bancos de dados consultados *ClinVar* e *BRCA Exchange* essa mutação intrônica é classificada como provavelmente benigna, já a busca no banco de dados *Varsome* mostra a classificação como VUS, onde ressalta que apesar de o banco de dados *ClinVar* classificar como variante provavelmente benigna não faz referências a testes funcionais para tal classificação. Na literatura, até o momento não foram encontradas citações sobre essa mutação.

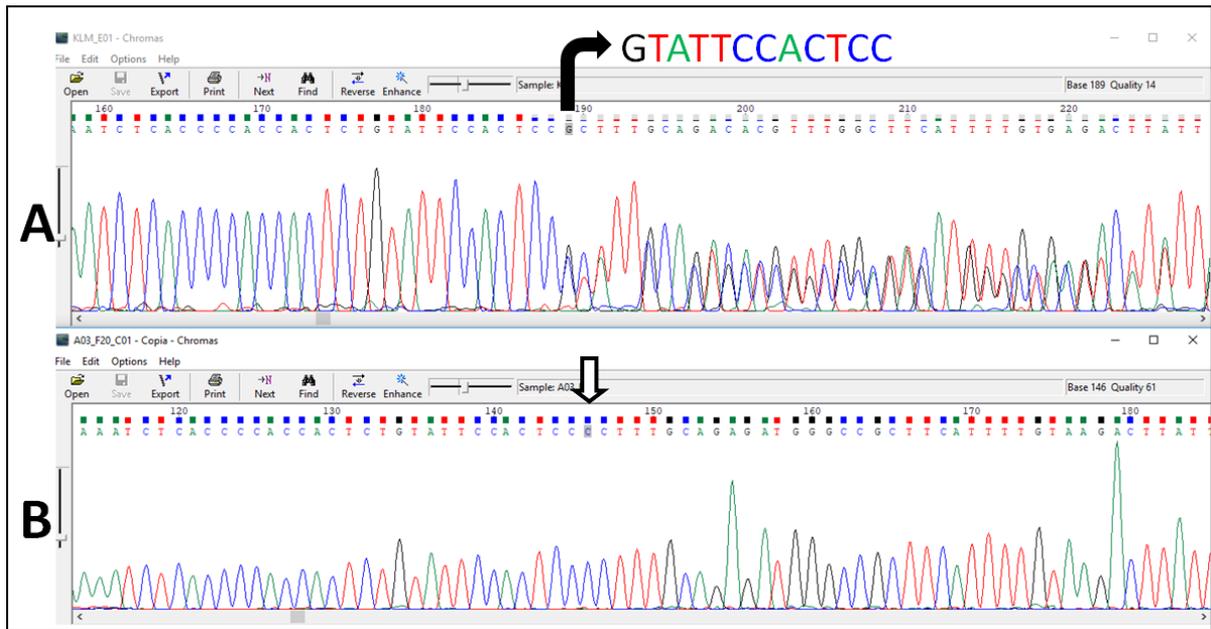


Figura 4: **A)** Eletroferograma mostrando a mutação intrônica c.5277+48_5277+59dup do gene *BRCA1*. A inserção de 12 pares de bases forma sobreposição nos picos no restante da leitura. **B)** Eletroferograma sem alteração do mesmo éxon (sinalizado com uma seta).

3.2.3.4 Quantitativo das mutações

Do total de 53 pacientes analisados no presente estudo 26 apresentaram mutações (Tabela 5). Destes, 16 pacientes apresentaram duas mutações concomitantemente do tipo *missense* nos éxons 13 e 16, 9 pacientes apresentaram uma mutação em um dos éxons 13, 16 e 20, uma paciente apresentou de forma particular três mutações simultaneamente nos éxons 13, 16 e intron 20 (figura 5).

Tabela 5: Distribuição das mutações em cada paciente com câncer de mama estudados

PACIENTES	SEXO	EXON 13	EXON 16	EXON 20	INTRON 20	TOTAL DE MUTAÇÕES
A01	F	1	1	0	0	2
A02	F	1	1	0	0	2
A03	F	0	0	0	0	0
A04	F	0	0	0	0	0
A05	F	0	0	1	0	1
A06	F	0	0	0	0	0
A07	F	0	0	0	0	0
A08	F	0	0	0	0	0
A09	M	0	0	0	0	0
A10	F	1	1	0	0	2
A11	F	0	1	0	0	1
A12	F	1	1	0	0	2
A13	F	0	1	0	0	1
A14	F	0	1	0	0	1
A15	F	1	1	0	0	2
A16	F	0	0	0	0	0
A17	M	0	0	0	0	0
A18	F	0	0	0	0	0
A19	F	0	0	0	0	0
A20	F	0	0	0	0	0
A21	F	1	1	0	0	2
A22	F	0	0	0	0	0
A23	F	1	1	0	0	2
A24	F	0	0	0	0	0
A25	F	1	1	0	0	2
A26	F	0	0	0	0	0
A27	F	0	0	0	0	0
A28	F	1	1	0	1	3
A29	F	0	1	0	0	1
A30	F	1	1	0	0	2
A31	F	0	1	0	0	1
A32	F	0	0	0	0	0
A33	F	0	1	0	0	1
A34	F	1	1	0	0	2
A35	F	1	1	0	0	2
A36	F	0	0	0	0	0
A37	F	0	0	0	0	0
A38	F	1	1	0	0	2
A39	F	1	1	0	0	2
A40	F	0	0	0	0	0
A41	F	1	1	0	0	2
A42	F	0	0	0	0	0
A43	F	1	1	0	0	2

PACIENTES	F	EXON 13	EXON 16	EXON 20	INTRON 20	TOTAL DE MUTAÇÕES
A44	F	0	0	0	0	0
A45	F	0	1	0	0	1
A46	F	0	0	0	0	0
A47	F	0	1	0	0	1
A48	F	0	0	0	0	0
A49	F	0	0	0	0	0
A50	F	0	1	0	0	1
A51	F	0	0	0	0	0
A52	F	0	1	0	0	1
A53	F	0	0	0	0	0

0=Ausência de mutação, 1= Presença de uma mutação; 2=Presença de duas mutações; 3=Presença de tres mutações. F= Feminino, M= Masculino.

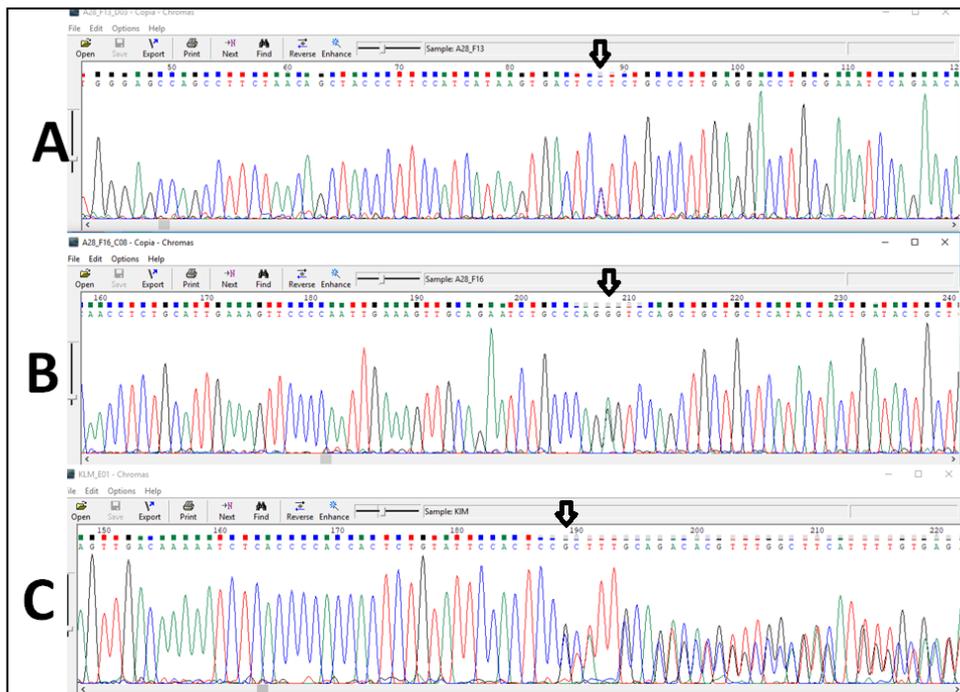


Figura 5: A) Eletroferograma mostrando a mutação missense c.4304A>G no éxon 13 do gene *BRCA1*. B) Eletroferograma mostrando a mutação missense c.4837A>G no éxon 16 do gene *BRCA1*. C) Eletroferograma mostrando a mutação intrônica c.5277+48_5277+59dup do gene *BRCA1*.

4 DISCUSSÃO

No Brasil, estudos e dados sobre mutações relacionadas ao CM hereditário ainda são escassos e estão concentrados nas regiões Sul e Sudeste do país. Além disto, a população brasileira é heterogênea e miscigeada, com uma alta variabilidade genética devido à influência dos diversos povos que participaram do processo de colonização do território brasileiro. O que torna bastante complexo traçar um perfil genético desta síndrome, inclusive pelas diferenças existentes entre as regiões do país (TIMOTEO, 2016).

No estado do Amazonas pouco se sabe sobre o perfil genético de pacientes diagnosticados com CM precoce e/ou com casos na família, este estudo é o primeiro a trabalhar com a técnica de sequenciamento para rastrear mutação no gene *BRCA1* no estado. A seleção dos pacientes foi feita de acordo com os critérios para CM hereditário, e a idade variou de 30 a 71 anos, também foi relatada no trabalho de Escobar (2011) onde as mutações estavam presentes em pacientes acima dos 40 anos. Em nosso estudo as mutações variaram entre as faixas etárias dos pacientes de 33 a 71, sendo mais presente em pacientes com idade acima dos 40 anos. Importante salientar que o câncer é uma doença comum em pessoas de idade avançada entre 65 a 80 anos, quando a doença ocorre em pessoas com idade abaixo dos 50 anos, pode ser relacionado a erros de herança mendeliana, afetando genes que atuam como defesa no surgimento de tumores como o *BRCA1* (LIU et al., 2005).

Outro fator de risco para o CM além da idade é o fator hormonal, mulheres em idade fértil estão sujeitas ao risco aumento de surgimento de câncer por estarem expostas a estimulação hormonal. Quanto maior o tempo da vida reprodutiva, maior é o risco de desenvolver CM, o que significa dizer que a menarca precoce e a menopausa tardia aumentam as chances de desenvolver CM, devido ao ciclo hormonal que ocorre nesse período (BOUGIE et al., 2011; KING et al., 2003)

Dentre nossas pacientes foi detectado que apenas 37,2% estavam na menopausa, demonstrando que 62,8% ainda estavam em idade reprodutiva, o que nos leva a acreditar que essas pacientes em não menopausa sofreram influência dos hormônios no desenvolvimento do câncer de mama.

A identificação de indivíduos portadores de mutações germinativas em genes relacionados como CM hereditário é de grande importância para identificar familiares de alto e médio risco e assim propor medidas de acompanhamento para potencializar o diagnóstico precoce. O diagnóstico molecular do CM hereditário é complexo e requer a análise de toda a sequência do gene *BRCA1*, e a diferenciação de variantes de alto ou baixo risco é um ponto importante para a descoberta do significado clínico, e, para um resultado conclusivo do teste genético (TIMOTEO, 2016; ESCOBAR, 2011).

Classificar variantes que desregulam a expressão gênica de isoformas naturais é um desafio, uma vez que ainda não foram completamente estabelecidas as alterações mínimas na transcrição e na tradução que levam ao surgimento do câncer. Mutações que alteram o aminoácido codificado (*missense*) com significado clínico desconhecido podem ser deletérias, dependendo do efeito bioquímico que a troca de aminoácido terá na estrutura e função da proteína permitindo, por exemplo, romper um sítio acentuador de *splicing*. Da mesma forma, variantes intrônicas podem afetar os mecanismos de *splicing* alternativo e a transcrição gênica quando localizadas em sequências-consenso ou sequências acentuadoras/inibidoras destes mecanismos (TSAI et al., 2008).

A mutação *missense* c.4304A>G localizada no éxon 13 classificada como significado incerto, foi presente em 30,2% dos pacientes, ou seja, 16 indivíduos apresentaram essa variação. Sobre essa variante presente nos pacientes deste estudo, não foi encontrada até o momento pesquisas que demonstre sua frequência na população mundial e brasileira e nem sobre sua patogenicidade. Sabe-se que as variantes missenses podem ou não afetar o efeito da proteína, e mais especificamente a região codificada pelos éxons 11 a 13 que correspondem a 65% do peptídeo e é comumente mutada no câncer de mama (CLARK; DOMCHEK, 2012). Por esta razão, não se pode afirmar que a variante de significado incerto presente neste trabalho não afeta a função da proteína codificada.

A mudança *missense* c.4837A>G localizada no éxon 16 classificada como benigna, esteve presente em 47,2% dos pacientes deste estudo, ou seja, 25 indivíduos apresentaram essa variação. Sabemos que o Brasil é um país etnicamente diversificado, pois sofreu influência de muitos povos como europeus, índios e africanos, e a mutação c.4837A>G já foi descrita em duas dessas populações (europeus e africanos), em um estudo de Biunno et al., (2014) no Sudão Central

identificou essa mutação em 21/59 dos pacientes estudados, essa alta frequência é similar com a deste estudo, o que nos indica que essa mutação pode ter entrado na população brasileira com a influência dos africanos.

A mutação citada, já foi descrita em outros trabalhos e a mesma apresentou alta frequência. Em países da Ásia como o Irã, esta mutação tem uma frequência de 6 alterações em 20 pacientes amostrados, ou seja, 21,2% como observado no trabalho de Keshavarzi et al., 2012. Outro trabalho que também apresenta a frequência dessa mutação foi o de Pietschmann et al., (2012) que observaram a ocorrência da mesma em 6 pacientes de 20 que foram amostrados, ou seja 30% dos pacientes afetados com câncer de mama apresentaram esta mutação.

Além destes, Dombernowsky et al., (2009) em um estudo com 419 mulheres diagnosticadas com câncer de mama e/ou ovário, avaliou risco para esses cânceres associado a 9 polimorfismos *missenses* dentre eles o c.4837A>G, e encontrou uma frequência de 21% na população estudada. E perceberam que a heterozigosidade ou homozigose de qualquer combinação de dois dos nove polimorfismos não se associou com risco aumentado de câncer de mama e/ou ovário. Yang et al., (2019) fizeram uma meta-análise sobre essa variação presente na literatura e corroboraram com o que já foi estudado, indicando que esse polimorfismo pode não estar relacionado ao risco de câncer de mama, mas ressaltaram que outros estudos devem ser realizados para confirmar esse resultado.

Como anteriormente citado, a população brasileira possui grande heterogeneidade étnica devido a colonização por diversos povos, o que dificulta o encontro de mutações fundadoras específicas. No entanto, entre as mutações encontradas neste estudo uma é fundadora c.5266dupC, Da Costa e colaboradores mostraram em 2008, através de um estudo de perfil haplotípico, que a mutação Ashkenazi c.5266dupC possui origem no Leste/Centro europeu, o que mostra uma contribuição significativa dos povos característicos destas regiões para a população brasileira. Atualmente a mutação c.5266dupC, localizada no éxon 20, é a segunda mutação mundialmente mais frequente descrita no gene *BRCA1* (KARAMI; MEHDIPOUR, 2013; PALMERO et al., 2016; SILVA et al., 2014; BIC, 2019). No entanto, apesar de sua alta frequência, neste estudo, a mesma foi detectada em apenas uma paciente. Em 2005, Dufloth et al., observaram uma prevalência de 13% de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes brasileiros com histórico familiar positivo, dentre as mutações encontradas por eles a c.5266dupC esteve

presente, presente em apenas uma paciente da coorte de 31 pacientes, assim como neste trabalho, demonstrando também a baixa prevalência em pacientes no Brasil. Alguns autores sugerem que a entrada desta mutação no Brasil está relacionada com a imigração de judeus europeus de Portugal no século XVI (CARVALHO-SILVA et al., 2001; GOMES et al., 2007).

Lourenço et al., (2004), encontraram em seu estudo uma frequência de 8,5% desta mutação (c.5266dupC), utilizaram critérios de seleção dos pacientes mais rigorosos, trabalharam com uma coorte de 47 pacientes de origens distintas, dois pacientes eram de origem judaica Ashkenazi, quatro pacientes eram de origem européia, um deles com um parental ucraniano e um italiano, dois pacientes de origem italiana (um deles sendo italiano) e um paciente com parentais alemão e português. Os outros 38 pacientes eram da população brasileira.

O estudo de Gomes et al., (2011) selecionou 402 mulheres em tratamento para câncer de mama no estado do Rio de Janeiro, os resultados mostram que a mutação mais frequente foi a c.5266dupC presente em 5 pacientes, ainda assim pode ser considerada baixa em relação com número de pacientes amostrados. Embora este e outros estudos citados mostrem que a mutação fundadora c.5266dupC em *BRCA1* é presente na população brasileira, isto não pode ser tomado como solução para o problema do rastreamento do CM hereditário no Brasil, visto que outras mutações estão presente nessa população.

A mutação c.66_67delAG é encontrada principalmente em indivíduos Ashkenazi e iraquianos, e esporadicamente em não-judeus. Estudos anteriores estimaram que esta é uma mutação fundadora em portadores de mutações judaicas, classificada como patogênica por afetar a função da proteína. (LAITMAN et al., 2013). No Brasil essa mutação é utilizada para rastreio em pacientes com predisposição ao CM hereditário, alguns estudos já foram realizados, mas a frequência dessa mutação na população brasileira não foi publicada, desta forma salientamos a importância de o estudo genético do CM ser realizado no Brasil com mais afinco, para que se possa ter um perfil genético desta população.

A mutação intrônica descrita como c.5277+48_5277+59dup localizada no intron 20, foi encontrada em apenas uma (01) paciente. Sobre essa variante presente neste estudo não foi encontrada até o momento pesquisas que demonstrem sua frequência na população mundial e brasileira e nem sobre sua patogenicidade, ela foi classificada como provavelmente benigna devido as bases inseridas estarem distantes do sítio de

splicing. De modo geral, variantes intrônicas podem afetar os mecanismos de *splicing* alternativo e a transcrição gênica quando localizadas em sequências consenso ou sequências acentuadoras/inibidoras destes mecanismos (ESCOBAR, 2011).

Sabe-se que os avanços das técnicas moleculares têm ajudado a mapear mutações presentes em pacientes com câncer de mama hereditário, porém pouco se sabe sobre pacientes que apresentam mutações em éxons diferentes do mesmo gene, neste estudo foi encontrado pacientes que possuíam mais de uma mutação no gene *BRCA1*. Um estudo realizado em 2014 por Tung et al., com painel gênico para CM mostrou em apenas um gene de moderada penetrância *CHEK2*, dois pacientes que possuíam 2 mutações nesse mesmo gene. O que nos faz ressaltar a importância de se estudar a genética do câncer para que os pacientes com múltiplas mutações possam receber o tratamento adequado e ter o diagnóstico mais preciso.

A interpretação precisa dos resultados dos testes genômicos é de importância primordial, para o manejo clínico dos pacientes e para evitar estresse desnecessário de um resultado incerto. A interpretação errônea de dados genéticos, tem consequências adversas para os pacientes e para suas famílias. Neste estudo obteve-se uma mutação *missense* e uma variante intrônica que não possuem significado clínico conhecido, e até o momento não foram citadas na literatura. As variações *missenses* afetam várias pacientes, o que nos leva a desconsiderar que sejam deletérias, pois os polimorfismos geralmente afetam pelo menos 1% da população (FERNANDEZ-LOPEZ 2019).

Assim sendo, este estudo encontrou duas mutações que seus mecanismos moleculares ainda são desconhecidos o que torna necessário estudos complementares, para se obter melhor entendimento da consequência da mutação do gene na população brasileira e mundial. Contudo, acentua-se a relevância de se refinar o conhecimento do padrão mutacional brasileiro para os genes de alta penetrância para o câncer de mama como o *BRCA1*, a partir de um aconselhamento genético eficiente e bom uso das técnicas moleculares, o que facilitaria o acompanhamento e tratamento de portadores dessa doença e seus familiares.

5 CONCLUSÃO

- Foram classificados quanto a fatores de risco para o câncer de mama hereditário cinquenta e três (53) pacientes do ambulatório da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON);
- Dos oito (8) éxons selecionados apenas três (3) apresentaram variações em suas sequências;
- Uma (1) paciente apresentou a mutação fundadora c.5266dupC éxon 20, que já foi citada por outros estudos brasileiros, mostrando que ela é presente na população brasileira;
- Vinte e cinco (25) pacientes apresentaram uma mutação *missense* com significado clínico benigno c.4837A>G éxon 16, qual já foi encontrada em alguns estudos no mundo com uma frequência alta entre os pacientes;
- Duas (2) alterações encontradas não possuem significado clínico conhecido, e merecem estudos mais detalhados: mutação *missense* c.4304A>G éxon 13 e mutação intrônica c.5277+48_5277+59dup intron 20.

6 REFERÊNCIAS

ABREU, E. DE; KOIFMAN, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 113–131, 2002.

ACS. **American Cancer Society**. Disponível em: <https://www.cancer.org/> > Acesso em: 20 fev. 2019.

ALVARENGA, M. et al. Contribuição do patologista cirúrgico para o diagnóstico das síndromes do câncer hereditário e avaliação dos tratamentos cirúrgicos profiláticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 2, 2003.

ASCO. **American Society of Clinical Oncology**. Disponível em: <<https://www.asco.org/practice-guidelines/quality-guidelines/guidelines/breast-cancer>>. Acesso em: 3 mar. 2019.

ASPEREN, C.J.; BROHET, R.M.; MEIJERS-HEIJBOER, E.J.; HOOGERBRUGGE, N.; VERHOEF, S.; VASEN, H.F.A.; AUSEMS, M.G.E.M.; MENKO, F.H.; GOMEZ GARCIA, E.B.; KLIJN, J.G.M. Cancer risks in BRCA2 families: estimates for sites other than breast and ovary. **Journal of Medical Genetics**, 42, 711–719, 2005.

ABREU, E. DE; KOIFMAN, S. FATORES PROGNÓSTICOS NO CÂNCER DA MAMA FEMININA. **REVISTA BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA**, V. 48, N. 1, P. 113–131, 2002.

ALVARENGA, M.; COTTA, A. C.; DUFLOTH, R. M.; SCHMITT, F. C. L.; CONTRIBUIÇÃO DO PATOLOGISTA CIRÚRGICO PARA O DIAGNÓSTICO DAS SÍNDROMES DO CÂNCER HEREDITÁRIO E AVALIAÇÃO DOS TRATAMENTOS CIRÚRGICOS PROFILÁTICOS. **JORNAL BRASILEIRO DE PATOLOGIA E MEDICINA LABORATORIAL**, V. 39, N. 2, 2003.

ASCO. **AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY**. DISPONÍVEL EM: <[HTTPS://WWW.ASCO.ORG/PRACTICE-GUIDELINES/QUALITY-GUIDELINES/GUIDELINES/BREAST-CANCER](https://www.asco.org/practice-guidelines/quality-guidelines/guidelines/breast-cancer)>. ACESSO EM: 3 MAR. 2019.

BAGCI, O.; KURTGÖZ, S. AMPLIFICATION OF CELLULAR ONCOGENES IN SOLID TUMORS. **NORTH AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES**, V. 7, N. 8, P. 341–346, 2015.

BLAIR, A. B; GROOT, V. P; GEMENETZIS, G; WEI, J; CAMERON, J. L; WEISS, M. J; GOGGINS, M; WOLFGANG, C. L; YU, J. H.E. BRCA1/BRCA2 germline mutation carriers and sporadic pancreatic ductal adenocarcinoma. **J Am Coll Surg**. 226(4):630-637, 2018.

BIC. **Breast cancer Information Core database**. Disponível em: https://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/Member/mutation_draw/index.cgi. Acesso em: 2 mar. 2019.

BIUNNO, I.; ACETO, G.; AWADELKARIM, K. D.; MORGANO, A.; ELHAJ, A.;

ELTAYEB, A. E.; ABUIDRIS, D. O.; ELWALI, N. E.; SPINELLI, C.; BLASIO, P.; ROVIDA, E.; Mariani-Costantini, R. BRCA1 point mutations in premenopausal breast cancer patients from Central Sudan. **Familial Cancer**, 13:437–444, 2014.

BOUGIE O, WEBERPALS J. I. Clinical considerations of BRCA1- and BRCA2-Mutation carriers: a review. **Int J Surg Oncol**, 374012, 2011.

BLACKWOOD, M. A.; WEBER, B. L. BRCA1 and BRCA2: from molecular genetics to clinical medicine. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 5, p. 1969–77, 1998.

BLOOM, H. J. G.; RICHARDSON, W. W. Histological grading and prognosis of breast cancer. **British journal of cancer**, v. 11, n. 3, p. 359–77, 1957.

BORGES-OSORIO, M. R.; ROBINSON, W. M. Genetica humana. 3ª edição, 2013.

BROCA, P. P. Traité des tumeurs. Paris, P. Asselin. 1866.

CARRARO, D. M.; KOIKE, M. A. A. F.; GARCIA, B. C. L.; RIBEIRO, E. H. O.; VITORIANO, A. C. K.; CARVALHO, A. F.; MOTA, L. D. C.; PUGA, R. D.; MACIEL. S. M.; MICHELLI, R. A.D.; LYRA, E. C.; Comprehensive Analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 Germline Mutation and Tumor Characterization: A Portrait of Early-Onset Breast Cancer in Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 7–9, 2013.

CARVALHO-SILVA, D. R.; SANTOS, F. R.; ROCHA, J.; PENA, S. S. J. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. **American journal of human genetics**, v. 68, n. 1, p. 281–286, 2001.

CASTRO, E. EELES, R. The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer. **Asian J Androl**. v. 14. p. 409-414, 2012.

CHERBAL, F.; SALHIA, N.; RABAH BAKOUR, R.; ADANE, S.; BOUALGA, K.; MAILLET, P. BRCA1 and BRCA2 unclassified variants and missense polymorphisms in Algerian breast/ovarian cancer families. **Disease Markers**, 2012.

CLARK, A.S.; DOMCHEK, S.M. Clinical management of hereditary breast cancer syndromes. **J Mammary Gland Biol and Neoplasia**, 16(1):17–25, 2011.

CORNEJO-MORENO, B. A.; URIBE-ESCAMILLA, D.; SALAMANCA-GÓMEZ, F. Breast cancer genes: Looking for BRACA???'s lost brother. **Israel Medical Association Journal**, v. 16, n. 12, p. 787–792, 2014.

DA COSTA, E. C. B.; VARGAS, F.R.; MOREIR, A. S.; LOURENÇO, J. J.; CALEFFI, M.; ASHNTON-PROLLA, P; MARTINS MOREIRA, M. A. M. Founder effect of the BRCA1 5382insC mutation in Brazilian patients with hereditary breast and ovarian cancer syndrome. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, 184:62-66, 2008.

DOMBERNOWSKY, S. L.; WEISCHER, M.; FREIBERG, J.J.; BOJESEN, S. E.; TYBJARG-HANSEN, A.; BORGE NORDESTGAARD, G. Missense Polymorphisms in BRCA1 and BRCA2 and Risk of Breast and Ovarian Cancer. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**. 2009

DELMONICO, L.; ALVES, G.; AMARAL, L. F. P. A biologia do câncer de mama e testes moleculares de prognóstico. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto**, v. 14, n. 0, 2015.

DOYLE, J.; DOYLE, J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13–15, 1990.

DUFLOTH, R. M.; CARVALHO, S.; HEINRICH, J. K.; SHINZATO, J. Y.; SANTOS, C. C.; ZEFERINO, L. C.; SCHMITT, F. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. **Sao Paulo medical journal**, v. 123, n. 4, p. 192–197, 2005.

ECONOMOPOULOU, P.; DIMITRIADIS, G.; PSYRRI, A. Beyond BRCA: New hereditary breast cancer susceptibility genes. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, n. 1, p. 1–8, 2015.

EISINGER, F, SOBOL, H, SERIN, D, WHORTON, J.C. Hereditary breast cancer, circa 1750. **Lancet**, 351:1366, 1998.

ESCOBAR, K. A. **Determinação de mutações e polimorfismos nos genes BRCA1 e BRCA2 em pacientes com câncer de mama com indicação para teste genético.** [s.l.] Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2011.

J. C. FERNÁNDEZ-LOPEZ, J. C.; ROMERO-CÓRDOBA, S.; REBOLLAR-VEGA, R.; ALFARO-RUIZ, L. A.; JIMÉNEZ-MORALES, S.; BELTRÁN-ANAYA, F.; ARELLANO-LLAMAS, R.; CEDRO-TANDA, A.; RIOS-ROMERO, M.; RAMIREZ-FLORENCIO, M.; BAUTISTA-PIÑA, V.; DOMINGUEZ-REYES, C.; VILLEGAS-CARLOS, F.; TENORIO-TORRES, A.; HIDALGO-MIRANDA, A. Population and breast cancer patients' analysis reveals the diversity of genomic variation of the BRCA genes in the Mexican population. **Human Genomics**. 2019.

FOULKES, W. D. Inherited susceptibility to common cancers. **N Engl J Med**, 359: 2143-53, 2008.

GLOBOCAN. **International Agency for Research on Cancer**. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx>. Acesso em: 10 fev. 2018.

GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 6, p. 463–474, 2012.

GOMES, M. C. B.; COSTA, M. M.; BOROJEVIC, R.; MONTEIRO, A. N.; VIEIRA, R.; KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J.; LI, S.; ROYER, R.; ZHANG, S.; NAROD, S. A. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil. **Breast cancer research and treatment**, v. 103, n. 3, p. 349–53, jul. 2007.

GOMES, M. C. B.; COSTA, M. M.; VIEIRA, R.; FILHO, A. G. F.; KOIFMAN, S.; KIFMAN, R. J.; SUN, P.; NAROD, S. A. Prevalência da mutação BRCA1 e BRCA2 em pacientes com câncer de mama em uma população do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, p. 24–28, 2011.

HALL, J.; LEE, M.; NEWMAN, B.; MORROW, J.; ANDERSON, L.; HUEY, B; KING, M. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science**, v. 250, n. 4988, p. 1684–1689, 1990.

HALL, T. A. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor end analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acidr. Fynp. Ser.*, 41: 95-98, 1999.

HERMAN, S.; Varga, D.; Deissler, H. L.; Kreienberg, R.; Deissler, H. Medium-sized deletion in the BRCA1 gene: Limitations of Sanger sequencing and MLPA analyses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 53–56, 2012.

HEYWANG-KÖBRUNNER, S. H.; Schreer, I.; Heindel, W.; Katalinic, A. Imaging studies for the early detection of breast cancer. **Deutsches Ärzteblatt international**, v. 105, p. 541–7, 2008.

HURVITZ, S.; MEAD, M. Triple-negative breast cancer. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, p. 1, 2015.

INCA. **Estimativa | 2018 Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: [s.n.].

KALIA, M. Biomarkers for personalized oncology: Recent advances and future challenges. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 64, n. 3, p. S16–S21, 2015.

KARAMI, F.; MEHDIPOUR, P. A comprehensive focus on global spectrum of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer. **BioMed research international**, v. 2013, p. 928562, 2013.

KESHAVARZI, F.; JAVADI, G. R.; ZEINALI, S. BRCA1 and BRCA2 germline mutations in 85 Iranian breast cancer patients. **Familial Cancer**, 11:57–67, 2012.

KING, M. C; MARKS, J. H; MADELL, J. B. New York Breast Cancer Study Group. Breast and ovarian cancer, risks due to inherited mutation in BRCA1 and BRCA2. **Science**, 302:643–6, 2003.

KEY, T. J.; VERKASALO, P. K.; BANKS, E. Reviews Epidemiology of breast cancer. **Oncology**, 44, n. 0, p. 133–140, 2001.

KOTE-JARAI, Z; LEONGAMORNLEERT, D.; SAUNDERS, E. BRCA2 is a moderate penetrance gene contributing to young-onset prostate cancer: Implications for genetic testing in prostate cancer patients. **Br J Cancer**. v.105. p. 1230-1234, 2011.

KOUROU, K.; EXARCHOS, T. P.; EXARCHOS, K. P.; KARAMOUZIS, M. V.; FOTIADIS, D. I.; Machine learning applications in cancer prognosis and prediction. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 13, p. 8–17, 2015.

KOZAK, F. K, HALL, J. G, BAIRD, P.A. Familial breast cancer in males: a case report and review of the literature. **Cancer**; 58:2736-9, 1986.

KUCHENBAECKER, K.B.; HOPPER, J.L.; BARNES, D.R.; PHILLIPS, K.-A.; MOOIJ, T.M.; ROOS-BLOM, M.-J.; JERVIS, S.; LEEUWEN, F.E.; MILNE, R.L.; ANDRIEU, N.; Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. **JAMA**, 317, 2402–2416, 2017.

LAITMAN, Y; FENG, B.J; ZAMIR, I. M; WEITZEL, J. N; DUNCAN, P; PORT, D; THIRTHAGIRI, E; TEO, S.H; FRIEDMA, E. Haplotype analysis of the 185delAG BRCA1 mutation in ethnically diverse populations. **European Journal of Human Genetics**, 21, 212-216, 2013.

LEHMAN, C. D. Magnetic resonance imaging in the evaluation of ductal carcinoma in situ. **Journal of the National Cancer Institute - Monographs**, v. 196, n. 41, p. 150–151, 2010.

LI, M. M; DATTO, M; DUNCAVE, E.J; KULKARNI, S; LINDEMAN, N.I;ROY,S; TSIMBERIDOU, A. M; VNENCAK-JONES, C.L; WOLFF, D. J; YOUNES, A; KIKIFOROVA, M. N. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 19, n. 1, p. 4–23, 2017.

LINDOR, N.M.; GUIDUGLI, L.; WANG, X.; VALLÉE, M.P.; MONTEIRO, A.N.A.; TAVTIGIAN, S.; GOLDFAR, D.E.; COUCH, F.J. A review of a multifactorial probability-based model for classification of BRCA1 and BRCA2 variants of uncertain significance (VUS). **Human Mutat**, 33, 8–21, 2012.

LOESCHER, L. J. The family history component of cancer genetic risk counseling. **Cancer Nurse**, v. 22, n. 1, p. 96–102, 1999.

LOURENÇO, J. J, VARGAS, F. R, BINES J. *BRCA1* mutations in Brazilian patients. **Genetics Mol Biol**, 27:500-4, 2004.

LYNCH, H. T.; SNYDER, C.; CASEY, M. J. Hereditary ovarian and breast cancer: What have we learned. **Annals of Oncology**, v. 24, n. SUPPL.B, 2013.

MIKI, Y.; SWENSEN, J.; SHATTUCK-EIDENS, D.; FUTREAL, P. A.; HARSHMAN, K.; TAVTIGIAN, S.; LIU, Q.; COCHRAN, C.; BENNETT, L. M. Strong Candidate for the

Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. **Science**, v. 266, p. 66–71, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). **Protocolos clínicos e diretrizes terapêuticas em oncologia**. 1. ed. 2014.

MORAN, A.; O'HARA, C.; KHAN, S.; SHACK, L.; WOODWARD, E.; MAHER, E.R.; LALLOO, F.; EVANS, D.G.R. Risk of cancer other than breast or ovarian in individuals with BRCA1 and BRCA2 mutations. **Familial Cancer**, 11, 235–242, 2012.

NASCIMENTO, F. B.; PITTA, M. G. R.; RÊGO, M. J. B. M. Análise dos principais métodos de diagnóstico de câncer de mama como propulsores no processo inovativo. **Arquivos de medicina**, 2015.

NAROD, S. A.; FOULKES, W. D. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 9, p. 665–676, 2004.

NCCN. Breast cancer. In: **NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®)**. [s.l: s.n.]. v. 1p. 1–209.

OPAS. **Organização Pan-Americana da Saúde**. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5344:diagnostico-precoce-do-cancer-salva-vidas-e-reduz-custos-de-tratamento&Itemid=839>. Acesso em: 15 fev. 2019.

OTTMAN, R, PIKE M. C, KING M. C. Practical guide for estimating risk for familial breast cancer. **Lancet**, 2:556-8, 1983.

PALMA, G.; FRASCI, G.; CHIRICO, A.; ESPOSITO, E.; SIANI, C.; SATURNINO, C.; ARRA, C.; CILIBERTO, G.; GIORDANO, A.; D'AIUTO, M. Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments. **Oncotarget**, v. 6, n. 29, p. 26560–26574, 2015.

PALMERO, E. I.; ALEMAR, B.; SCHÜLER-FACCINI, L.; HAINAUT, P.; MOREIRA-FILHO, C. A.; EWALD, I. P.; SANTOS, P. K.; RIBEIRO, L. I.; NETO, C. B. O.; CALVEZ-KELM, F. L.; TAVTIGIAN, S.; COSSIO, S. L.; GIUGLIANI, R.; CALEFFI, M.; ASHTON-PROLLA, P. P. 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. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 210–222, 2016.

PIETSCHMANN, A.; MEHDIPOUR, P.; ATRI, M.; HOFMANN, W.; HOSSEINI-ASL, S. S.; SIEGFRIED SCHERNECK, S.; MUNDLOS, S.; PETERS, H.; Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Iranian high risk breast cancer families. **J Cancer Res Clin Oncol**. 131: 552–558, 2005.

PIERCE, B. A. **Génética: Um Enfoque Conceitual**. 5. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

RAKHA, E. A. Soria, D.; Green, A. R.; Lemetre, C.; Powe, D. G.; Nolan, C. C.; Garibaldi, J. M.; Ball, G.; Ellis, I. O.; Nottingham prognostic index plus (NPI+): A modern clinical decision making tool in breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 7, p. 1688–1697, 2014.

READY, K.; GUTIERREZ-BARRERA, A.M.; AMOS, C.; MERIC-BERNSTAM, F.; LU, K.; HORTOBAGYI, G.; ARUN, B. Cancer risk management decisions of women with BRCA1 or BRCA2 variants of uncertain significance. **Journal Breast**, 17, 210–212. 2011.

REBBECK, T. R.; MITRA, N.; WAN, F.; SINILNIKOVA, O. M.; HEALEY, S.; LESLEY, G. Consortium Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 313, n. 13, p. 1347–1361, 2015.

RICH, T. A. et al. Hereditary breast cancer syndromes and genetic testing. **Journal of Surgical Oncology**, v. 111, n. 1, p. 66–80, 2015.

RIZZOLO, P; SILVESTRI, V.; TOMMASI, S. Male breast cancer: Genetics, epigenetics, and ethical aspects. **Ann Oncol**. v.24. p. viii75- viii82, 2013.

RODRIGUEZ, J. A.; AU, W. W. Y.; HENDERSON, B. R. Cytoplasmic mislocalization of BRCA1 caused by cancer-associated mutations in the BRCT domain. **Experimental Cell Research**, v. 293, n. 1, p. 14–21, fev. 2004.

SAMBROOK, J.; GREEN, M. R. Molecular cloning - A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor**, v. 1, p. 1–34, 1989.

SCHWEIGER, M. R. et al. The power of NGS technologies to delineate the genome organization in cancer: From mutations to structural variations and epigenetic alterations. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 30, n. 2, p. 199–210, 2011.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics 2012. **CA Cancer J. Clin.** v.62. p.10-29, 2012.

SILVA, F. C.; LISBOA, B. C. G.; FIGUEIREDO, M. C. P.; TORREZAN, G. T.; SANTOS, E. M. M.; KREPISCHI, A. C.; ROSSI, B. M.; ACHATZ, M. I.; CARRARO, D. M.; Hereditary breast and ovarian cancer: Assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. **BMC Medical Genetics**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2014.

SILVA FELICIO, P. et al. Genetic and epigenetic characterization of the BRCA1 gene in Brazilian women at-risk for hereditary breast cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 2, p. 2850–2862, 2017.

SIMARD, J.; TONIN, P.; DUROCHER, F.; MORGAN, K.; ROMMENS, J.; GINGRAS, S.; SAMSON, C.; LEBLANC, J.F.; BÉLANGER, C.; DION, F.;- LIU, Q.; SKOLNICK, M.; GOLDGAR, D.; SHATTUCK-EIDENS, D.; LABRIE, F.; NAROD, S.A. Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. **Nature**

Genetics. 1994.

SUSZYNSKA, M.; KLONOWSKA, K.; JASINSK, A. J.; KOZLOWSKI, P. BRCA1/BRCA2 Germline Mutation Carriers and Sporadic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gynecologic Oncology*, 452–462, 2019.

TAI, Y. C.; DOMCHEK, S.; PARMIGIANI, G. Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* v. 99. P.1811-1814, 2007.

TEJERINA BERNAL, A. et al. Breast imaging: How we manage diagnostic technology at a multidisciplinary breast center. *Journal of Oncology*, v. 2012, 2012.

THOMPSON; THOMPSON. Genética Médica. In: **Genética Médica**. 7 ed ed. [s.l: s.n.]. p. 1–1.514.

TIMOTEO, A. R. S., **Identificação e caracterização molecular de mutações germinativas em indivíduos com Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE, 2016.

TSAI, C. J.; SAUNA, Z. E.; KIMCHI-SARFATY, C.; AMBUDKAR, S. V.; GOTTESMAN, M. M.; NUSSINOV, R. Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima. *Journal of Molecular Biology*. November 2008;383(2):281-291.

TUNG, N. M. D.; BATTELLI, C. M. D.; ALLEN, B. M. S.; KALDATE, R. M.S; BHATNAGAR, S.; BOWLES, K.; TIMMS, K.; GARBER, J.; HEROLD, C.; ELLISEN, L.; KREJDOVSKY, J.; DELEONARDIS, K.; SEDGWICK, K.; SOLTIS, K.; ROA, B.; WENSTRUP, R. J.; HARTMAN, A. R. Frequency of Mutations in Individuals With Breast Cancer Referred for BRCA1 and BRCA2 Testing Using Next-Generation Sequencing With a 25-Gene Panel. *Cancer*, 2015.

VENKITARAMAN, A. R. Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. *Science*, v. 343, n. 6178, p. 1470–1475, 2014.

WALLIS, Y. et al. Practice Guidelines for the Evaluation of Pathogenicity and the Reporting of Sequence Variants in Clinical Molecular Genetics. *Acgs*, n. September, p. 16, 2013.

WEIGELT, B.; GEYER, F. C.; REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: How special are they? *Molecular Oncology*, v. 4, n. 3, p. 192–208, 2010.

WONG, S. M.; FREEDMAN, R. A.; SAGARA, Y.; AYDOGAN, F.; BARRY, W. T.; GOLSHAN, M. Growing use of contralateral prophylactic mastectomy despite no improvement in long-term survival for invasive breast cancer. *Ann Surg*. 2017 Mar;265(3):581-589, 2017.

YADAV, B. S. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. *World Journal of Clinical Oncology*, v. 6, n. 6, p. 252, 2015.

YANG, M.; DU, X.; ZHANG, F.; YUAN, S. Association between BRCA1 polymorphisms rs799917 and rs1799966 and breast cancer risk: a meta-analysis. **Journal of International Medical Research**, 0(0) 1–8, 2019

YERUSHALMI, R.; HAYES, M. M.; GELMON, K. A. Breast carcinoma - Rare types: Review of the literature. **Annals of Oncology**, v. 20, n. 11, p. 1763–1770, 2009.

ANEXO I

TCLE

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Realização de Teste Genético

Título do Projeto: Investigação da mutação do gene BRCA1 nos pacientes com câncer de mama na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas

Este projeto pretende identificar e caracterizar as mutações (alterações) nos genes BRCA1 em pacientes com suspeita da hereditariedade no câncer de Mama, em atendimento na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON).

Para realizar a coleta, será necessária a retirada de 10 ml de sangue por uma punção de uma veia do braço. O local da punção pode apresentar leve dor ou inchaço e algum desconforto que regredem espontaneamente. No laboratório, o sangue coletado será utilizado para extração de DNA e análise do gene BRCA1. O material ficará estocado em freezer por tempo indeterminado e não será disponibilizado para outras pesquisas sem sua prévia autorização.

Sua identidade ficará em sigilo e as informações obtidas durante a pesquisa serão confidenciais e somente membros da equipe terão acesso durante o processo. Você não é obrigado a continuar participando do projeto podendo, a qualquer momento, pedir para que os seus dados não façam parte da pesquisa, sem que deixe de ser tratado como os demais pacientes assistidos na instituição. Poderá requisitar, particularmente, seus dados, os dados referentes à análise do seu DNA e orientação adicional, fornecidas pelo pesquisador. Como não haverá qualquer custo para você participar deste trabalho, nenhuma forma de pagamento poderá ser cobrada pela sua participação.

Assim, declaro que fui esclarecido:

- Sobre as características da hereditariedade do câncer de mama;
- Sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento sobre procedimentos, riscos, benefícios e as limitações do teste genético ao qual serei submetido;
- Sobre a minha liberdade em retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo ao acompanhamento médico e continuidade do meu tratamento;
- Sobre o não recebimento de nenhum tipo de remuneração financeira;
- Sobre a segurança de que minha identidade será preservada, que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais e que o DNA do meu sangue armazenado no hospital será utilizado apenas para este projeto;

Concordo em participar deste estudo.

Manaus, _____ de _____ de _____.

Nome do paciente: _____

Local de Nascimento: _____

Data de nascimento: __/__/__

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____ Fone: _____

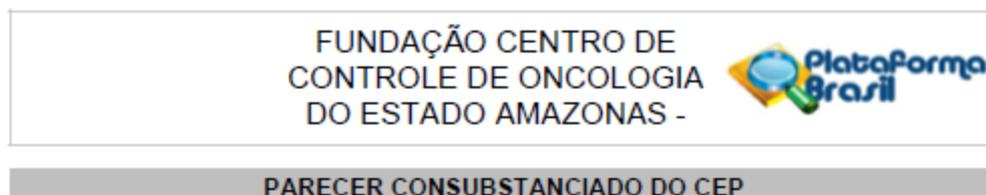
Assinatura do paciente ou responsável: _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Fone para contato: (92)

ANEXO II

Parecer Consubstanciado do CEP



DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação da mutação do gene BRCA1 nos pacientes com câncer de mama da Fundação Centro de Controle de Oncologia do estado do Amazonas

Pesquisador: Cleiton Fantin

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

Versão: 3

CAAE: 16360913.0.0000.0004

Instituição Proponente: Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 510.432

Data da Relatoria: 14/11/2013

Apresentação do Projeto:

O projeto visa identificar a frequência e as características das mutações germinativas nos éxons do gene BRCA1 em 30 pacientes com diagnóstico de Câncer de Mama da FCECON que atenderem os critérios estabelecidos no questionário de sondagem elaborado de acordo com a NCCN (National Comprehensive Cancer Network). Seus resultados nesta etapa inicial de levantamento contribuíram para somente identificar quais são os éxons possíveis de mutação existentes nestas pacientes já acometidos, para em um projeto futuro saber quais são os predominantes.

contribuir para caracterização da população amazonense acometida por câncer de mama.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar as mutações no gene BRCA1 presentes em 8 éxons em pacientes com suspeita de hereditariedade de câncer de mama do Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas