



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

REBECA MOTA GOVEIA

**Análise de deleção/ duplicação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em
pacientes de Goiás-Brasil com suspeita da Síndrome do Câncer de
Mama e Ovário Hereditário**

**Goiânia
2018**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

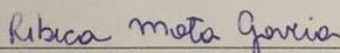
Nome completo do autor: Rebeca Mota Goveia

Título do trabalho: Análise de deleção/ duplicação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes de Goiás-Brasil com suspeita da Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditário

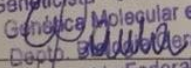
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²


Ciente e de acordo
Dra. Elisângela de P. Silveira Lacerda
Geneticista
Lab. Genética Molecular e Citogenética
Dep. de Biologia Geral / ICB
Univ. Federal de Goiás

Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 17 / 07 / 2018

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² A assinatura deve ser escaneada.

REBECA MOTA GOVEIA

**Análise de deleção/ duplicação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em
pacientes de Goiás-Brasil com suspeita da Síndrome do Câncer de
Mama e Ovário Hereditário**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Goiás para obtenção do
Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador(a): Elisângela de Paula Silveira Lacerda
Co-orientador(a): Rebeca Mota Goveia

**Goiânia
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

MOTA GOVEIA, REBECA
ANÁLISE DE DELEÇÃO/DUPLICAÇÃO NOS GENES BRCA1 E
BRCA2 EM PACIENTES DE GOIÁS-BRASIL COM SUSPEITA DA
SÍNDROME DO CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO HEREDITÁRIO
[manuscrito] / REBECA MOTA GOVEIA. - 2018.
LXXIX, 79 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. ELISÂNGELA DE PAULA SILVEIRA
LACERDA.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, Goiânia, 2018.

Bibliografia. Anexos.

1. BRCA1. 2. BRCA2. 3. CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO. 4.
MLPA. I. DE PAULA SILVEIRA LACERDA, ELISÂNGELA, orient. II.
Título.

CDU 575



Ministério da Educação
Universidade Federal de Goiás
Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



ATA DA SEÇÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aluno (a): Rebeca Mota Gouveia

Orientador (a): Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Título da Dissertação: "Análise de rearranjos gênicos nos genes BRCA1 e BRCA2 em pacientes de Goiás – Brasil com suspeita da Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditário".

Data: 07 de março de 2018

Horário: 14:00 horas

Local: Sala de aula do Programa/Anexo II da Faculdade de Farmácia

Sugestões*:

*Obs. sugestão de alteração de título da dissertação deve ser acompanhada de justificativa

ANÁLISE DE DELEÇÃO/DUPLICAÇÃO NOS GENES BRCA1 E
BRCA2 EM PACIENTES DE GOIÁS - BRASIL COM
SUSPEITA DA SÍNDROME DO CÂNCER DE MAMA E
OVÁRIO HEREDITÁRIO

Parecer da Banca Examinadora

Membro	Aprovado/Reprovado	Assinatura
Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda (ICB/UFG) - Presidente	APROVADA	
Prof. Dr. Prof. Dr. Bruno Faulin Gamba (ICB/UFG)	APROVADA	
Profa. Dra. Aliny Pereira de Lima (FIBRA)	APROVADA	
Profa. Dra. Rosângela Hatori Rocha (ICB/UFG) - Suplente	—	—
Profa. Dra. Nádia Aparecida Bérnaro (ICB/UFG) - Suplente	—	—
Parecer Final	Aprovado/Reprovado	APROVADA



UFG

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Profº. Drº. Luís Carlos Cunha

Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação

Profº. Drº. Mateus Lavorenti Rocha

**Goiânia-GO
2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Rebeca Mota Goveia

Orientador(a): Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Prof^a Dr^a Elisângela de Paula Silveira Lacerda / Presidente

Professora Titular da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás, FF/UFG.

Prof^a Dr^a Aliny Pereira Lima / Membro Titular

Professor Titular da Faculdade FIBRA

Prof^o Dr^o Bruno Faulim Gamba / Membro Titular

Professor Titular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás,
ICB/UFG.

Prof^a Dr^a Rosângela Hatori Rocha / Membro Suplente

Professor Titular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás,
ICB/UFG.

Prof^a Dr^a Nádia Aparecida Bérnago / Membro Suplente

Professor Titular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás,
ICB/UFG.

Data: 07/03/2018

Dedico este trabalho aos meus pais, José Hélio e Sílvia

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me propiciar saúde e conhecimento para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, Sílvia e José Hélio, pelo trabalho e esforço em cuidar da minha educação e saúde.

Aos meus irmãos, em especial a Mariana, que esteve presenciando tanto os momentos de alegria quanto os momentos difíceis.

A todos os meus familiares, em especial à tia Ana Maria, que sempre esteve me apoiando e cuidando de mim.

A minha Orientadora, Dr^a Elisângela, por todo o conhecimento transmitido e compreensão, por não ser apenas uma orientadora acadêmica, mas uma pessoa que se importa com o próximo.

A Paula, pelo apoio e ajuda durante toda a execução do projeto, como colega de trabalho e amiga.

A Thais, por toda a orientação, ajuda, paciência e conhecimentos compartilhados.

Ao Dr^o Ruffo, por permitir a execução do projeto no departamento de mastologia do Hospital das Clínicas- UFG e sempre se mostrar interessado em ajudar.

A todos os pacientes participantes da pesquisa, pela atenção, tempo, paciência e o carinho com o qual sempre me trataram.

A toda equipe do CORA, por toda paciência e prontidão que sempre tiveram comigo, em especial a Naiara.

A todo o pessoal do PPGCF, em especial a Fernanda, por estar sempre pronta a orientar e ajudar.

Aos professores Hugo e Bruno, por toda a ajuda e orientação prestada no decorrer deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, em especial a Thallita, Davi, Patrícia, Eduardo, Lucas, Jeffiter, Isabela e Elisângela pelo carinho e atenção nos momentos difíceis.

Aos meus amigos, em especial a Letícia, Priscyla, Luciana, Anderson e Mayco pelo carinho e amizade nos momentos bons e principalmente nos momentos ruins.

A CAPES pelo apoio financeiro que tornou possível que me dedicasse de forma exclusiva a este projeto.

A todos que de alguma forma me incentivaram a continuar o trabalho, mesmo com todos os imprevistos e problemas que surgiram no caminho.

Ítem	Assunto	Página
Introdução	Aspéctos gerais do câncer	1
	O câncer de mama	3
	Classificação histológica e molecular dos tumores da mama	3
	O câncer de mama masculino	6
	Síndromes relacionadas com câncer de mama hereditário	6
	O papel dos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	9
	Mutações em <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	11
	Síndrome da predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC)	17
	Estratégias de prevenção e tratamentos para indivíduos com a síndrome HBOC	19
	Mutações em <i>BRCA 1</i> e <i>BRCA 2</i> e aspectos toxicológicos do tratamento de pacientes com carcinoma ductal invasivo.	20
Objetivos	Objetivo geral	22
	Objetivos específicos	22
Métodos	Causuística	23
	Obtenção, manipulação e armazenamento das amostras	23
	Extração de DNA	24
	<i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i> (MLPA)	24
	Avaliação da relação entre o alto risco de mutação nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> e sua relação com a toxicidade da quimioterapia.	25
	Resultados	
	Perfil dos pacientes participantes da pesquisa	26
	MLPA	28
	Análise da Toxicidade apresentada a quimioterapia de acordo com o status mutacional previsto por softwares	32
Discussão		35
Conclusão		40
Considerações Finais		41
Referências		42
Anexos		53

Título	Página
Figura 1. Representação esquemática do surgimento e progressão tumoral	2
Figura 2. Características imunohistoquímicas dos diferentes subtipos moleculares de carcinomas de mama.	5
Figura 3. Perfil de distribuição do câncer de mama esporádico e hereditário e do heredograma de pacientes com mutação autossômica dominante	7
Figura 4. Localização dos genes <i>BRCA1</i> no cromossomo 17 e <i>BRCA2</i> no cromossomo 13.	9
Figura 5. Representação esquemática do gene <i>BRCA 1</i>	9
Figura 6. Representação esquemática do gene <i>BRCA 2</i>	11
Figura 7. Representação esquemática da ação dos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> no reparo de DNA	11
Figura 8. História familiar das pacientes	27
Figura 9. Eletroferograma gerado pela análise de MLPA no software CoffaLyzer.net demonstrando padrão de picos para pacientes sem alterações no gene <i>BRCA1</i>	28
Figura 10. Gráfico de caixas, gerado pelo software CoffaLyzer.net demonstrando resultado padrão para pacientes sem alterações no gene <i>BRCA1</i>	29
Figura 11. Eletroferograma gerado pela análise de MLPA no software CoffaLyzer.net evidenciando amplificação reduzida para uma região do éxon 27 do gene <i>BRCA2</i>	29
Figura 12. Gráfico de picos gerado pela análise de MLPA no software CoffaLyzer.net evidenciando deleção em heterozigose de parte do éxon 27 do gene <i>BRCA2</i>	30
Figura 13. Eletroferograma gerado pela análise de MLPA no software CoffaLyzer.net, realizado para confirmação da ausência ou presença da variante observada em um paciente, evidenciando boa amplificação de todos os éxons do gene <i>BRCA2</i> , descartando suspeita de alteração avaliável pela técnica de MLPA	30
Figura 14. Gráfico de caixas gerado pela análise de MLPA no software CoffaLyzer.net, realizado para confirmação da ausência ou presença da variante observada em um paciente, evidenciando ausência de alterações no gene <i>BRCA2</i> avaliáveis pela técnica de MLPA	31
Figura 15. Eletroferograma gerado pela análise de MLPA no software CoffaLyzer.net demonstrando padrão de picos para pacientes sem alterações no gene <i>BRCA2</i>	31

Figura 16. Gráfico de caixas, gerado pelo software <i>CoffaLyzer.net</i> demonstrando resultado padrão para pacientes sem alterações no gene <i>BRCA2</i> .	32
Tabela 1. Variação de frequência da presença de variantes gênicas nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> encontrada por diferentes estudos realizados no mundo	13
Tabela 2. Variação de frequência da presença de variantes gênicas nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> encontrada por diferentes estudos realizados no Brasil	16
Tabela 3. Perfil dos pacientes participantes da pesquisa	27
Tabela 4. Diferentes tipos de tumores malignos observados na história familiar dos pacientes participantes da pesquisa e sua prevalência.	28
Tabela 5. Análise do risco do paciente possuir variantes nos genes <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> de acordo com diferentes modelos de predição.	32
Tabela 6. Frequência da incidência dos diferentes efeitos colaterais a quimioterapia, relatados nos diferentes grupos estudados	33
Anexo 1. Comprovante de submissão	53
Anexo 2. Parecer do comitê de ética	54
Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e esclarecido	55
Anexo 4. Questionário	61
Anexo 5. Sondas do Kit <i>BRCA 1</i>	64
Anexo 6. Sondas do Kit <i>BRCA 2</i>	65

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Símbolo, sigla ou abreviatura	Significado
ANS	Agencia Nacional de Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
HBOC	Síndrome da pré-disposição hereditária ao câncer de mama e ovário
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
MDC1	Mediator of DNA damage checkpoint protein1
MLH1	Human MutL Homolog 1
MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
MSH2	Human MutS Homolog 2
NGS	Sequenciamento de nova geração
OMS	Organização Mundial de Saúde
PARP	Polimerase de poli ADP-ribose
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PTEN	Gene fosfatase e homólogo de angiotensina
RAD51	RAD51 recombinase
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
SKT11	Serina / treonina quinase 11
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
TBE	Tris/ borato/ EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TP53	Gene supressor de tumor TP53
UV	Ultra-violeta
γ H2AX	Histona H2AX

Análise de deleção/ duplicação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes de Goiás-Brasil com suspeita da Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditário

Goveia R.M.¹; Silva P.F.F.¹; Teixeira T. B.²; Gamba B.F.¹; Lima, A. P.¹; Freitas-Junior, R.²;
Silveira-Lacerda E.P.¹

¹Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. ²Departamento de Mastologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás.

RESUMO

Introdução: O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo, e o mais comum entre as mulheres, apenas 5% a 10% são hereditários e metade deles são causados pela síndrome do câncer de mama e ovário hereditário (HBOC), causada por variações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. **Objetivos:** O presente estudo teve como objetivo identificar a prevalência de deleções e duplicações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes com câncer de mama no estado de Goiás, Brasil. **Materiais e métodos:** Avaliamos 46 pacientes com câncer de mama que atenderam aos critérios do National Comprehensive Cancer Network (NCCN) para pesquisa da síndrome HBOC. Foi coletada uma amostra de sangue de 4 ml para extração de DNA usando kit comercial e a técnica MLPA (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification) foi realizada usando os kits SALSA MLPA P002 *BRCA1* e SALSA MLPA P045 *BRCA2* / *CHECK2*. **Resultados e discussão:** A maioria dos pacientes era do sexo feminino (97.83%) e a idade média dos pacientes era de 37,52 anos. Neste grupo 43.47% dos pacientes possuíam idade inferior a 35 anos no momento do diagnóstico sendo que 35% destes foram diagnosticados com tumores triplo negativo. O subtipo molecular mais comum foi o luminal A (46.2%) seguido de tumores triplo negativos (28.20%). Nenhum paciente foi encontrado com rearranjos no gene *BRCA1*. No gene *BRCA2*, um paciente (2,12%) apresentou um resultado falso positivo para a deleção em heterozigose do éxon 27, fato que pode ter sido ocasionado pela presença de uma pequena alteração na região de ligação da sonda. **Conclusão:** Este foi o primeiro estudo realizado para análise de grandes deleções e duplicações em pacientes da região centro-oeste do Brasil. Podemos concluir que a frequência de grandes deleções e duplicações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* na população goiana é baixa.

Palavras-Chave: *BRCA1*; *BRCA2*; câncer de mama hereditário; MLPA.

Agradecimentos: LGMC, CORA e CAPES.

Analysis of large deletions and duplications in the *BRCA1* and *BRCA2* genes in patients from Goiás-Brazil with suspected Breast Cancer and Hereditary Ovarian Syndrome

Goveia R.M.¹; Silva P.F.F.¹; Teixeira T. B.²; Gamba B.F.¹; Lima, A. P.¹; Freitas-Junior, R.²; Silveira-Lacerda E.P.¹

¹Laboratório de Genética Molecular e Citogenética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. ²Departamento de Mastologia, Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Goiás.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is the second most common cancer in the world, and the most common among women, only 5% to 10% are hereditary and half of them are caused by hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) , caused by variations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes. **Objectives:** The present study aimed to identify the prevalence of deletions and duplications in *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer patients in Goiás, Brazil. **Materials and methods:** We evaluated 46 breast cancer patients who met National Comprehensive Cancer Network (NCCN) criteria for HBOC syndrome screening. A 4 ml blood sample was collected for DNA extraction using commercial kit and the MLPA (Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification) technique was performed using the SALSA MLPA P002 *BRCA1* and SALSA MLPA P045 *BRCA2* / *CHECK2* kits. **Results and discussion:** The majority of the patients were female (97.83%) and the mean age of the patients was 37.52 years. In this group, 43.47% of the patients were younger than 35 years at the time of diagnosis and 35% of them were diagnosed with triple negative tumors. The most common molecular subtype was luminal A (46.2%) followed by triple negative tumors (28.20%). No patient was found with rearrangements in *BRCA1*. In the *BRCA2* gene, one patient (2.12%) presented a false positive result for the heterozygous deletion of exon 27, which may have been caused by the presence of a small change in the probe binding region. **Conclusion:** This was the first study performed to analyze large deletions and duplications in patients from the central-western region of Brazil. We can conclude that the frequency of large deletions and duplications in the *BRCA1* and *BRCA2* genes in the Goian population is low.

Keywords: BRCA1; BRCA2; hereditary breast cancer; MLPA.

Acknowledgments: LGMC, CORA and CAPES.

1.1. Aspectos gerais do câncer

A cada ano surgem cerca de oito milhões de novos casos de câncer no mundo e segundo previsões da OMS (Organização Mundial de Saúde) em 2030 cerca de 22 milhões de pessoas serão diagnosticadas com a doença e cerca de 13 milhões irão a óbito em decorrência da mesma, sendo atualmente a segunda maior causa de mortes em todo o mundo, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Para o Brasil, no período entre 2018 e 2019 a previsão é de que sejam diagnosticados seicentos mil novos casos de câncer em cada ano (INCA, 2018).

O termo câncer foi utilizado pela primeira vez por Hipócrates, fazendo uma comparação entre o crescimento infiltrante dos tumores e a forma que as pernas dos caranguejos se fixam na areia. Os cânceres de uma forma geral vêm trazendo danos a saúde humana a milênios e apesar da origem antiga da doença sua incidência só vem aumentando com o decorrer do tempo (TEIXEIRA & FONSECA, 2007; CHENE et. al.,2016).

Reconhecido pela primeira vez como uma patologia de caráter local apenas no século XVIII o câncer não é só uma doença, mas um conjunto de mais de cem doenças que possuem características clínicas e patológicas distintas tendo como ponto em comum o fato de se originarem a partir de uma célula mutada que possui crescimento desordenado e autônomo (LI et al., 2007; IARC, 2011; PELTOMAKI, 2012).

As células tumorais não são bem diferenciadas e especializadas, sendo assim, não conseguem realizar as funções que deveriam lhes pertencer, invadem o tecido normal e levam o mesmo a perda de função. Além disso as células mesmas podem ainda “migrar” para outras regiões do corpo, gerando metástases, as responsáveis são uma subpopulação de células, que estão presentes no interior das massas neoplásicas, denominadas células tronco tumorais, que são cada vez mais mutadas e agressivas quando comparadas com as células tumorais “mãe” que deu origem ao tumor (Figura 1) (LI et al., 2007; IARC, 2011; PELTOMAKI, 2012; SAMPIERI & FODDE, 2012; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013; TEIXEIRA & FONSECA, 2007; INCA, 2017).

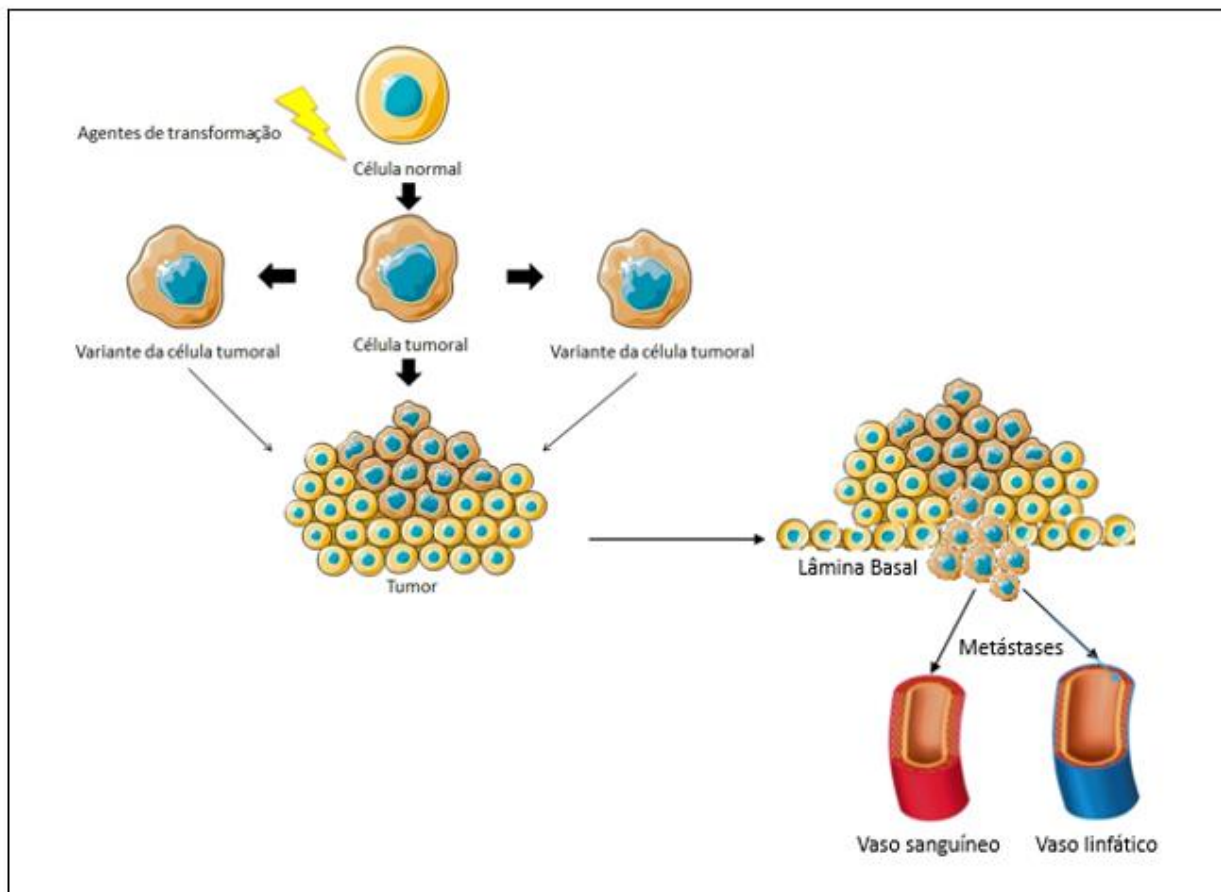


Figura 1 Representação esquemática do surgimento e progressão tumoral. (Fonte: próprio autor, adaptado de Robbins & Cotran, Bases Patológicas das doenças, p.289; Cooper & Hausman, A célula: Uma abordagem molecular, p.627).

As células tronco possuem como características principais a sua capacidade de auto renovação e diferenciação, sendo as responsáveis por manter a integridade dos diferentes tecidos. As células que dão origem a massa tumoral são denominadas como células tronco tumorais, pois compartilham características semelhantes às encontradas nas células tronco comuns. Estas células possuem alta expressão de CD44 e são responsáveis pela anutenção e crescimento da massa tumoral (OLIVEIRA et al., 2010; CARIAT & PURUSHOTHAM, 2008; ABRAHAM et al., 2005; PHILLIPS et al., 2006).

Atualmente sabemos que todo câncer é uma doença genética, porém é importante salientar que o fato de ser uma doença genética não o torna obrigatoriamente uma doença hereditária. A maioria dos tumores ocorre devido a mutações somáticas, ou seja, que foram adquiridas durante a vida devido a fatores ambientais e não podem ser passadas para a prole.

Apenas uma pequena parcela, de aproximadamente 10% de todos os tumores, se deve a mutações germinativas e, apenas nestes casos, um câncer surgirá devido a fatores exclusivamente genéticos e nesta condição poderá ser transmitida para a prole, sendo que comumente todas as gerações aparecem afetadas (JORDE et al., 2000).

1.2. O câncer de mama

Os tumores da mama são o segundo tipo de câncer mais incidente no mundo, perdendo apenas para o câncer de pele não melanoma, e são os mais comuns na população feminina. Respondem a 25% dos casos de câncer neste grupo sendo o maior responsável por mortes de mulheres em todas as faixas etárias no mundo. Segundo as previsões da *American Cancer Society* para 2018, foi estimado o surgimento de 268000 novos casos de câncer de mama no mundo e 41400 óbitos em decorrência do mesmo (INCA, 2018; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

Antes dos 35 anos a incidência do câncer de mama é relativamente rara, sendo que os índices aumentam rapidamente a partir dos 40 anos de idade. Diferente de outras doenças e até mesmo de outros tipos de câncer, o câncer de mama tem aumentado a sua incidência tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, sendo que o maior número de casos ocorre em países desenvolvidos. Em 2012, Europa e América do Norte somaram juntas, 43% de todos os novos de câncer de mama diagnosticados no mundo (INCA, 2016).

No Brasil, excluindo-se o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é também o que mais afeta mulheres e o principal responsável por mortes femininas no país. O Brasil abriga 50% de todos os casos de câncer de mama da América Latina, sendo estimados para o biênio 2018-2019 o surgimento de 59.700 novos casos de câncer de mama (INCA, 2018).

O câncer de mama, quando diagnosticado precocemente possui elevada chance de cura, e esse diagnóstico precoce se dá principalmente por meio da mamografia. O Ministério da saúde recomenda ainda a realização anual do exame de mamografia para mulheres entre 40 e 74 anos de idade, sendo que em caso de mamas densas é recomendada a realização de ultrassonografia em conjunto. A partir dos 75 anos os riscos de desenvolvimento de danos celulares devido aos exames provavelmente superam os benefícios do rastreamento (URBAN et al., 2017).

Mulheres de famílias que possuem síndromes hereditárias que predispoem o câncer de mama devem iniciar o rastreio anual com mamografia a partir dos 30 anos e o rastreio anual com ressonância magnética a partir dos 25 anos (URBAN et al., 2017).

1.3. Classificação histológica e molecular dos tumores da mama

O câncer de mama é uma doença heterogênea sendo que diferentes subtipos de tumores apresentam características clínicas distintas (LI et al., 2005; INCA, 2016).

De acordo com os aspectos histológicos, os tumores da mama podem ser divididos em 20 diferentes subtipos, são eles: Carcinoma invasivo de tipo não especial, Carcinoma lobular invasivo, Carcinoma tubular, Carcinoma cribriforme, Carcinoma com características medulares, Carcinoma metaplásico, Carcinoma com diferenciação apócrina, Carcinoma adenoide cístico, Carcinoma mucoepidermoide, Carcinoma polimorfo, Carcinoma mucinoso e carcinoma com células em anel de sinete, Carcinoma com características neuroendócrinas, Carcinoma papilífero invasivo, Carcinoma micropapilífero invasivo, Carcinoma secretor, Carcinoma oncocítico, Carcinoma sebáceo, Carcinoma rico em lipídeos, Carcinoma de células claras rico em glicogênio e Carcinoma de células acinares. Destes o subtipo mais frequente é o carcinoma invasivo de tipo não especial, ou, carcinoma ductal invasivo, sendo responsável por aproximadamente 80% de todos os casos de câncer de mama. Além desses existe uma condição, relativamente rara, que responde a cerca de 0,5% de todos os tumores mamários malignos, conhecida como doença de Paget da mama que é caracterizada por um tumor que acomete as aréolas e mamilos. (Li et al, 2003; Li et al, 2005; GEYER, 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DE MASTOLOGIA, 2016; INCA, 2016).

O câncer de mama pode ser classificado ainda em diferentes subtipos de acordo com as características moleculares dos tumores, sendo que cada subtipo possui tratamento e prognóstico distintos, sendo hoje esta caracterização essencial no momento do diagnóstico do paciente (POLIAK, 2007; RIVENBARK et al., 2013).

Classicamente, os carcinomas de mama são categorizados molecularmente em quatro subtipos (Figura 2) (PEROU et al., 2000; CHEANG et al, 2009; CIRQUEIRA et al, 2011; GEYER, 2013):

- Luminal A: o tumor possui aumento de expressão dos receptores de estrogênio e/ou progesterona sem aumento da presença de receptores HER2 (receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano) e com índice Ki67 menor que 14%.
- Luminal B: o tumor possui aumento de expressão dos receptores de estrogênio e/ou progesterona sem aumento da presença de receptores HER2 e com índice Ki67 maior que 14% ou quando o tumor possui aumento de expressão de receptores de estrogênio, progesterona e HER2 positivos.
- Superexpressão de HER2: o tumor apresenta aumento de expressão dos receptores de HER2 sem a presença de aumento de expressão dos receptores de estrogênio ou progesterona.

- Triplo negativo: o tumor não possui aumento de expressão de receptores hormonais.

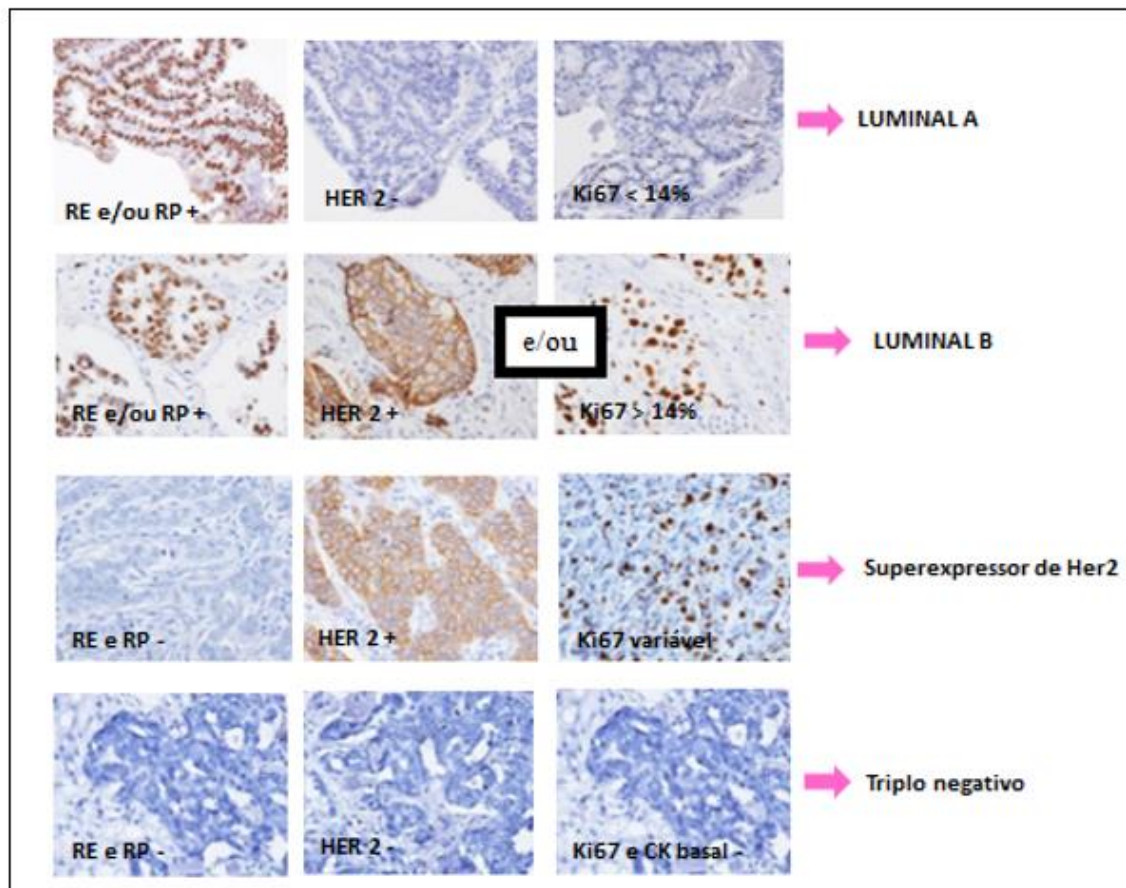


Figura 2 Características imunohistoquímicas dos diferentes subtipos moleculares de carcinomas de mama. (Fonte: próprio autor, adaptado de: <https://pt.slideshare.net/FonteMD/aula-mastologia-mama-patologia-molecular>)

A expressão gênica é o método padrão ouro para a caracterização molecular dos tumores, todavia a mesma também pode ser realizada com resultados satisfatórios por meio da imuno-histoquímica, técnica colorimétrica, que consiste na utilização de anticorpos monoclonais marcados com substâncias cromógenas (CIRQUEIRA et al, 2011).

A classificação molecular dos tumores é de grande importância, servindo como marcador prognóstico e auxiliando na escolha terapêutica. Os pacientes com tumores com alta expressão de receptores de estrogênio são os que apresentam o melhor prognóstico, com melhores taxas de sobrevida e boa resposta ao tratamento hormonal. Os tumores com aumento da expressão de receptores de estrogênio e progesterona são chamados de luminais devido ao fato desses receptores serem comumente encontrados nas células luminais do tecido mamário saudável (CLARK et al., 2010; PEROU et al., 2010; SORLIE et al., 2003).

Os tumores luminais são o subtipo molecular mais comum de carcinomas mamários, respondem bem ao tratamento com antraciclinas e se beneficiam do tratamento com tamoxifeno, que age no tecido mamário como um antagonista do estrogênio (PAYNE et al., 2008; ANVISA, 2015).

Os tumores com aumento da expressão de HER2 possuem alta atividade mitótica em comparação com os tumores luminais e possuem mau prognóstico, sendo que estes pacientes apresentam menor sobrevida livre da doença. O HER2 é um proto-oncogene relacionado com o fator de crescimento epidérmico humano e responde bem ao tratamento com tratuzumabe, um fármaco que age se ligando seletivamente aos receptores de HER2 das células (GOLDHIRSCH et al., 2005; HANBY, 2005; ANVISA, ano ?).

Os tumores triplo negativos, também chamados de basais, possuem mau prognóstico e são o subtipo mais agressivo de carcinoma mamário, sendo que este grupo possui expressão de marcadores moleculares semelhantes aqueles observados nas células mamárias saudáveis (TURNER & REIS-FILHO, 2006; RAKHA et al., 2007; THIKE et al., 2010).

1.4. O câncer de mama masculino

O câncer de mama também acomete homens, todavia, esta é uma condição extremamente rara, sendo responsável por apenas 1% de todos os cânceres masculinos e estão comumente relacionadas a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* sendo que mutações em *BRCA2* são responsáveis por 10% de chances de um homem portador desenvolver câncer de mama em algum momento da vida. Este risco é extremamente elevado em comparação com os riscos da população masculina em geral para o desenvolvimento deste tipo de câncer. 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 & EYLES, 2012; SIEGEL et al., 2012; RIZZOLO et al., 2013; KOTE-JARAI et al., 2011;).

1.5. Síndromes relacionadas com câncer de mama hereditário

Como mencionado anteriormente apenas cerca de 10% de todas as neoplasias ocorrem por fatores exclusivamente hereditários, devido a mutações germinativas, e, normalmente, estas podem estar relacionadas a síndromes multicânceres. Normalmente estas mutações são autossômicas dominantes e possuem alta penetrância, ou seja, o indivíduo portador da mutação possui 50% de chances de passar a condição para a prole além de possuir um risco extremamente elevado em comparação com o risco da

população em geral para o desenvolvimento de certos tipos de neoplasias (Figura 3) (ALVARENGA et al., 2003; DANTAS et al., 2009).

Geralmente famílias que possuem membros afetados por síndromes de cânceres hereditários possuem diversos indivíduos que desenvolveram o mesmo ou diferentes tipos de neoplasias associadas a uma síndrome, várias gerações apresentando indivíduos que desenvolveram neoplasias associadas, indivíduos que foram diagnosticados com a doença em uma idade muito inferior a aquela em que normalmente os casos são registrados na população em geral além de casos de indivíduos que desenvolveram duas ou mais neoplasias malignas ao longo da vida (Figura 3) (ALVARENGA et al., 2003; DANTAS et al., 2009).

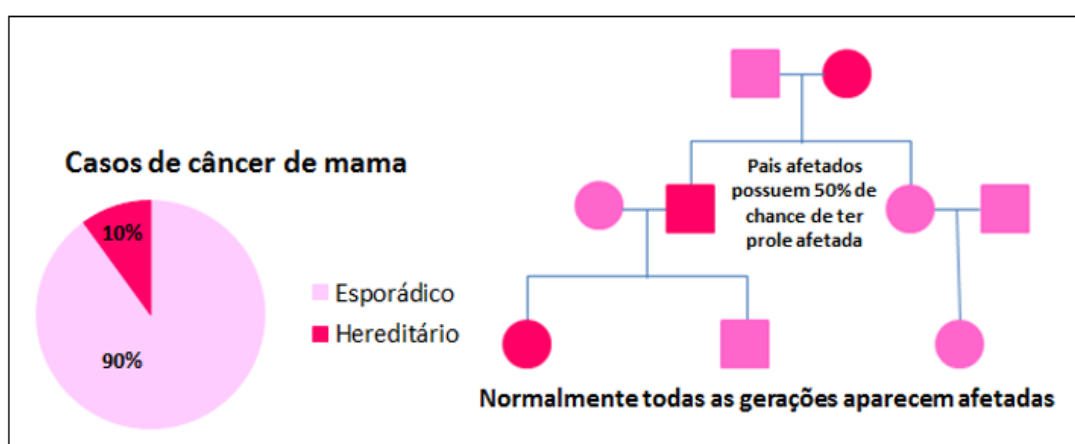


Figura 3 Perfil de distribuição do câncer de mama esporádico e hereditário e do heredograma de pacientes com mutação autossômica dominante (Fonte: próprio autor).

Atualmente várias síndromes foram descritas podendo levar os indivíduos afetados a um maior risco de desenvolver câncer de mama ao longo da vida, sendo as que merecem maior destaque a síndrome de Li-Fraumeni, a síndrome de Cowden, a síndrome de Peutz-jegher e a síndrome de Muir-Torre, além da síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditário, responsável por 50% dos casos de câncer de mama hereditário e que devido a sua grande importância neste contexto será descrita com maiores detalhes em um tópico individual (RUISANCHEZ et al., 2000; DEVITA et al., 2001; ALVARENGA et al., 2003; DANTAS et al., 2009).

A síndrome de Cowden é ocasionada devido a variações gênicas no gene *PTEN* (gene fosfatase e homólogo de angiotensina), localizado em 10q22-23, este é um gene supressor tumoral, sendo assim, quando o mesmo sofre alguma mutação que leva a perda de função, perde sua capacidade protetora, o que ocasiona um acúmulo de mutações de modo rápido que podem vir a ocasionar o aparecimento de tumores. É estimado que uma a cada 200000 pessoas sejam portadoras da síndrome. Os indivíduos

afetados apresentam características fenotípicas variadas e que podem ser encontradas em indivíduos não afetados. Descoberta em 1960, em uma paciente de 20 anos que apresentava doença ulcerativa grave da mama e nódulos em diversas partes do corpo, a síndrome de Cowden leva os indivíduos afetados a uma predisposição de apresentarem além do câncer de mama, câncer de endométrio, câncer de tireoide, Carcinoma de células renais e Câncer de cólon (LLOYD & DENNIS, 1963; LIAW et al., 1997; MESTER & ENG, 2012; HEANEY et. al., 2016).

A síndrome de Li-Fraumeni ocorre devido a mutações germinativas no gene *TP53* (gene supressor de tumor *TP53*), localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p). Sua prevalência é estimada em 1-9 pessoas afetadas a cada 100000 indivíduos. Assim como *PTEN*, o gene *TP53* é um supressor de tumor e aparece mutado na grande maioria dos tumores esporádicos. No caso dos cânceres esporádicos o indivíduo tem ambos os alelos do gene *TP53* inativados devido a eventos aleatórios, enquanto que indivíduos portadores da síndrome de Li-Fraumeni já nascem com um dos alelos inativos, que devido ao fenômeno da haplo-insuficiência, acarreta em perda de função do gene e a predisposição ao surgimento de neoplasias. A síndrome de Li-Fraumeni leva os indivíduos afetados a apresentarem uma maior incidência de tumores em todas as partes do corpo, com destaque para os cânceres de mama, sarcomas e leucemias (LEVINE et. al., 1991; COTRAN et. al., 2000; SNAW, 1996; EVANS & LOZONO, 1997; MALKIN, 2011; BOUAOUN et. al., 2016).

A síndrome de Peutz-jegher, ou síndrome da polipose hereditária intestinal, é uma doença rara que acomete cerca de um a cada 30000 indivíduos. É ocasionada devido a mutações germinativas no gene *SKT11* (serina / treonina quinase 11), localizado em 19p13.3, que age como supressor tumoral. É caracterizada, principalmente, pela presença de múltiplos pólipos intestinais que começam a aparecer ainda na infância. Indivíduos afetados tem alta chance de desenvolver tumores malignos em idade jovem, principalmente tumores gastrointestinais, com destaque para os carcinomas de cólon, devido aos milhares de pólipos que afetam o órgão e podem evoluir com malignidade. Além dos tumores gastrointestinais a síndrome também é responsável por ocasionar carcinomas de mama, pâncreas, ovários e testículos (HEMMINKI et. al., 1998; GIARDELLO et. al., 2000; SÖKMEN et. al., 2003; LOPES et. al., 2004).

A síndrome de Muir-Torre é uma variante da síndrome de Lynch, e está relacionada com mutações nos genes supressores tumorais *MLH1* (Human MutL Homolog 1) e *MSH2* (Human MutS Homolog 2), sendo autossômica dominante e de penetrância variável, geralmente acomete indivíduos em idade adulta, entre os 30-50

anos. A síndrome tem prevalência desconhecida e é caracterizada pelo aparecimento de tumores sebáceos em conjunto com pólipos adenomatosos do cólon, podendo aparecer, ainda, outros carcinomas internos, como tumores do trato urogenital, carcinoma de mama e leucemias, sendo que normalmente estes tumores possuem baixa malignidade (ANDERSON, 1980; SCHWARTZ & TORRE, 1995; SOMOANO et. al., 2005; GÜERE et. al., 2009).

1.6. Função dos genes *BRCA1* e *BRCA2*

Os genes *BRCA1* (*Breast Cancer 1*) e *BRCA2* (*Breast Cancer 2*) foram descobertos na década de 90 e são, atualmente, reconhecidos como essenciais para a manutenção da estabilidade genômica (figura 4).

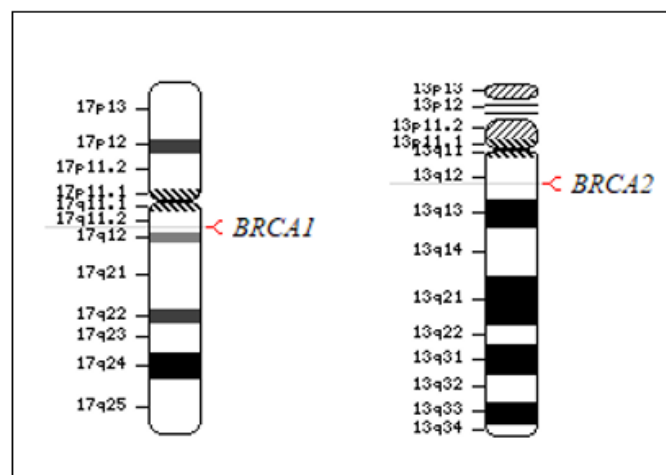


Figura 4 Localização dos genes *BRCA1* no cromossomo 17 e *BRCA2* no cromossomo 13. (Fonte: Adaptado de NCBI, ano).

O gene *BRCA 1* foi descoberto primeiramente, em 1991, em um estudo de ligação no qual foi observado uma alta frequência de mutações no braço longo do cromossomo 17 em mulheres jovens com câncer de mama. O gene é longo, possuindo 24 éxons com 81190 pb (pares de bases), esta localizado em 17q21 (Figura 5) e possui uma extensão completa de 193689 pb. Este gene é responsável pela expressão de uma proteína de mesmo nome com 1863 aminoácidos, que se associa com outras proteínas supressoras tumorais formando um complexo denominado complexo de sobrevivência genômica associado a *BRCA1* (NAROD et al., 1991; NCBI, 2018).

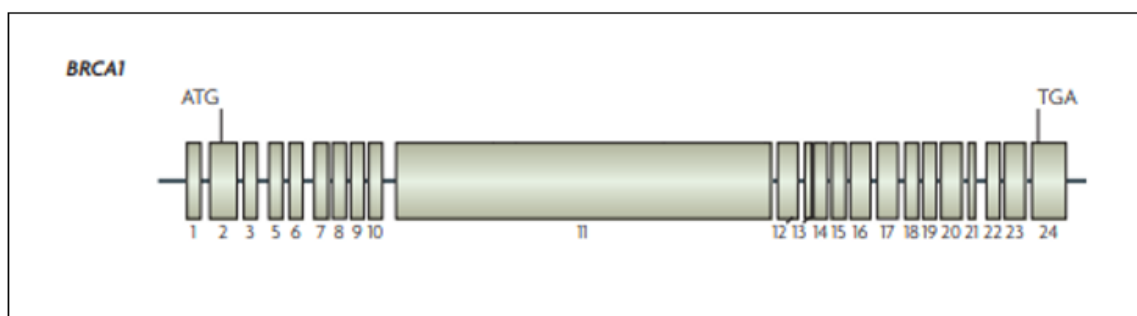


Figura 5 Representação esquemática do gene *BRCA 1* (Fonte: Adaptado de Fackenthal & Olopade, 2007).

Os sítios de interação entre *BRCA1* e demais proteínas, como por exemplo, *ATM* (Ataxia telangiectasia mutated), *MDC1* (Mediator of DNA damage checkpoint protein1) e *RAD51* (*RAD51* recombinase) são altamente conservados e fundamentais para a manutenção do pleno funcionamento do processo de recombinação homóloga, sendo que frequentemente mutações deletérias no gene são identificadas nestas regiões (ROY et al., 2011; HUEN et al., 2010; WANG et al., 2005; STUCKI et al., 2005).

A proteína *BRCA1* é supressora tumoral, atuando principalmente na recombinação homóloga, ou seja, correção de quebras de dupla fita do DNA, processo no qual uma cromátide irmã pode ser utilizada para a formação de uma nova fita idêntica sem perda de material. Quando ocorre o dano ao DNA, *ATM* fosforila γ H2AX (Histona H2AX) que age em conjunto com *MDC1* no recrutamento de *BRCA1* e *RAD51* que, em conjunto, executam o processo de recombinação homóloga (FIGURA 7) (ROY et al., 2011; HUEN et al., 2010; WANG et al., 2005; STUCKI et al., 2005).

O gene *BRCA 2* foi descoberto em 1995, em um estudo que analisava a incidência de câncer de mama em famílias islandesas. O gene possui 27 éxons com 91103 pb e está localizado em 13q12 (Figura 6) e codifica uma proteína de mesmo nome que possui 3418 aminoácidos (WOOSTER et al., 1995; MOYNAHAN et al. 2001; ROY et al. 2011; YOSHIDA e MIKI 2004).

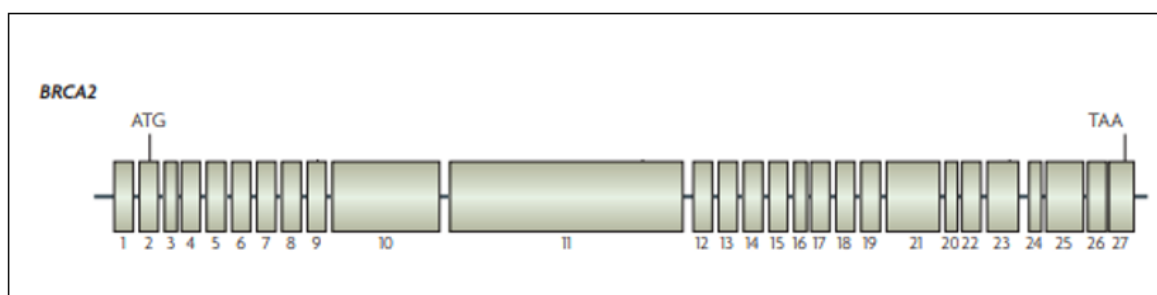


Figura 6 Representação esquemática do gene *BRCA 2* (Fonte: Adaptado de Fackenthal & Olopade, 2007).

A proteína *BRCA2* tem papel fundamental para a manutenção da integridade do DNA uma vez que possui a capacidade de regular *RDA51*. Sabe-se que *BRCA2* age

recrutando RAD51 para a região de dano do DNA e promovendo a formação de filamentos de DNA de cadeia simples que buscam por regiões de homologia, entretanto o mecanismo preciso pelo qual *BRCA2* induz a recombinação homóloga mediada por RAD51 ainda não é bem elucidado (Figura 7) (HABBER, 2003; SAN FILIPPO & KLEIN, 2008; SCHLACHER et al., 2012; KIM et. al., 2012).

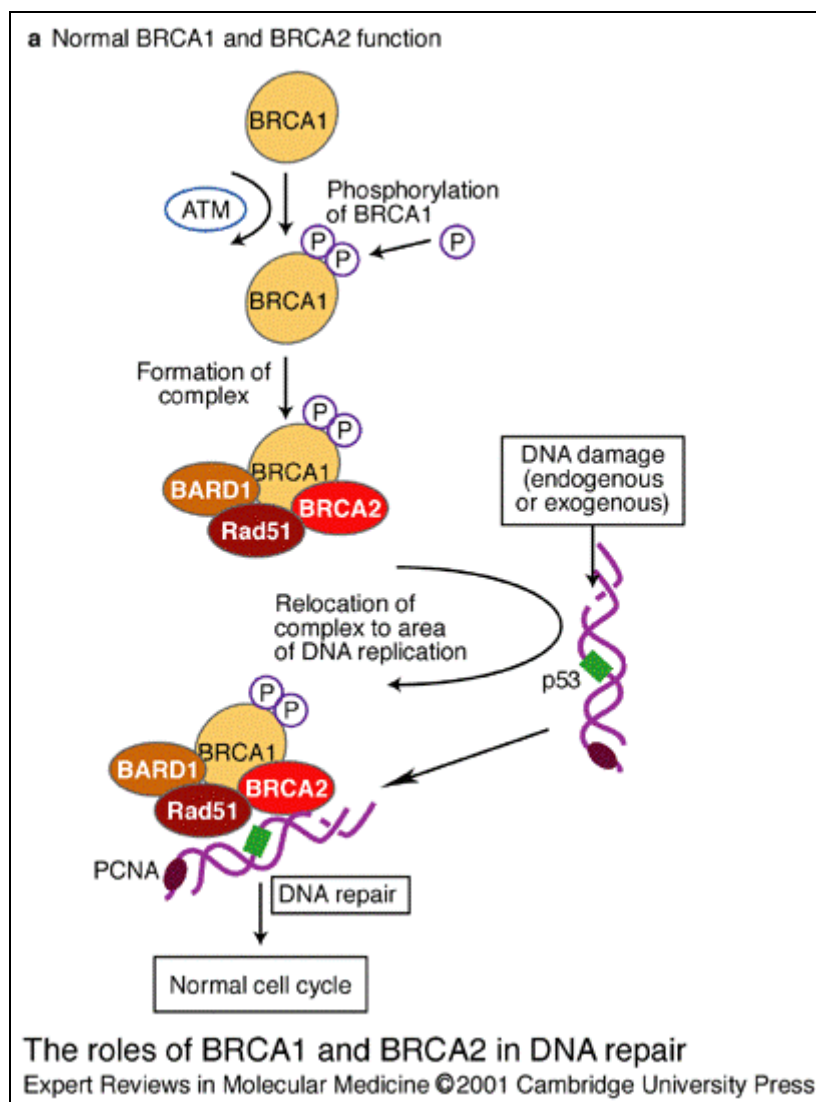


Figura 7 Representação esquemática da ação dos genes *BRCA1* e *BRCA2* no reparo de DNA. Fonte: Expert Reviews in Molecular Medicine (2001).

1.7. Mutações em *BRCA1* e *BRCA2*

A população que demonstra maior risco para o desenvolvimento da síndrome HBOC é a judaica Ashkenazi, originalmente pertencente à Alemanha, e espalhada por todo o mundo durante o decorrer da segunda guerra mundial, representando atualmente cerca de 80% de toda a população judaica, sendo que 20% destes possuem variantes gênicas patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. As principais variantes encontradas nessas populações são as 185delAG e 5266dupC em *BRCA1* e 617delT em *BRCA2*.

(RUBINSTEIN, 2004; ODDOUX et al., 1996; TONIM et al, 1996; STRUEWING et al., 1997).

Diversos estudos mostram uma ampla gama de variantes genéticas existentes nas diferentes populações sendo que geralmente as variantes genéticas aparecem isoladas e exclusivas de determinadas famílias ou indivíduos. Na tabela 1 é possível observar a variação de frequência da presença de variantes gênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* encontrada por diferentes estudos realizados mundialmente.

Existem países onde apresentam variantes com o chamado efeito fundador, que aparecem em grande número para indivíduos de determinadas etnias ou regiões geográficas, tornando de grande importância o rastreio dessas variantes para todas as pacientes com câncer de mama das localidades onde este fenômeno foi observado (NAROD & SALMENA, 2011; OSSA & TORRES, 2016).

Um exemplo é a variante c.156_157insAlu no éxon 3 do gene *BRCA2* que apresenta efeito fundador para a população portuguesa, sendo que a variante é responsável por cerca de 58% dos casos da síndrome HBOC no país (PEIXOTO et al., 2010).

Tabela 1. Variação de frequência da presença de variantes gênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* encontrada por diferentes estudos realizados no mundo.

Autor	País	N	Crítérios de inclusão	Teste utilizado	Mutados (%)	Mutações <i>BRCA1</i>	Mutações <i>BRCA2</i>
PÖLSLER et. al., 2015	Áustria	238	Câncer de mama ou câncer de ovário	Sequenciamento de Sanger e MLPA	30	c.3018_3021delTTCA e c.4183C> T *	-
EL SAGHIR et. al., 2015	Líbano	250	Mulheres com câncer de mama jovens ou com história familiar	Sequenciamento e MLPA	5,6	c.34C>T, c.131G>T, c.485_486delTG, c.2158G>T, c.2410_2411del, c.5030_5033del *	-
RIahi et al., 2015	Tunísia	48	Mulheres jovens com câncer de mama ou ovário	Sequenciamento	25	c.211dupA, c.5266dupC e c.1504_1508delTTAAA	c.1313dupT c.7654dupT
JANAVIČIUS et al., 2014	Lituânia	753	Mulheres com câncer de mama ou ovário não selecionadas ou mulheres com história familiar	Sequenciamento e MLPA	4,2	del 1-3 *	c.658_659del *
FACHAL et al., 2014	Espanha	651	Mulheres com câncer de mama com suspeita hereditária sem mutações pontuais	Sequenciamento, SNP array e MLPA	0,61	Dup 1-2, del 1-13, del 1-24	c.156_157insAlu
DE JUAN et al., 2013	Espanha	1763	Indivíduos com história pessoal ou familiar suspeita para síndrome HBOC	Sequenciamento e MLPA	17,55	c.66_68delAG, c.5123C > A, c.1961delA, c.3770_3771delAG, c.5152+5G > A e c.68_69delAG	c.9026_9030delATCAT, c.3264insT e c.8978_8991del14
ZHANG et al., 2012	Nigéria e EUA	356	Mulheres Negras com câncer de mama	Genotipagem e Sequenciamento	1,77	c.303T>G, c.1623dupG, c.4122_4123delTG, c.5324T>G, c.4240dupC, c.815_824dup10, c.191G>A, c.1504_1508delTTAAA e c.3268C>T	c.1310_1313delAAGA, c.2402_2412del11 e c.8817_8820delGAAA
FRANCIES et al., 2015	África do Sul	108	Mulheres com câncer de mama pré-menopausa ou tumor triplo negativo	Sequenciamento e MLPA	12,9	c.181 T > G, c.212G > A, c.3593 T > A, c.1155G > A, c.1953_1954insA, del 1-2	c.582G > A, c.5771_5774delTTCA, c.5213_5216delCTTA, c.7934delG, c.7934delG, c.8754 + 1G > A, c.9097_9098insA
APESSOS et. al., 2017	Grécia	898	Pacientes com câncer de mama não selecionadas	Sequenciamento de Sanger e MLPA	12,9	Del 19, del 22, del 23, del 1-24, c.181T>G, c.3700_3704delGTAAA, c.5212G>A, c.5251C>T, c.5266dupC, c.5467G>A	Del 14, del 1-27, c.2339C>G
			Famílias com			Del 3-5	-

PALANCA et al, 2008	Espanha	18 famílias	suspeita de câncer de mama hereditário	Análise de haplótipo para mutação Del 3-5	20		
MONTAGNA et al, 2003	Itália	300	Pacientes com câncer de mama ou ovário não selecionados	MLPA	40	-	-
HOGERVORST et al, 2003	Países Baixos	121 famílias	Pacientes com câncer de mama ou ovário não selecionados	MLPA (<i>BRCA1</i>)	36	Del 8, del 20-22, dup 13, dup 21-23, trip 17-19	-
RUDNICKA et al, 2013	Polônia	200	Pacientes com história familiar de câncer de mama ou ovário sem presença de mutações fundadoras	MLPA	3,8	Del 13-19, del 7, del 22	-
THOMASSEN, 2006	Suécia	617	mulheres com história familiar de câncer de mama ou ovário sem mutações pontuais	MLPA	3,8	Del 13-15, del 3-16,	-
LAHTI-DOMENICI, 2001	Finlândia	149	Pacientes com alto risco para câncer de mama ou ovário	PCR, Teste de Proteína Truncada	0	-	-
MOISAN, 2006	Canadá	154	Pacientes com alto risco para câncer de mama ou ovário	MLPA	0	-	-

Em estudo recente de Ossa & Torres (2016) na América Latina foram verificadas mutações com aparente efeito fundador no México, Colômbia e Brasil. No México a principal mutação encontrada é a deleção dos éxons 9-12 do gene *BRCA1*, na Colômbia as principais mutações encontradas foram c.3450del4, c.A1708E no gene *BRCA1* e c.3034del4 no gene *BRCA2*. No Brasil foi observado provável efeito fundador das mutações c.5382insC no gene *BRCA1* e c.156_157insAlu no éxon 3 do gene *BRCA2*

Nos estudos de perfil mutacional realizados na América do Sul é possível observar uma discrepância entre a principal mutação encontrada no Brasil e as mutações encontradas na América Latina, haja visto que a mutação predominante Brasileira é a mutação c.5266dupC localizada no éxon 20 do gene *BRCA1*, que representa aproximadamente 57% de todas as mutações em *BRCA1/2* de pacientes brasileiros, nunca foi descrita para outras populações latino-americanas estudadas. A mesma mutação foi encontrada em estudos de populações russas, holandesas, francesas entre outras e nunca foi descrita em populações portuguesas (HAMEL et al., 2011; PALMERO et al., 2009; GOMES et al., 2006; VILLARREAL-GARZA et al., 2015; HERNÁNDEZ et al., 2014; RODRÍGUEZ et al., 2012; MACHADO et al., 2007).

Na tabela 2 é possível observar a variação de frequência da presença de variantes gênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* encontrada por diferentes estudos brasileiros.

O perfil das mutações em *BRCA1* e *BRCA2* varia tanto de um país para o outro quanto de uma região para outra do mesmo país e até mesmo em diferentes etnias, ou seja, mesmo que a população brasileira seja formada por uma miscigenação entre europeus, africanos e indígenas, a proporção de componentes genéticos de cada região pode diferir, levando a importância do estudo do perfil dessas mutações em todo o país. Atualmente são poucos os dados existentes para o nosso país, já tendo sido realizadas poucas análises, apenas para as regiões sul, sudeste e nordeste, e essa dificuldade se deve em grande parte pela dificuldade do acesso dos pacientes aos testes genéticos, que não são oferecidos pelo sistema único de saúde (SUS) e que só em 2013 passou a ser oferecido por planos de saúde que abrangem apenas uma pequena parcela da população (OSSA & TORRES, 2016; ALEMAR et. al., 2016).

Tabela 2 Variação de frequência da presença de variantes gênicas nos genes BRCA1 e BRCA2 encontrada por diferentes estudos realizados no Brasil.

Autor	População	N	Critérios de inclusão	Teste utilizado	Mutados (%)	Mutações <i>BRCA1</i>	Mutações <i>BRCA2</i>
EWALD, 2008	Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul	90	Mulheres com câncer de mama ou ovário de suspeita hereditária	MLPA (<i>BRCA1</i>)	7,8	Dup 2, dup 10, dup 22, del 19, del 9-19, del 11	-
MAISTRO, 2016	Norte, Sul, Sudeste e Nordeste	100	Mulheres com câncer de ovário com história familiar de câncer de mama ou ovário	Sequenciamento e MLPA	19	Del 1-2, del 5-7, c.3331_3334delCAAG, c.5266dupC, c.961_962delTG, c.4484G > T	c.1963_1963delC, c.5576_5579delTTAA
EWALD et al, 2016	Sul, Sudeste e Nordeste	145	Mulheres com câncer de mama de suspeita hereditária	MLPA e Nested PCR	3,4	Del 9-17, del 16-17	c.156_157insAlu
FERNANDES, 2015	São Paulo	287	Mulheres com câncer de mama com história pessoal ou familiar de suspeita hereditária	PCR multiplex e MLPA	-	Dup 24, del 16-17	-
OLIVEIRA et al, 2015	Minas Gerais	18	Mulheres com câncer de mama ou ovário de suspeita hereditária	MLPA (<i>BRCA1</i>) Sequenciamento éxon 11 (<i>BRCA1</i>) Análise de Fusão de alta resolução.	77.77%	c.3119G> A, c.5263_5264insC (Patogênicas)	-
ANTONIO et al, 2016	Rio Grande do Sul	94	Mulheres que preenchem os critérios para a síndrome HBOC	PCR	0	-	-

1.8. Síndrome da predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC)

A síndrome da predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário é a principal síndrome hereditária relacionada ao câncer de mama. A síndrome é ocasionada devido a mutações nos genes supressores tumorais *BRCA1* e *BRCA2*, sendo que cerca de 50% dos casos de câncer de mama hereditário são atribuídos a mutações nestes genes bem como 15% de todos os cânceres de ovário independente de história familiar da doença. Em comparação com mulheres não afetadas, aquelas que nasceram com mutações germinativas nos genes *BRCA1/2* tem uma chance aumentada em até 60% de desenvolverem câncer de mama ao longo da vida (CHEN et al, 2006; 2007; MARTIN et al, 2001; LINDOR et al., 2008).

As variações gênicas em *BRCA1* e *BRCA2* que levam a síndrome HBOC tem caráter autossômico dominante, ou seja, existe 50% de chances da condição ser passada para a prole, bastando um alelo mutado para os indivíduos terem a predisposição para o surgimento dos tumores relacionados à síndrome, como por exemplo, câncer de próstata, pâncreas, vesícula biliar, gástrico, cabeça e pescoço e melanoma além dos cânceres de mama e ovário. Além disso, *BRCA1* e *BRCA2* são genes de alta penetrância, aumentando as chances dos indivíduos afetados desenvolverem um câncer ao longo da vida (ALLAIN et al, 2008; GOLDBERG & BORGEN, 2006).

É de extrema importância que seja realizada a identificação de mulheres portadoras de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* para a realização do aconselhamento genético adequado a fim de informados sobre o risco de possuírem uma mutação e estratégias de profilaxia e vigilância para toda a família (HERNÁNDEZ et al, 2014; WEITZEL et al, 2013; WOOD et al, 2014).

Apesar da síndrome HBOC ter sido descoberta no final da década de oitenta e já se saber a importância do aconselhamento genético para esses pacientes a grande maioria da população mundial não procura o serviço devido a fatores socioeconômicos e até mesmo à falta de conhecimento sobre a existência do mesmo (LEVY et al, 2011; CRAGUN et al, 2015; BURSTEIN et al, 2013).

No ano de 2013 quando a atriz Angelina Jolie tornou público que era portadora de uma mutação no gene *BRCA1*, que sua mãe teve câncer de ovário, sua tia materna faleceu devido a um carcinoma de mama e que devido a esses fatores optou pela realização da mastectomia bilateral profilática, a atenção dada ao caso pela mídia trouxe uma maior atenção não só de profissionais da saúde, mas também da população no geral para a síndrome HBOC e os serviços de oncogenética (LEVY et al, 2011; CRAGUN et al, 2015; BURSTEIN et al, 2013).

Existem alguns critérios que definem quando deve existir a suspeita de que um paciente possui a síndrome do câncer de mama e ovário hereditário. Segundo o NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) os critérios para investigar se um paciente possui a Síndrome HBOC são:

- a. Diagnóstico de câncer de mama em idade ≤ 45 anos.
- b. Diagnóstico de câncer de mama em idade ≤ 50 anos e mais um dos seguintes critérios:
 - I. Um segundo tumor primário da mama.
 - II. Um familiar de com câncer de mama, ovário, próstata ou pâncreas.
 - III. Paciente com história familiar limitada.
- c. Diagnóstico de câncer de mama em idade ≤ 60 anos se câncer de mama triplo negativo.
- d. Diagnóstico de câncer de mama em qualquer idade e mais um dos seguintes:
 - I. ≥ 1 familiar com câncer de mama feminino em idade ≤ 50 anos
 - II. ≥ 1 familiar com câncer de mama masculino em qualquer idade
 - III. ≥ 1 familiar com câncer de ovário em qualquer idade
 - IV. ≥ 2 familiares do mesmo lado da família com câncer de mama em qualquer idade
 - V. ≥ 2 familiares do mesmo lado da família com câncer de pâncreas ou próstata
- e. Mulheres com diagnóstico atual ou prévio de câncer de ovário em qualquer idade e independente da história familiar.
- f. Pacientes com câncer de pâncreas e ≥ 2 familiares do mesmo lado da família com câncer de mama e/ou ovário e/ou pâncreas ou próstata.
- g. Pacientes com câncer de próstata e ≥ 2 familiares do mesmo lado da família com câncer de mama e/ou ovário e/ou pâncreas ou próstata.
- h. Pacientes de origem judaica Ashkenazi.
- i. Pacientes maiores de 18 anos, diagnosticados ou não com câncer, independente do sexo, quando houver mutação deletéria em *BRCA1* ou *BRCA2* conhecida em familiar de 1º, 2º e 3º graus.

Quando as pacientes atendem um ou mais critérios de risco é necessário que as mesmas sejam acompanhadas por um oncogeneticista e a realização de exames moleculares para confirmação do diagnóstico.

O padrão ouro para diagnóstico da síndrome HBOC é a realização do painel genético por NGS (sequenciamento de nova geração) que consiga realizar a análise de

todos os éxons dos genes *BRCA1* e *BRCA2* e em caso de resultados negativos deve ser realizado o MPLA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) (ANS, 2015; HERMAN et al., 2012).

Os exames não devem ser considerados negativos quando pedidos de forma separada, pois um complementa o outro. O sequenciamento consegue fazer a análise de pequenas deleções ou inserções, bem como verificar a ocorrência de SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único) na sequência de DNA enquanto a técnica de MLPA consegue detectar grandes duplicações e deleções, que são ignoradas no sequenciamento.

Segundo o documento “ANEXO II: DIRETRIZES DE UTILIZAÇÃO PARA COBERTURA DE PROCEDIMENTOS NA SAÚDE SUPLEMENTAR” da ANS (Agência Nacional de Saúde Suplementar) quando devido a algum fator não existir a possibilidade de ser realizado um painel genético por NGS deve ser oferecido ao paciente o sequenciamento de Sanger, sendo que, exceto em casos de histórico de câncer de mama masculino e câncer de pâncreas, que são mais relacionados com o gene *BRCA2*, o primeiro gene sequenciado deve ser o *BRCA1* e em caso de resultado negativo, partir para a análise de *BRCA2* e vice-versa (ANS, 2015).

1.9. Estratégias de prevenção e tratamentos para indivíduos com a síndrome HBOC

Atualmente com o reconhecimento da importância da síndrome HBOC, houve o surgimento de uma gama de possibilidades para portadoras que não desenvolveram a doença, como a quimioterapia profilática, mastectomia e ooforectomia profiláticas. (HODGSON et al, 2000; VENCKEN et al, 2011; LIU et al, 2014).

Foi ainda recentemente aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) o primeiro medicamento direcionado para o tratamento do câncer de mama metastático em pacientes com variantes patogênicas nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*. O fármaco em questão é o olaparib, pertencente a uma nova classe de fármacos, os inibidores da PARP (polimerase de poli ADP-ribose) (FDA, 2018).

O olaparib age como competidor dos domínios de ligação da enzima PARP, levando a uma inibição reversível da mesma. A inibição da PARP compromete o funcionamento da via de reparo de danos ao DNA conhecida como BER (*Base excision repair*). Em células saudáveis quando a via BER se encontra comprometida, a célula realiza correção de danos ao DNA por meio da recombinação homóloga mediada por *BRCA1* ou *BRCA2*, o que não acontece em pacientes que possuem variantes patogênicas nestes genes, levando às células a morte com o silenciamento de ambas as

vias (FDA, 2018; BRYANT et al., 2005; FARMER, et al., 2005; DE LORENZO et al., 2013; DIZDAR, et al., 2015).

1.10. Mutações em *BRCA 1* e *BRCA 2* e aspectos toxicológicos do tratamento de pacientes com carcinoma ductal invasivo.

Quando funcionais, *BRCA1* e *BRCA2* agem como genes supressores tumorais, sendo responsáveis pelo processo de recombinação homóloga, ou seja, correção de quebras de fita do DNA, sem ocasionar perda de material. Quando existem mutações deletérias nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* as respectivas proteínas deixam de ser funcionais, fator este que apesar de aumentar as chances de um câncer, também aumenta a sensibilidade à quimioterapia antineoplásica realizada por fármacos que atuam ocasionando danos ao DNA, como as antraciclina, os taxois e as mostardas nitrogenadas (POWELL et al., 2003; KENNEDY et al., 2004; WANG et al., 2000).

De acordo com o Guia para Notificações de Eventos Adversos em Oncologia da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), é considerada uma reação adversa “qualquer resposta a um fármaco que seja prejudicial, não intencional, e que ocorra nas doses normalmente utilizadas em seres humanos para profilaxia, diagnóstico e tratamento de doenças, ou para a modificação de uma função fisiológica” (ANVISA, 2011).

Byrski et al, 2012 sugeriram que mulheres com mutações em *BRCA1* ou *BRCA2* podem apresentar uma maior toxicidade em relação a quimioterapia, vindo a demonstrar mais efeitos colaterais que aquelas mulheres que não carregam mutações nos presentes genes. Estudos realizados por Huszno et al, 2013 foi observado não só que mulheres com mutações em *BRCA1* e *BRCA2* não apresentavam um aumento significativo de toxicidade relacionada ao tratamento, como também que mulheres que não carregavam mutações sofriam significativamente mais com vômitos e náuseas.

Atualmente com o avanço da medicina personalizada, a conduta médica vem se tornando cada vez mais específica e exclusiva para cada paciente melhorando seu prognóstico e qualidade de vida e os exames de biologia molecular são de grande importância nesta área. No Brasil os serviços de oncogenética ainda são escassos e no estado de Goiás existe apenas um ambulatório público de oncogenética que atende pacientes de toda a região centro-oeste.

Quando se trata da síndrome HBOC, os exames genéticos para o diagnóstico são recomendados pelo NCCN para serem realizados pelo paciente. Devido ao alto custo dos exames os mesmos não são oferecidos pela rede pública de saúde.

Diante da não existência de dados na literatura para o perfil de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* para populações do centro-oeste do país, este trabalho foi desenvolvido para a busca do perfil das mutações encontradas na nossa população e verificar a existência de correlação entre a mutação e a resposta ao tratamento quimioterápico assim como no auxílio na conduta médica.

2.1. Objetivo Geral

Investigar o perfil de variantes genéticas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes diagnosticados com câncer de mama que atendam aos critérios da NCCN para suspeita da síndrome do câncer de mama e ovário hereditário no estado de Goiás, na região Centro-Oeste do Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

- Investigar a prevalência de grandes deleções e duplicações no gene *BRCA1*;
- Investigar a prevalência de grandes deleções e duplicações no gene *BRCA2*;
- Investigar a relação entre o alto risco para mutação nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* e a sua relação com a toxicidade da quimioterapia;

3.1. Casuística

O trabalho foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o número do CAAE 50626315.6.0000.5078. (ANEXO 1).

Foram incluídos na pesquisa 46 pacientes atendidos no ambulatório de mastologia do Hospital das Clínicas/UFG, sendo estes pacientes adultos com o diagnóstico clínico confirmado de câncer de mama que concordaram em participar da pesquisa assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2).

Os casos foram obtidos junto ao Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás HC/UFG atendidos pela equipe do Programa de Mastologia.

Foi coletada a história familiar de câncer de cada paciente e a mesma foi submetida ao teste de avaliação de risco BRCAPRO (PARMIGIANI, 1998; BERRY, 2002). A obtenção das amostras biológicas dos participantes da pesquisa foi realizada posteriormente à entrevista e assinatura do TCLE. As pacientes responderam a um questionário (ANEXO 3) e tiveram seus prontuários analisados para aquisição de informações a respeito da resposta toxicológica ao tratamento quimioterápico.

- Critérios de inclusão: Foram incluídos na pesquisa pacientes com o diagnóstico clínico de carcinoma de mama, maiores de 18 anos de ambos os sexos e que atenderam os critérios da NCCN para suspeita da Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditário.
- Critérios de exclusão: Foram excluídos todos pacientes que não se enquadram dentro dos diagnósticos e critérios de inclusão.

3.2. Obtenção, Manipulação e Armazenamento das Amostras

No momento da consulta dos pacientes no Hospital das Clínicas da UFG foram realizadas coletas únicas de 4 mL de sangue venoso periférico, em tubos a vácuo BD Vacutainer System® contendo anticoagulante EDTA. Após a coleta, todas as amostras foram transferidas para caixas térmicas e encaminhadas ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética para realização da extração de DNA e diagnóstico molecular.

3.3. Extração de DNA

Para extração de DNA foi utilizado o Kit de extração Pure Link (Invitrogen) e uma alíquota de 200 µL de sangue total de cada paciente foi submetida à extração de acordo com o protocolo sugerido pelo próprio fabricante. Ao final do processo de extração, as amostras de DNA dos pacientes foram acondicionadas em microtubos (eppendorf) de 1,5 mL, identificados e armazenados em freezer a -80°C, onde permaneceram até o momento em que foram submetidos aos testes posteriores.

A integridade das amostras foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2,0% em tampão TBE (Tris/ borato/ EDTA) em cuba de eletroforese (Thermo Scientific), aplicando-se 5µL de DNA e 1µL de tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25% e glicerol a 30%). A separação eletroforética foi realizada a 100 V, por 40 minutos, utilizando fonte (Electrophoresis Power Supply EPS. 601, Amersham Pharmacia Biotech).

A visualização das bandas formadas foi realizada sob luz UV (ultra-violeta) após coloração do gel com brometo de etídio ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$), utilizando um marcador molecular de DNA de 100pb. A quantificação do DNA foi realizada no fluorímetro Nanodrop (ThermoFisher) de acordo com as recomendações do próprio fabricante.

3.4. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification – MLPA

Para análise de rearranjos gênicos foi utilizada a técnica de MLPA. Esta técnica permite a utilização de aproximadamente 50 sondas específicas para determinadas regiões do DNA, em simultâneo (SCHOUTEN, et al., 2002). Cada sonda é formada por dois oligonucleotídeos o que confere uma elevada especificidade à técnica. Na reação de MLPA, não é a sequência de DNA alvo que é amplificada, mas sim as sondas de MLPA que com ela hibridizam (SCHOUTEN et al., 2002). Por eletroforese capilar é obtido um eletroferograma referente ao número de sequências amplificadas para as diferentes sondas utilizadas que quando comparado com o padrão de picos obtido para uma amostra controle, permite identificar alterações do número de cópias do DNA genômico (SCHOUTEN et al., 2002; HOMIG-HOLZEL & SAVOLA, 2012).

Os kits utilizados neste estudo foram o SALSA MLPA P002 *BRCA1* que possui 38 sondas para o gene *BRCA1* com produtos de amplificação entre 130 e 496 pb (anexo 5), e o SALSA MLPA P045 *BRCA2/CHEK2* que possui 40 sondas para todo o gene *BRCA2* com produtos de amplificação entre 130 e 500 pb (anexo 6) (Mrc-Holland, Amsterdã, Holanda). Apesar do kit SALSA MLPA P045 *BRCA2/CHEK2* apresentar uma sonda para o gene *CHEK2*, a empresa fornecedora do kit emite uma declaração de que existem vários relatos da mutação c.1100delC aparecendo presente em praticamente todas as amostras. As mutações neste gene são extremamente raras, respondendo por apenas

0,9% de todos os casos de câncer de mama hereditário. No nosso estudo aconteceu este incidente, e segundo o fabricante a causa deste fenômeno não é ainda conhecida (Mrc-Holland, 2016). Desta forma, os resultados para o gene *CHECK2* foram desconsiderados.

Foram utilizadas amostras de DNA em uma concentração de 100 ng. Para esta metodologia foram seguidas as recomendações do próprio fabricante.

Os produtos da PCR (reação em cadeia da polimerase) foram analisados utilizando o equipamento ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), com filtros de fluorescência específicos, seguindo o protocolo descrito para a MRC-Holland. A análise dos resultados foi realizada no *software Coffalyser.Net*.

3.7. Avaliação da relação entre o alto risco de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e sua relação com a toxicidade da quimioterapia.

Os efeitos colaterais relatados pelas participantes da pesquisa e observados nos prontuários foram contabilizados e apresentados por meio da porcentagem de ocorrência. As mesmas foram divididas em grupo com os genes *BRCA1/2* provavelmente mutados e grupo com os genes *BRCA1/2* provavelmente não mutados, de acordo com análises realizadas pelos modelos de predição PENN II, Myriade e Índice de Manchester. Foi utilizado o Software GraphPad Prisma para cálculo do teste exato de Fisher, com intervalo de confiança de 95% (IC). Todos os valores de p foram calculados usando o nível de significância de $p < 0.05$.

4.1. Perfil dos pacientes participantes da pesquisa

Durante o período entre novembro de 2016 e novembro de 2017 a média de idade dos pacientes participantes da pesquisa foi de 37,52 anos. O paciente mais jovem possuía 24 anos no momento do diagnóstico e o paciente mais velho 65 anos.

O total de vinte pacientes (43,47%) possuíam idade inferior a 35 anos no momento do diagnóstico, sendo que seis (35%) destes foram diagnosticados com tumores triplo negativos. Um total de 42 pacientes (91,3%) foi diagnosticado com câncer de mama em idade inferior a 40 anos. Dentre o total de pacientes, apenas um (2,17%) era do sexo masculino (Tabela 3).

Todos os pacientes da pesquisa possuíam o diagnóstico clínico de carcinoma ductal invasivo, sendo que apenas um (2,17%) apresentou um segundo tumor do tipo medular. Quanto à classificação molecular dos tumores, o mais frequentemente observado na população foi o luminal A, presente em 46,2% dos pacientes, seguido do triplo negativo, que foi observado em 28,20% dos pacientes. Os tumores com super expressão de HER2 e luminal B foram observados com a mesma frequência, em 12,8% dos pacientes (Tabela 3).

Foram observados quatro perfis de história familiar, sendo que 45,65% dos pacientes apresentaram história familiar tanto de câncer de mama quanto de outros tipos de câncer, 33% apresentam história familiar de câncer com ausência de casos de câncer de mama, 17,39% possuíam apenas a história pessoal de câncer na família e 4,34% apresentaram história familiar apenas de câncer de mama (Tabela 3) (Figura 8).

Tabela 3 Perfil dos pacientes participantes da pesquisa.

Sexo	Masculino		Feminino	
	2,17%		97,83%	
Idade	< 35 anos	< 40 anos	Média de idades	
	43,47%	91,3%	37,52 anos	
Subtipo molecular	Luminal A	Luminal B	HER 2 +	Triplo Negativo
	46,2%	12,8%	12,8%	28,20%
História familiar	Ca. Mama e outros	Ca. Sem mama	Apenas Ca. mama	Sem história
	45,65%	33%	4,34%	17,39%

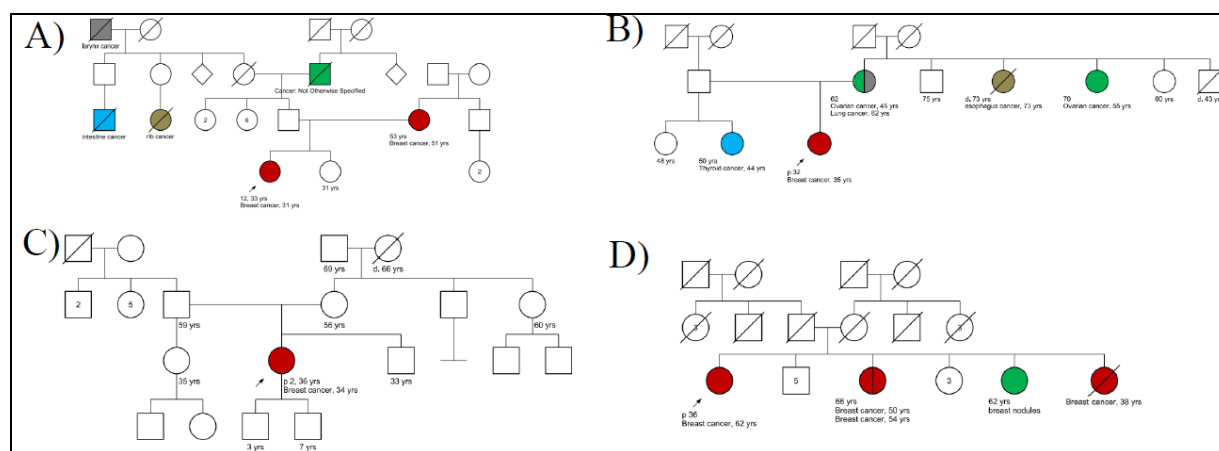


Figura 8. História familiar das pacientes: Pela análise dos heredogramas foram observados quatro perfis de história familiar. **A)** História familiar tanto de câncer de mama quanto de outros tipos de câncer (vermelho: câncer de mama, marrom: câncer no fígado, azul: câncer no intestino, verde: tumor maligno de origem desconhecida, cinza: câncer de laringe). **B)** História familiar de câncer sem a presença de casos de câncer de mama na família (vermelho: câncer de mama, azul: câncer de tireóide, verde: câncer de ovário, marrom: câncer de esôfago, cinza: câncer de pulmão). **C)** Apenas a história pessoal de câncer (vermelho: câncer de mama). **D)** História familiar apenas de casos de câncer de mama (vermelho: câncer de mama, verde: nódulo benigno na mama).

De acordo com a História familiar de câncer dos pacientes, foram observados, com maior frequência, casos de câncer de mama, câncer de próstata, câncer de intestino, câncer de estômago e câncer de pulmão. A história familiar de câncer de mama foi observada em 23 famílias (50%), o câncer de próstata apareceu em 11 famílias (23,91%), o câncer de intestino em oito famílias (17,43%) e os cânceres de estômago e pulmão

apareceram, ambos, em sete famílias (15,21%). Na tabela 4 é possível observar todos os tipos de câncer observados na história familiar das pacientes e sua prevalência.

Tabela 4 Diferentes tipos de tumores malignos observados na história familiar dos pacientes participantes da pesquisa e sua prevalência.

Tipo de câncer	Famílias (N)	%	Tipo de câncer	Famílias (N)	%
Ovário	5	10.86	Pancreas	1	2.17
Próstata	11	23.91	Melanoma	2	4.39
Intestino	8	17.43	Estômago	7	15.21
Tireóide	6	13.04	Esôfago	3	6.52
Pulmão	7	15.21	Pele	3	6.52
Basal	2	4.39	Útero	4	8.69
Garganta	4	8.69	Cérebro	1	2.17
Fígado	6	13.04	Retinoblastoma	1	2.17
Leucemia	5	10.86	Cabeça e pescoço	1	2.17
Sarcoma	2	4.39	Mama	23	50
Limfoma	3	6.52	Origem desconhecida	4	8.69

4.2. Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA).

Foi realizada a análise de MLPA para pesquisa de grandes deleções ou duplicações gênicas em todos os éxons dos genes *BRCA1* e *BRCA2* sendo que não foram observadas alterações em nenhum dos pacientes participantes da pesquisa.

Para o gene *BRCA1* todos os pacientes apresentaram um perfil semelhante na análise dos resultados de MLPA pelo software *Coffalyzer.net* (Figuras 9 e 10).

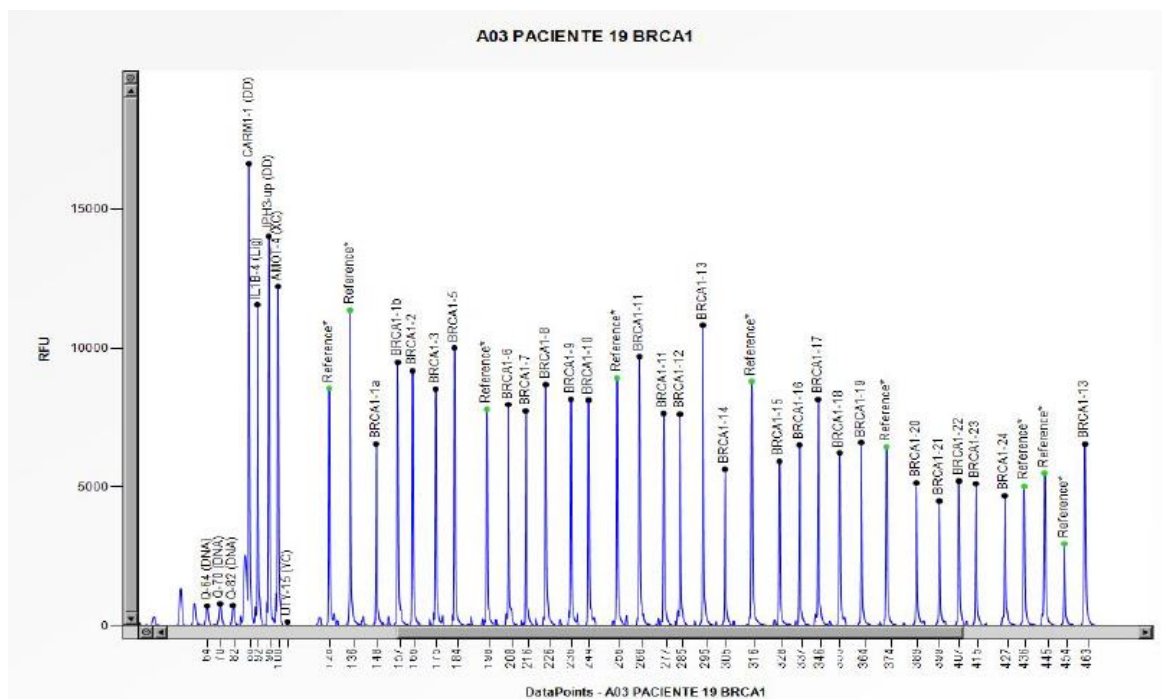


Figura 9 Eleetroferograma gerado pela análise de MLPA no software CoffaLyzer.net demonstrando padrão de picos para pacientes sem alterações no gene *BRCA1*.

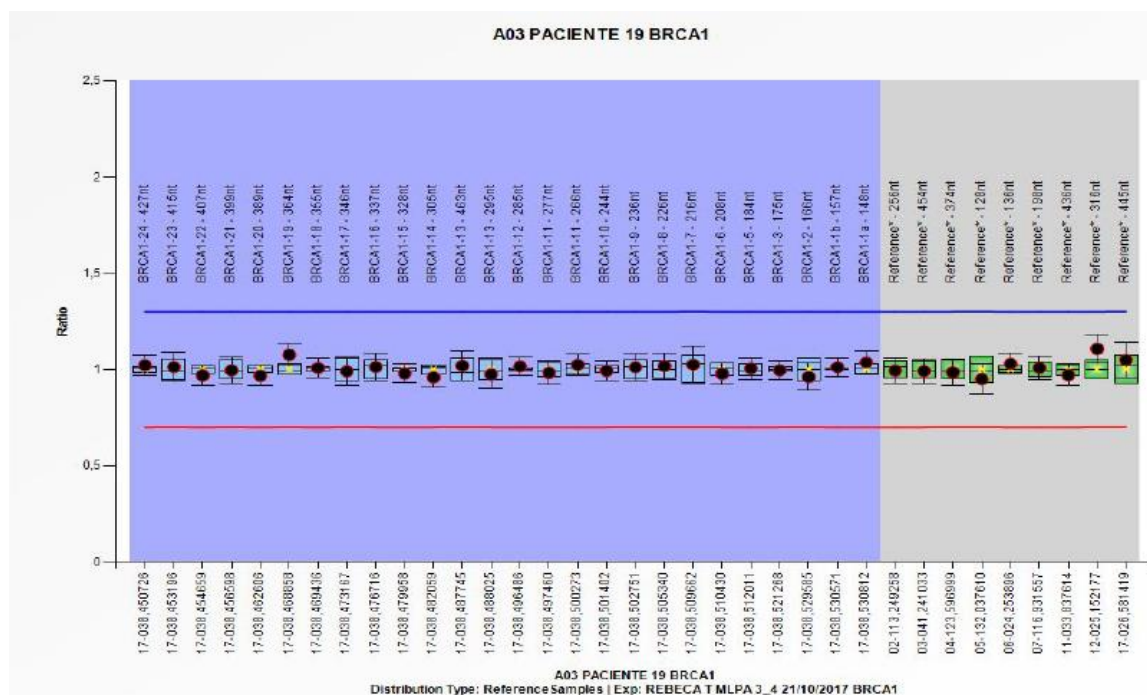


Figura 10 Gráfico de caixas, gerado pelo software CoffaLyzer.net demonstrando resultado padrão para pacientes sem alterações no gene *BRCA1*.

Para o gene *BRCA2* a análise de uma paciente apresentou resultado falso positivo para deleção parcial do éxon 27 do gene, resultado ocasionado possivelmente pela presença de uma mutação pontual na região de ligação da sonda de MLPA. A amostra foi submetida à análise por outro lote do kit de MLPA para análises do gene *BRCA2*, para validação do resultado, onde foi possível confirmar que o resultado observado se tratava

de um falso positivo (Figuras 11, 12, 13 e 14). Para os demais pacientes não foram observadas alterações no gene *BRCA2* (Figuras 15 e 16).

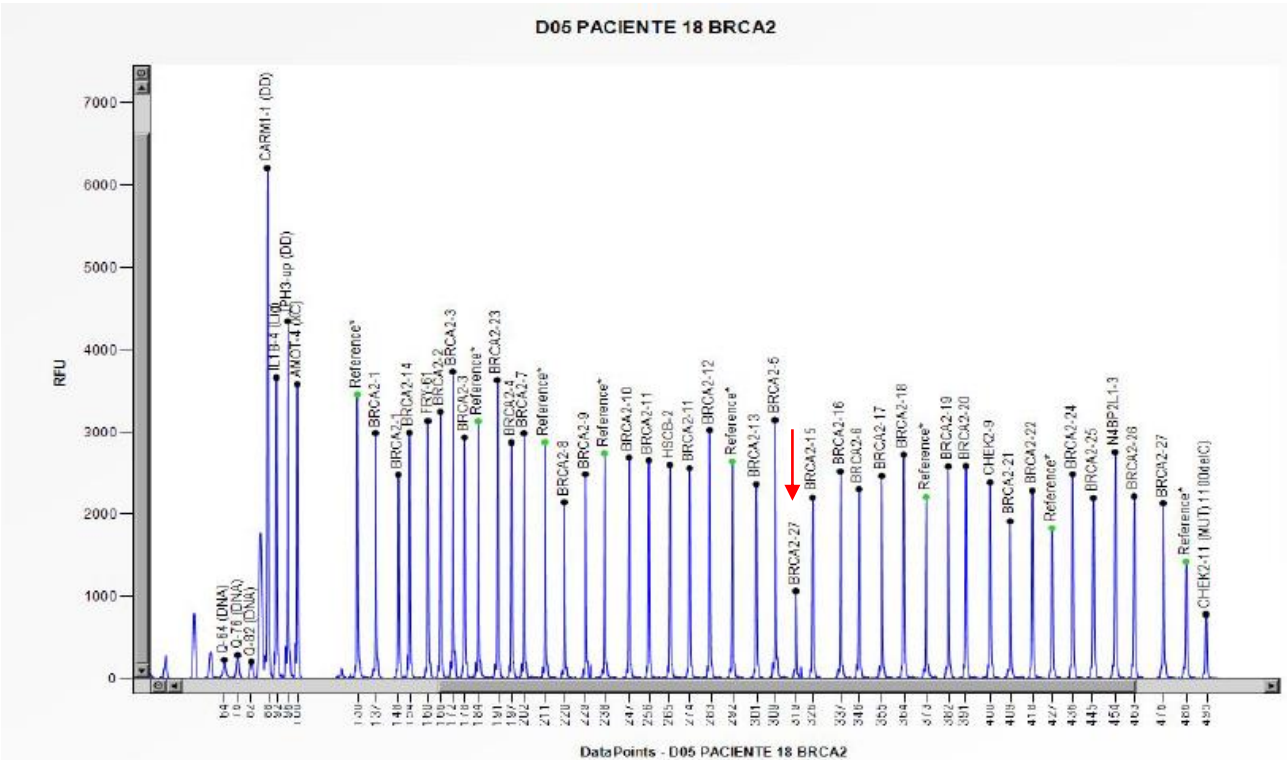


Figura 11 Eletoferograma gerado pela análise de MLPA no software CoffaLyzer.net evidenciando amplificação reduzida para uma região do éxon 27 do gene *BRCA2* (seta).

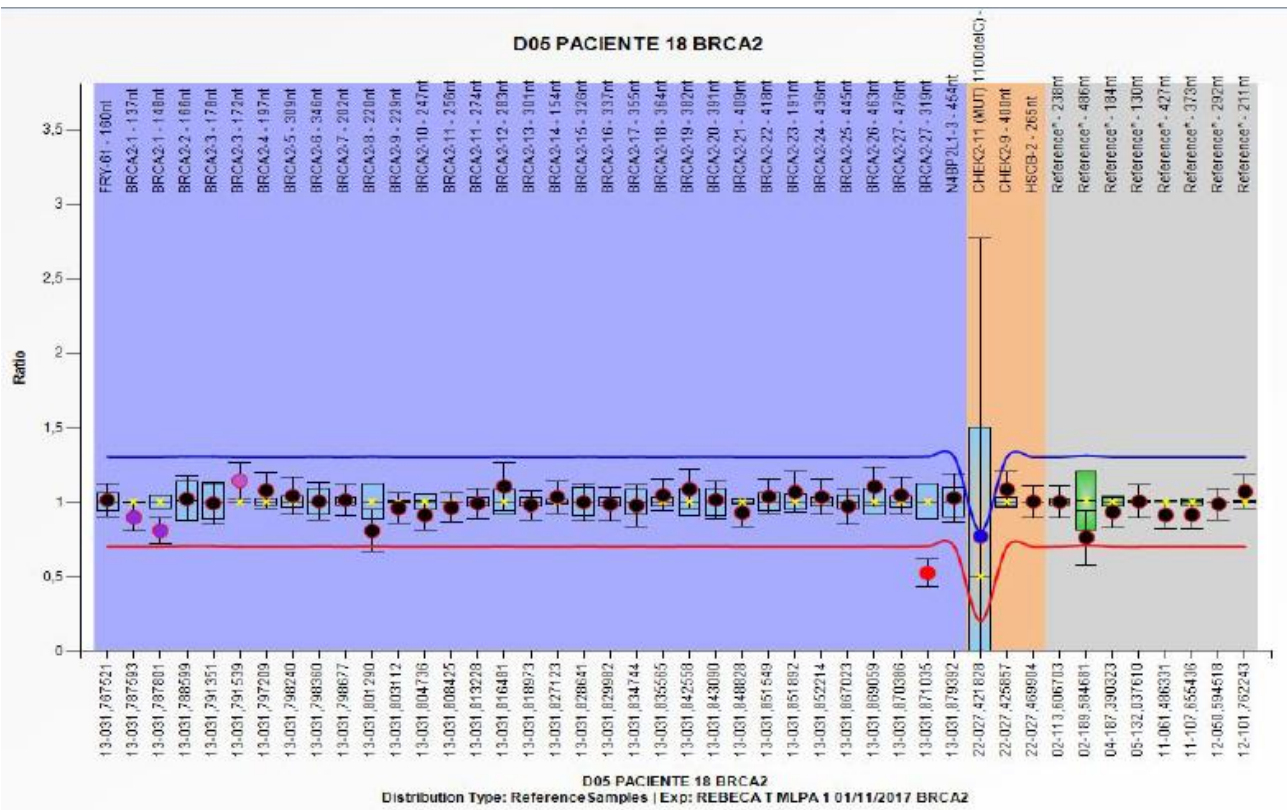


Figura 12 Gráfico de picos gerado pela análise de MLPA no software CoffaLyzer.net evidenciando deleção em heterozigose de parte do éxon 27 do gene *BRCA2*.

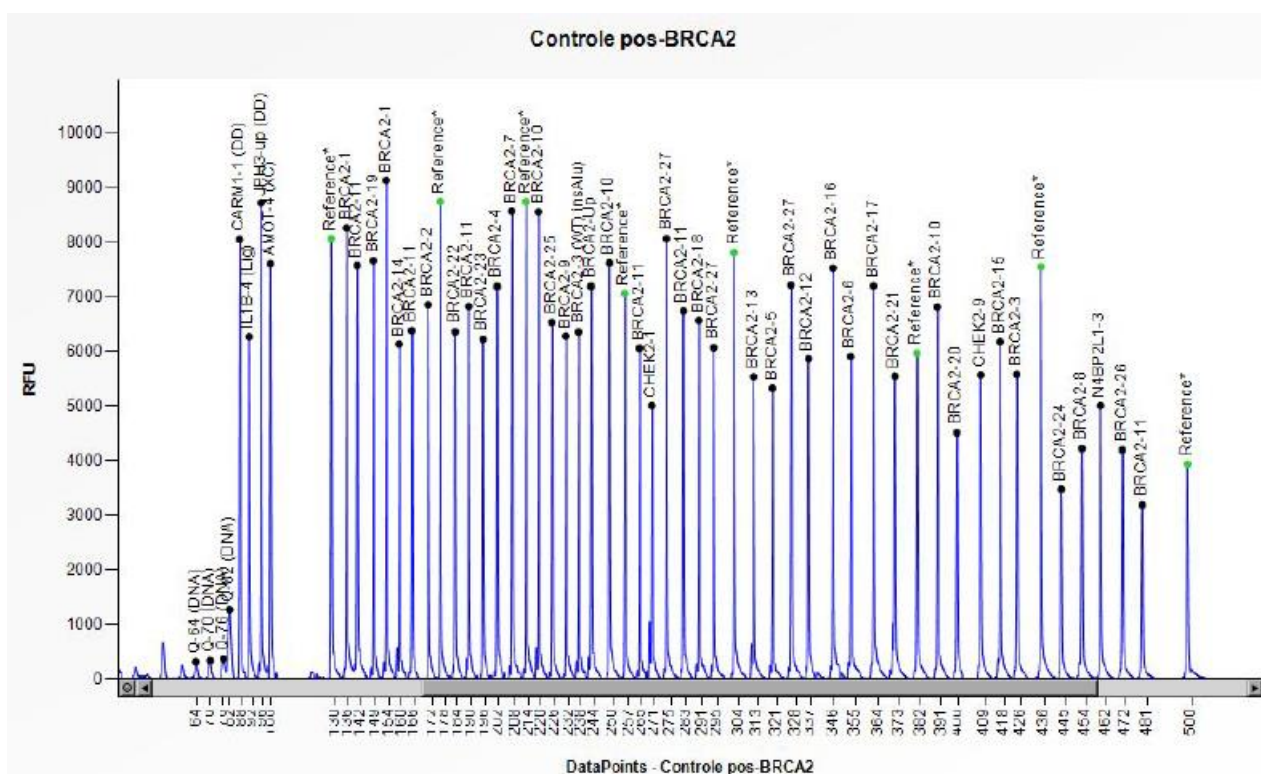


Figura 13 Eletroferograma gerado pela análise de MLPA no software *CoffaLyzer.net*, realizado para confirmação da ausência ou presença da variante observada em um paciente, evidenciando amplificação de todos os éxons do gene *BRCA2*, descartando suspeita de alteração avaliável pela técnica de MLPA.

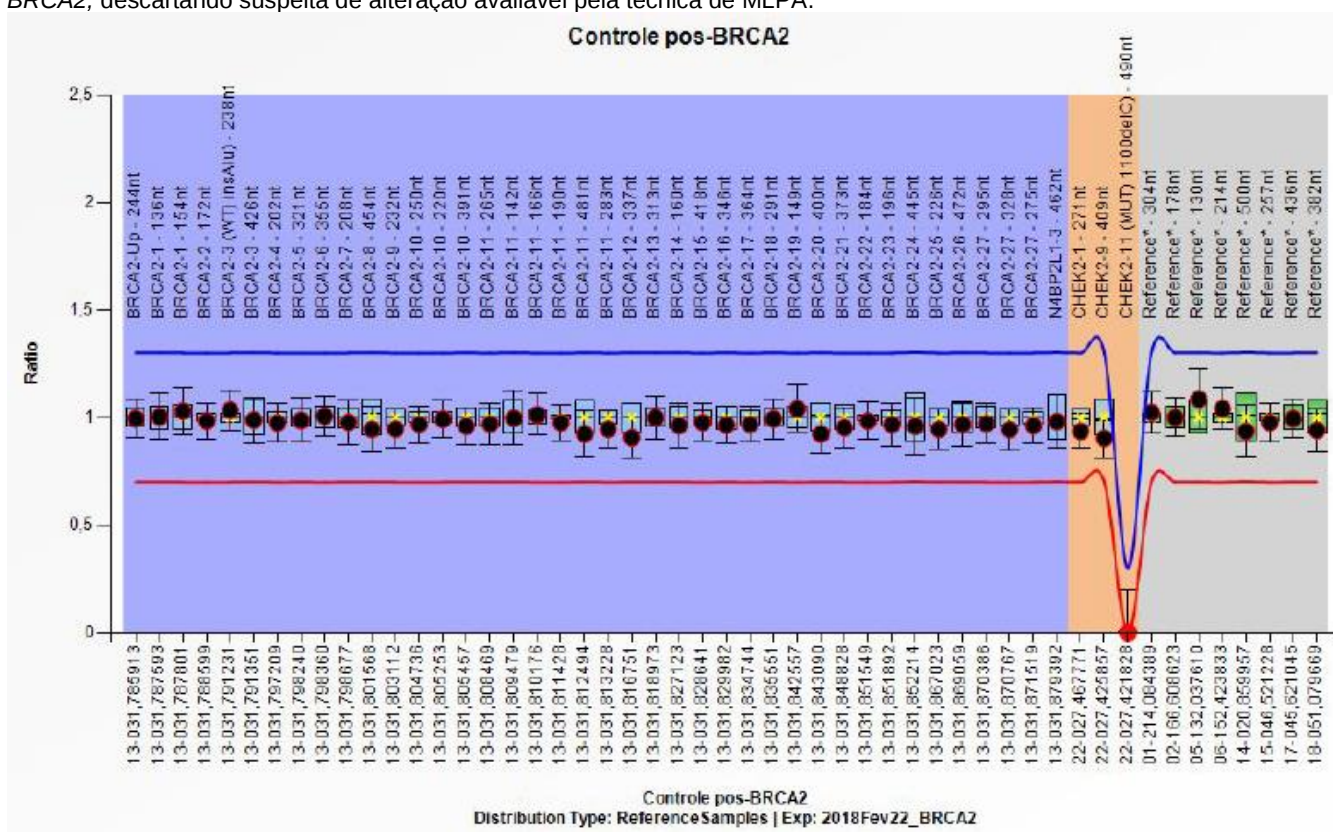


Figura 14 Gráfico de caixas gerado pela análise de MLPA no software *CoffaLyzer.net*, realizado para confirmação da ausência ou presença da variante observada em um paciente, evidenciando ausência de alterações no gene *BRCA2* avaliado pela técnica de MLPA.

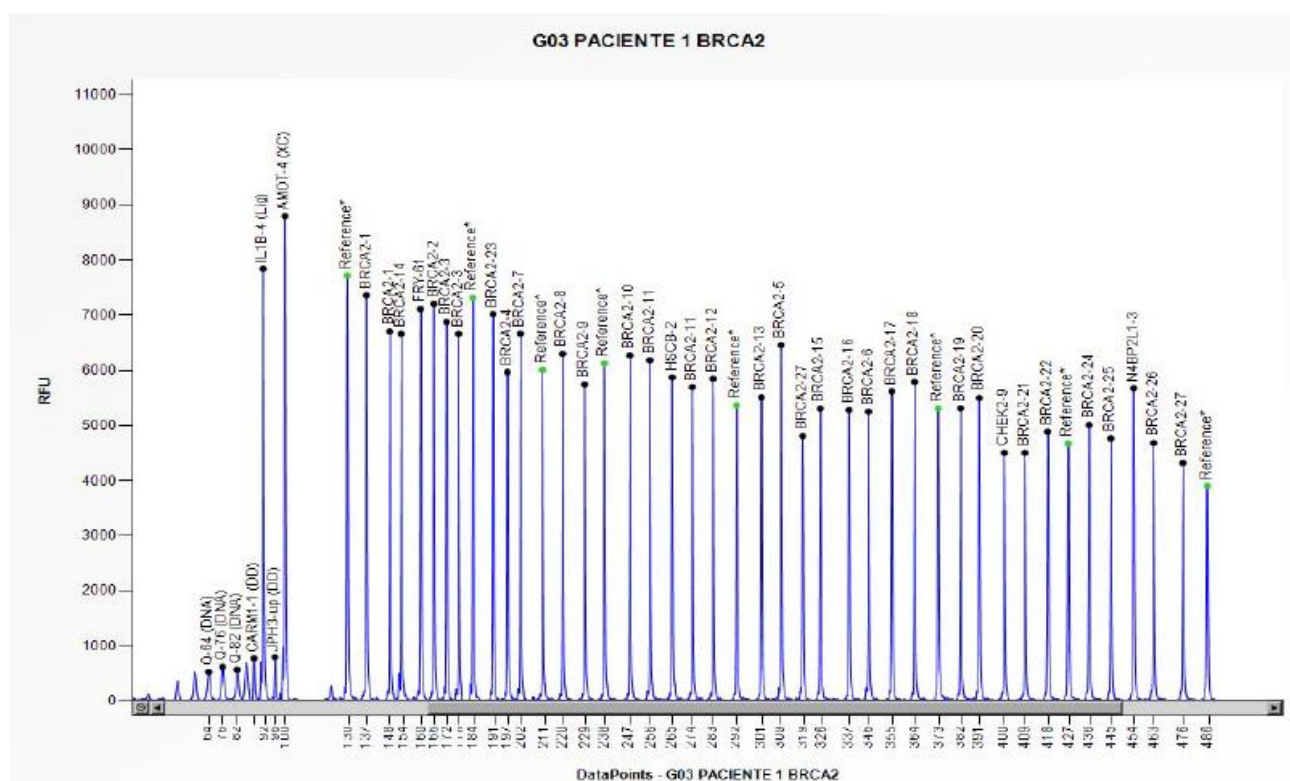


Figura 15 Eleetroferograma gerado pela análise de MLPA no software CoffaLyzer.net demonstrando padrão de picos para pacientes sem alterações no gene *BRCA2*.

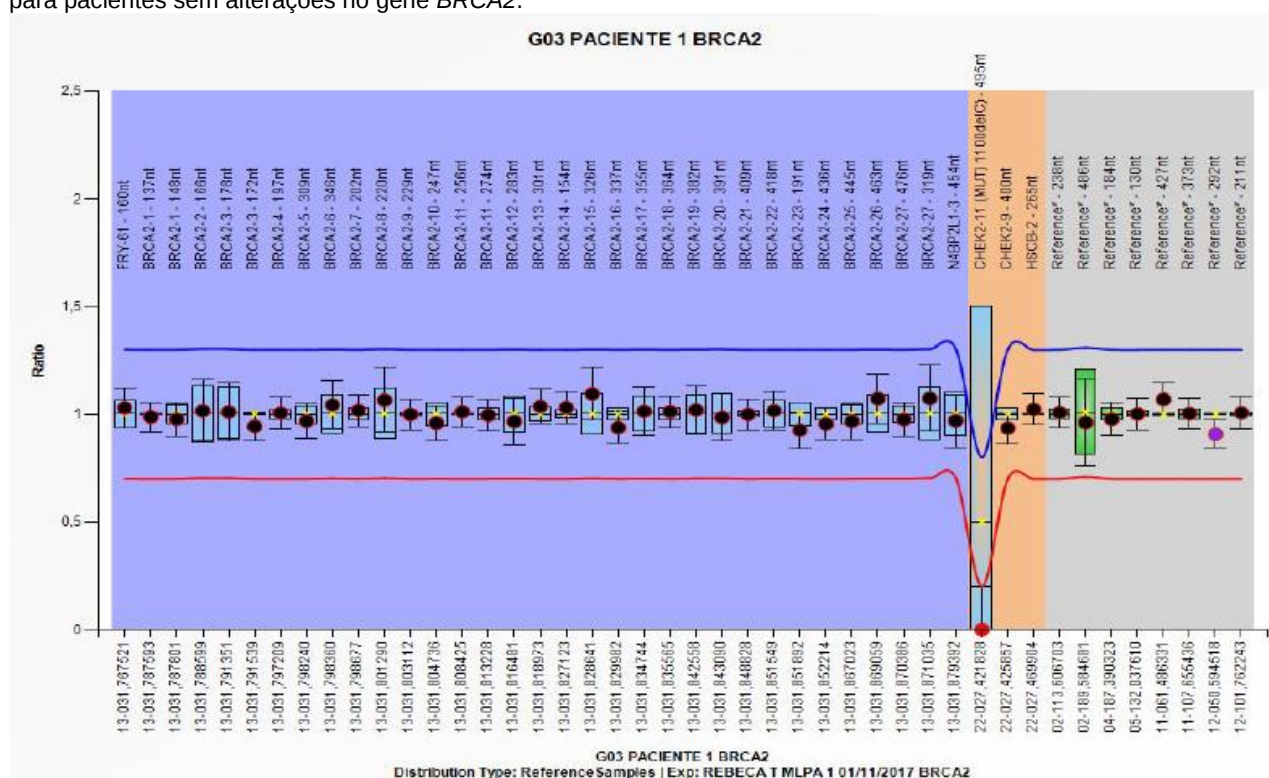


Figura 16 Gráfico de caixas, gerado pelo software CoffaLyzer.net demonstrando resultado padrão para pacientes sem alterações no gene *BRCA2*.

4.3. Associação do perfil mutacional previsto pelos softwares e os efeitos colaterais apresentados pelos pacientes submetidos ao tratamento antineoplásco.

Foram realizadas análises em três diferentes modelos de predição para verificar a probabilidade de um paciente apresentar mutação em *BRCA1* e/ou *BRCA2*. Os modelos utilizados foram o Índice de Manchester, PENN II e Myriade, sendo que todos calculam o risco de mutação a partir da história pessoal e/ou familiar de câncer do paciente.

De acordo com a análise realizada pelo modelo PENN II todos os participantes da pesquisa teriam probabilidade maior que 10% de possuir variantes nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, sendo considerado pouco confiável. De acordo com o índice de Manchester 46,34% dos pacientes apresentam risco maior que 10% para mutação nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, enquanto de acordo com análise realizada utilizando o modelo Myriade 57,7% dos pacientes teriam variantes em *BRCA1* ou *BRCA2* (Tabela 5). No geral, ao comparar os resultados do Índice de Manchester e Myriade, 36,9% dos pacientes aparecem como prováveis portadores de variantes em *BRCA1* ou *BRCA2* por ambos os modelos.

Tabela 5 Análise do risco do paciente possuir variantes nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* de acordo com diferentes modelos de predição.

	Índice de Manchester (%)	PENN II (%)	Myriade (%)
Provável BRCA +	46,35	100	57,7
Provável BRCA -	53,66	0	42,4

Foi realizada aplicação de questionário e análise de prontuários dos pacientes participantes da pesquisa para observação da relação entre a frequência dos efeitos colaterais observados e a maior ou menor probabilidade do paciente ser portador de uma mutação nos genes *BRCA1/2*. Foram considerados pacientes provavelmente mutados aquelas com probabilidade de mutação maior que 10% tanto pelo modelo Myriade quando pelo Índice de Manchester. Todos os efeitos colaterais e frequências observados estão demonstrados na tabela 6. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para a frequência de efeitos colaterais. No geral as pacientes com maior chance de carregar uma mutação nos genes *BRCA1/2* demonstraram ter um menor índice, embora não significativos, de efeitos indesejados do que as pacientes provavelmente não mutadas.

Tabela 6 Associação dos efeitos colaterais causados pela quimioterapia com a presença ou ausência de variantes de dos genes *BRCA1/2* previstas pelos softwares.

Efeito Colateral	Provável BRCA+ (%)	Provável BRCA- (%)	Valor de p
Dor no peito	0	3,3	1,00
Fogacho	6,2	6,6	1,00

Dor geral	12,5	30,0	0,28
Anemia	6,2	23,3	0,22
Neutropenia	6,2	20	0,39
Constipação	0	10,0	0,54
Diarréia	6,2	13,3	0,64
Intolerância a cheiros	0	6,6	0,53
Mucosite oral	12,5	10,0	1,00
Náuseas	50	46,6	1,00
Vômitos	25	23,3	1,00
Irritação ocular	12,5	0	0,11
Fraqueza Muscular	18,75	30,0	0,49
Tontura	6,2	6,6	1,00
Dor de cabeça	0	3,3	1,00
Neuropatia	12,5	16,6	1,00
Visão turva	12,5	16,6	1,00
Flatulências	0	3,3	1,00
Insônia	6,2	3,3	1,00
Perda das unhas	6,2	20	0,64
Prurido	6,2	6,6	1,0

A idade média das pacientes do nosso estudo foi de 37,52 anos, valor semelhante ao encontrado em outros estudos, como em estudo realizado com pacientes das regiões Sul, Sudeste e Nordeste, em que a idade média das pacientes foi de 42,92 anos sendo que 85,2% das diagnosticados antes dos 50 anos. Em nosso estudo 91,3% dos pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram diagnosticados com câncer de mama antes dos 40 anos de idade. Provavelmente nossos estudos encontraram uma média relativamente baixa de idade devido ao uso de uma grande gama de critérios para inclusão das pacientes na pesquisa, critérios estes que estão comumente presentes em mulheres jovens (Ewald, 2016).

Quanto ao tipo histológico, como esperado, o mais prevalente foi o carcinoma ductal invasivo, presente em todos os pacientes, e apenas um (2,17%) apresentou um segundo tumor medular. No Brasil, estudo realizado na região Sudeste de São Paulo também encontrou uma baixa prevalência de pacientes com tumores medulares, de 1,6% (FERNANDES, 2015).

Neste estudo, a presença de rearranjos gênicos nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foi avaliada pela técnica MLPA. Nenhuma Alteração foi encontrada para o gene *BRCA1*, sejam elas duplicações ou deleções. Para o gene *BRCA2*, foi encontrado um único paciente (2,17%) com deleção heterozigótica do éxon 27, entretando o resultado observado foi um falso positivo, possivelmente ocasionado pela presença de um SNP na região de ligação da sonda de MLPA.

No Brasil, assim como em outros países mundo, a presença de mutações pontuais distribuídas pelos genes *BRCA1* e *BRCA2* é mais comum (FIGUEIREDO, 2014), no entanto, a frequência de grandes duplicações ou deleções pode variar amplamente de acordo com a localização geográfica, mesmo dentro de um único país ou grupo étnico.

Em alguns países, uma alta prevalência de rearranjos gênicos é relatada em *BRCA1* e *BRCA2*. Em um estudo recente na América Latina, o efeito fundador da deleção dos exons 9-12 no gene *BRCA1* foi observado (OSSA & TORRES, 2016). Em um estudo conduzido na África do Sul, foi proposto que mulheres negras pré-menopausadas, triplo-

negativas, sempre seriam portadoras de grandes deleções ou duplicações nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* (FRANCIES et al., 2015).

Na Europa também existem estudos que mostram a presença de grandes duplicações e/ou deleções gênicas em determinadas populações. Na região de Valência, Espanha, foi observado que 20% dos pacientes selecionados para a síndrome HBOC tinham a deleção dos exons 3-5 do gene *BRCA1* (PALANCA et al., 2013). Na população italiana, grandes rearranjos deleções e duplicações gênicas correspondem a 40% de todas as variantes encontradas nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* dessa população (PALANCA et al., 2013). Prevalência semelhante à encontrada na Holanda, onde os rearranjos gênicos correspondem a 36% das variantes encontradas nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* (HOGERVORST et al., 2003). Em Portugal, a variante c.156_157insAlu no éxon 3 do gene *BRCA2* tem um efeito fundador e está presente em 58% das famílias portuguesas com alto risco de síndrome de HBOC (PEIXOTO et al., 2011).

Em contraste, muitos estudos encontraram uma baixa prevalência de rearranjos genéticos em *BRCA1* ou *BRCA2*. Na Lituânia, observou-se que apenas 4,2% dos pacientes com câncer de mama tinham rearranjos genéticos em *BRCA1* ou *BRCA2*. Na Polônia e na Suécia estudos que avaliaram a presença de grandes deleções e duplicações em pacientes negativos para mutações pontuais verificou que a prevalência de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes de alto risco para a síndrome HBOC foi baixa, e em ambos os países apenas 3,8% destes pacientes tiveram grandes deleções e duplicações (RUDNICKA et al., 2013; THOMASSEN et al., 2006).

Ainda existem populações em que a prevalência dos rearranjos *BRCA1* e *BRCA2* parece ser zero, como na Finlândia e no Canadá, onde estudos avaliando apenas pacientes de famílias de alto risco para a síndrome do HBOC não encontraram pacientes com rearranjos gênicos (MOISAN et al., 2006; LAHTI-DOMENICI et al., 2001).

O Brasil é um país extremamente misto, e a composição genética da população brasileira é predominantemente composta por componentes europeus, principalmente de Portugal, africanos e povos indígenas. A região Centro-Oeste do Brasil sofreu uma posterior colonização em comparação com as outras regiões do país, e as populações que imigraram para a região vieram principalmente das regiões Nordeste e Sudeste do país, que já possuíam uma composição genética diferente daquela encontrada no país no início da colonização. Para o estado de Goiás, 83% da composição genética da população é composta por componentes europeus, 13% africanos e 3% indígenas (GODINHO, 2008).

Devido à diferença na composição genética da população e as diferenças no perfil de colonização de cada região do Brasil, é de grande importância que os estudos genéticos considerem que uma população X pode não corresponder ao mesmo perfil observado na população Y de um mesmo país.

No Brasil, um estudo com pacientes de alto risco para a síndrome HBOC do Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul e Bahia, que verificou apenas rearranjos gênicos no gene *BRCA1*, encontrou a maior prevalência de rearranjos gênicos já descritos no país, de 7,8% dos pacientes com esse tipo de variante, com a deleção do exon 19 do *BRCA1* aparecendo como responsável por 28,5% de todos os rearranjos observados (EWALD, 2008).

Estudo realizado com pacientes de alto risco de todas as regiões do Brasil, com exceção do centro-oeste, verificou que 19% tinham variantes nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, no entanto, apenas dois pacientes tiveram rearranjos gênicos, sendo eles a deleção dos exons 1-2 do gene *BRCA1* e deleção dos exons 5-7 do gene *BRCA1* (MAISTRO, 2016). Em estudo realizado no estado de São Paulo, com 287 pacientes de alto risco, foi encontrado um raro caso de duplicação do éxon 24 do gene *BRCA1* e a deleção dos éxons 16-17 do mesmo gene (FERNANDES, 2015).

Neste estudo esperava-se encontrar pacientes com a variante fundadora portuguesa c.156_157insAlu no éxon 3 do gene *BRCA2*, considerando a grande importância de Portugal para a composição genética da população brasileira como um todo, porém não encontramos pacientes com a variação gênica. Outros estudos realizados na região sul do Brasil também não encontraram pacientes com a variante portuguesa (PEIXOTO et al., 2011; ANTÔNIO et al., 2016).

Em um estudo recente realizado no Brasil com pacientes de alto risco dos estados do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro, a presença de pacientes com a variante c.156_157insAlu foi observada, representando 60% de todos os rearranjos encontrados nesta população. No mesmo estudo, verificou-se que 3,4% dos pacientes de alto risco tinham rearranjos gênicos e que, além da variante portuguesa, as deleções dos éxons 9-17 e 16-17 foram encontradas no gene *BRCA1* (EWALD, 2006).

Foram realizadas ainda análises de predição de risco para avaliar qual a probabilidade destes pacientes possuírem variantes nos genes *BRCA1* e *BRCA2* por meio dos modelos PENN II, Myriade e Índice de Manchester e a influencia do perfil provavelmente mutado enão mutado com relação a resposta ao tratamento quimioterápico.

Um único estudo foi realizado analisando o status de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* com a toxicidade a quimioterapia na população Polonesa (HUSZNO et al, 2013). O fato de pacientes com mutações deletérias em *BRCA1* e *BRCA2* terem melhor resposta ao tratamento envolvendo antraciclinas sugere também que estes possam apresentar uma maior presença de efeitos indesejados em comparação aos demais pacientes (BYRSKI et al, 2012).

No estudo Polonês foram avaliadas apenas as principais mutações encontradas no país (c.5266dupC, c.6869delAG, c.181T>G e c.4034delA no gene *BRCA1* e c.5946delT e c.9403delC no gene *BRCA2*), o que não abrange todas as pacientes que realmente poderiam vir a ter alguma mutação nestes genes.(HUSZNO et al, 2013).

Huszno et al. (2013) constatou que pacientes com *BRCA1* e *BRCA2* mutado apresentam significativamente mais neutropenia que as pacientes não mutadas, no entanto, as pacientes sem mutação detectada apresentaram significativamente mais náuseas e vômitos que as pacientes com mutação encontrada. Em nossas análises não existiram diferenças significativas com relação à neutropenia, náuseas e vômitos, entretanto foi possível observar, tanto em nosso estudo quanto em Huszno et al.(2013), que as pacientes que provavelmente não possuíam variantes patogênicas em *BRCA1* ou *BRCA2* apresentaram uma maior toxicidade com relação ao tratamento, apesar dos dados não serem estatisticamente significativos.

Considerando o fato de a maioria das mutações serem pontuais e restritas a famílias e determinados grupos, é de grande importância ainda a realização de um painel genético baseado em NGS para nossa população.

Assim como Huszno et al. (2013) não temos uma análise que possa ser considerada completamente fidedigna com a realidade ao observarmos a relação entre o tratamento quimioterápico e o perfil mutacional de *BRCA1* e *BRCA2*, uma vez que no trabalho citado foram buscadas apenas mutações fundadoras e no nosso trabalho foram analisadas apenas grandes deleções ou duplicações gênicas bem como a probabilidade dos pacientes apresentarem variantes.

Os resultados encontrados até o momento em nosso estudo trazem um grande ganho de informações a respeito do perfil mutacional de pacientes com câncer de mama e ovário de suspeita hereditária para a região centro-oeste do Brasil, onde até o momento já foi possível observar que para a nossa população, os rearranjos gênicos são raros,

acarretando um impacto científico positivo para o aconselhamento genético e prognóstico dos pacientes com suspeita da síndrome HBOC tratados na rede pública de saúde.

As pacientes goianas com critérios positivos para a síndrome do câncer de mama e ovário hereditário do estado de Goiás, na região centro-oeste do Brasil apresentam baixa prevalência de grandes deleções ou duplicações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Também foi observado que não existem diferenças com relação a toxicidade do tratamento quimioterápico entre pacientes provavelmente mutadas e provavelmente não mutadas em nossa população.

Considerando o fato de a maioria das mutações serem pontuais e restritas a famílias e determinados grupos estudos futuros e com um maior número de pacientes são ainda necessários para podermos analisar mais a fundo o perfil mutacional da nossa população, por meio de NGS, o que tornaria possível avaliarmos toda a extensão dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, o que provavelmente nos levaria a descobertas de mutações pontuais em pacientes nas quais não foram encontradas grandes duplicações ou deleções gênicas.

-
1. Alemar, B.; Herzog, J.; Brinckmann, C.; Netto, O.; Artigas, O.; Schwartz, I. V.; Bittar, C.; Ashton-Prolla, P.; Weitzel, J. Prevalence of Hispanic BRCA1 and BRCA2 mutations among hereditary breast and ovarian cancer patients from Brazil reveals differences among Latin American populations. **Cancer Genetics**. 2016.
 2. Allain, D.C. Genetic counseling and testing for common hereditary breast cancer syndromes: A paper from the 2007 William Beaumont hospital symposium on molecular pathology. **J Mol Diagn**. v.10, p.383-395. 2008.
 3. 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. p.167-177, 2003.
 4. Anderson DE. An Inherited Form of Large Bowel Cancer. **Cancer**.v. 45, p.1103-08. 1980.
 5. ANTONIO, E. C.; PROLLA, P. A.; NETTO, C. B. O.; ALEMAR, B. **Análise da mutação BRCA2 C.156_157INSALU em famílias com critérios de síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário no sul do Brasil**. Congresso Brasileiro de Biomedicina. Bento Gonçalves, 2016.
 6. APESSOS, A.; AGIANNITO, K.; PEPEA, G.; et al. Comprehensive BRCA mutation analysis in the Greek population. Experience from a single clinical diagnostic center. **Cancer Genetics**. V. 220, p. 1-12. Jan, 2018.
 7. Ashton-Prolla, P.; Vargas, F.R. Prevalence and impact of founder mutations in hereditary breast cancer in Latin America. **Genet Mol Biol**. V. 37, p. 234–240. 2014.
 8. BERRY, D. et al. BRCAPRO validation, sensitivity of genetic testing of BRCA1/BRCA2, and prevalence of other breast cancer susceptibility genes. **Journal of Clinical Oncology**. V. 20, n 11, 2002.
 9. BOUAOUN, L. et al. TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. **Human Mutation**. v. 37, p. 865–876. 2016.
 10. Bryant, H.E.; Schultz, N.; Thomas, H.D.; et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. **Nature**. v.434, p.913–917. 2005.
 11. Burstein HJ; Lou G. Angelina Jolie and cancer genetics. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN**. v.11p.631–2. 2013.
 12. Castro E, Eeles R: The role of BRCA1 and BRCA2 in prostate cancer. **Asian J Androl**. v. 14. p. 409-414, 2012.

13. Cheang, M.C.; Chia, S.K.; Voduc, D.; Gao, D.; Leung, S.; Snider, J.; Watson, M.; Davies, S.; Bernard, P.S.; Parker, J.S.; Perou, C.M.; Ellis, M.J.; Nielsen, T.O. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst.** v. 101. p. 736-750, 2009.
14. Chen S, Iverson ES, Friebel T et al. Characterization of BRCA1 and BRCA2 mutations in a large United States sample. **J Clin Oncol.** v.24, p.863–871. 2006.
15. Chen S, Parmigiani G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. **J Clin Oncol.** v. 25, p.1329– 1333, 2007.
16. Chene, G.; Lamblin, G.; Le Bail-Carval, K.; et al. Lucy's cancer(s): A prehistorical origin? **Gynecol Obstet Fertil.** v.44, p.690-700. 2016.
17. CIRQUEIRA, M.B. **Subclassificação por imunoistoquímica de carcinomas ductais de mama do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás no período de 2003 a 2007.** 18 Nov 2011. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2011.
18. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins. **Patologia funcional e estrutural.** 6 a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.261.
19. Cragun D, Bonner D, Kim J, Akbari MR, Narod SA, Gomez-Fuego A, et al. Factors associated with genetic counseling and BRCA testing in a population-based sample of young Black women with breast cancer. **Breast cancer research and treatment.** 2015.
20. Cullinane, C.; Cutts, S. M.; Vanrosmalen, A.; Phillips, D. R.; **Nucleic Acids Res.** v. 1994.
21. DANTAS, E.L.R.; SÁ, F.H.L.; CARVALHO, S.M.F.; ARRUDA, A.P.; RIBEIRO, E.M.; RIBEIRO, E.M. Genética do Câncer Hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v. 53. p. 263-269, 2009.
22. DAVIE, O. R.; PELLEGRINI, L. Interaction with the BRCA2 C-terminus Protects RAD51–DNA Filaments from Disassembly by BRC Repeats. **Nat Struct Mol Biol.** V. 14, p. 475–483. Jun, 2007.
23. De Juan, I. J.; García, Z. C.; Palanca, S. S.; et al. Novel and recurrent BRCA1/BRCA2 mutations in early onset and familial breast and ovarian cancer detected in the Program of Genetic Counseling in Cancer of Valencian Community (eastern Spain). Relationship of family phenotypes with mutation prevalence. **Fam Cancer.** v. 12, p. 767-777. 2013.
24. De Lorenzo, S.B.; Patel, A.G.; Hurley, R.M.; et al. The elephant and the blind men: making sense of PARP inhibitors in homologous recombination deficient tumor cells. **Front Oncol.** v.3, p. 228. 2013.

25. DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, A.S. Câncer principles and practice of oncology. **Lippincott Williams and Wilkins**, 2001.
26. Dizdar, O.; Arslan, C.; Altundag, K. Advances in PARP inhibitors for the treatment of breast câncer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. 2015.
27. Donoho, G.; Brenneman, M. A.; Cui, T. X.; Donoviel, D.; Vogel, V.; et al. Deletion of Brca2 Exon 27 Causes Hypersensitivity to DNA Crosslinks, Chromosomal Instability, and Reduced Life Span in Mice. **Genes, chromosomes & cancer**. V. 36, p. 317–331. 2003.
28. El Saghir, N. S.; Zgheib, N. K.; Assi, H. A.; Khoury, K.E.; Bidet, Y.; Jaber S. M.; Charara R. N.; Farhat R. A.; Kreidieh F. Y.; Decousus, S.; Romero, P.; Nemer, G. M.; Salem, Z.; Shamseddine, A.; Tfayli, A.; Abbas, J.; Jamali, F.; Seoud, M.; Armstrong, D. K.; Bignon, Y. J.; Uhrhammer, N. BRCA1 and BRCA2 mutations in ethnic Lebanese Arab women with high hereditary risk breast cancer. **Oncologist**. v. 20, p. 357-364. 2015.
29. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil (Estimate/2016 - Cancer incidence in Brazil). Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância 2015.
30. Ewald, I. P. **Rastreamento de mutações patogênicas nos genes BRCA1 e BRCA2 em pacientes brasileiras em risco para síndrome do câncer de mama e ovário hereditário**. 2008. 152 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) Faculdade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.
31. Ewald, I. P.; Cossio, S. L.; Palmero, E. I.; Pinheiro, M.; Nascimento, I. L.; Machado, T. M.; Sandes, K. A.; Toralles, B.; Garicochea, B.; Izetti, P.; Pereira, M. L.; Bock, H.; Vargas, F. R.; Moreira, M. Â.; Peixoto, A.; Teixeira, M. R.; Ashton-Prolla, P. **Genet Mol Biol**. V. 39, p. 223-231. 2016.
32. Evans SC, Lozono G. The Li-Fraumeni syndrome: susceptibility to cancer. **Mol Med Today**. v.3, p.390-5. 1997.
33. Fackenthal, J. D.; Olopade, O. I. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. **Nature Reviews Cancer**. v.7, p. 937-948. 2007.
34. Farmer, H.; McCabe, N.; Lord, C.J.; et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. **Nature**. v.434, p.917–921. 2005.
35. FDA. First PARP Inhibitor Approved for Breast Cancer. **Cancer Discov**. 2018.
36. Fernandes, G. C. **Identificação de mulheres em risco para câncer de mama hereditário por mutação nos genes BRCA1 e BRCA2: contribuição dos dados patológicos, história familiar e modificadores genéticos do risco de câncer**. 2015. 173f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos. Barretos, São Paulo, Brasil.
37. Figueiredo, M. C. P. **CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO: RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES NOS GENES BRCA1 E BRCA2 E BUSCA DE NOVOS GENES DE**

- SUSCEPTIBILIDADE.** 2014. 203f. Tese (Doutorado em Ciências) Fundação Antônio Prudente. São Paulo, São Paulo, Brasil.
38. PARMIGIANI, G. Determining carrier probabilities for breast cancer susceptibility genes BRCA1 and BRCA2. **The American Journal of Human Genetics.** v. 62, p.145-158, 1998.
39. GEYER, F.C. Tipos histológicos especiais de câncer de mama. **Onco&.** Jan/Fev, 2013.
40. GIARDELLO, F.M.; BRENSINGER, J.D.; TERSMETTE, A.C.; GOODMAN, S.N.; et al: Very high risk of cancer in familial Peutz- -Jeghers syndrome. **Gastroenterol** 2000; 119: 1447-53
41. GOLDBERG JI, BORGES PI. Breast cancer susceptibility testing: past, present and future. **Expert Rev Anticancer Ther.** 2006; 6:1205-14.
42. Gomes, M.C.; Costa, M.M.; Borojevic, R.; et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil. **Breast Cancer Res Treat.** V. 103, p. 349-353. 2006.
43. GÜERE, P.; GALARZ, C.; HUAMÁN, M. Síndrome de Muir-Torre: caso clínico. **Folia dermatol.** V. 20, p. 87-90. 2009
44. HABBER, D. A. The BRCA2-EMSY connection: implications for breast and ovarian tumorigenesis. **Cell.** V. 115, p. 507-8. Nov. 2003.
45. Hamel, N.; Feng, B.J.; Foretova, L.; et al. On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations. **Eur J Hum Genet.** V. 19, p. 300-306. 2011.
46. Hanahan, D.; Weinberg, RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell.** v.144, p.646-74. 2011.
47. Haskel, C. M.; Cancer Treatment, **Saunders:** Philadelphia, 1990.
48. HEANEY, R.M.; FARRELL, M.; STOKES, M.; GOREY, T; MURRAY, D. Cowden Syndrome: Serendipitous Diagnosis in Patients with Significant Breast Disease. Case Series and Literature Review. **The Breast Journal.** 2016.
49. Herman, S.; Varga, D.; Deissler, H.L.; et al. Medium-sized deletion in the BRCA1 gene: Limitations of Sanger sequencing and MLPA analyses. **Genet Mol Biol.** v.35, p.53-6. 2012.
50. HEMMINKI, A.; MARKIE, D.; TOMLINSON, I.; et al: A serine/ threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. **Nature** 1998; 391: 184-7
51. Hernández JE, Llacuachqui M, Palacio GV, Figueroa JD, Madrid J, Lema , et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected breast cancer patients from medellín, Colombia. **Hered Cancer Clin Pract.** 2014.

52. Hodgson, S; Caligo. M; Chang-Claude, J; Eccles, D; Evans, G; Moller, P; et al. A survey of the current clinical facilities for the management of familial cancer in Europe. **J Med Genet.** v.37, p.605–607. 2000.
53. HOMIG-HOLZEL, C.; SAVOLA, S. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics. **Diagn Mol Pathol.** V. 21, p. 189-206. Dec, 2012.
54. Huen MSY, Sy SMH, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. **Nature.** v.11, p.138-48. 2010.
55. Janavičius, R.; Rudaitis, V.; Mickys, U.; Elsakov, P.; Griškevičius, L. Comprehensive BRCA1 and BRCA2 mutational profile in Lithuania. **Cancer Genet.** v. 207, p. 195-205. 2014.
56. JORDE, L. B., CAREY, J. C., BAMSHAD, M. J., WHITE, R. L. **Genética Médica.** 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 197 – 221.
57. KIM, T.M.; SON, M.Y.; DODDS, S.; HU, L.; HASTY, P. Deletion of BRCA2 exon 27 causes defects in response to both stalled and collapsed replication forks. **Mutation Research.** P. 66–72. 2014.
58. Kote-Jarai, Z; Leongamornlert, 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.
59. LAHTI-DOMENICI J, RAPAKKO K, PAAKKONEN K, et al. Exclusion of large deletions and other rearrangements in BRCA1 and BRCA2 in finnish breast and ovarian cancer families. **Cancer Genet Cytogenet.** v. 129, p.120-3. 2001.
60. LEVINE AJ, MOMAND J, FINLAY CA. The p53 tumor supressor gene. **Nature.** v.6, p.453-6. 1991.
61. LEVY DE, BYFIELD SD, COMSTOCK CB, GARBER JE, SYNGAL S, CROWN WH, et al. Underutilization of BRCA1/2 testing to guide breast cancer treatment: black and Hispanic women particularly at risk. **Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics.** v.13, p.349–55. 2011.
62. LI, C.; HEIDIT, D.G.; DALERBA, P.; BURANT, C.F.; ZHANG, L.; ADSAY, V.; WICHA, M.; CLARKE, M.F.; SIMEONE, D.M. Indentification of pancreatic cancer stem cells. **Cancer Research.** v. 67. p. 1030-1037, 2007.
63. LI, C.I.; ANDERSON, B.O.; DALING, J.R.; MOE, R.E. Trends in incidence rates of invasive lobular and ductal breast carcinoma. **JAMA.** v.289. p.1421–1424, 2003.
64. LI, C.I.; URIBE, D.J.; DALING, J.R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. **British Journal of Cancer.** v. 93. p. 1046-1052, 2005.

65. LIAW, D.; MARSH, D.J.; LI, J. Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. **Nat Genet.** v.16 p.64–7, 1997.
66. LINDOR NM, MCMASTER ML, LINDOR CJ, GREENE MH, National Cancer Institute, Division of Cancer Prevention, Community Oncology and Prevention Trials Research Group. Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes - second edition. **J Natl Cancer Inst Monogr.** v.38, p.1-93. 2008.
67. LIU JF, KONSTANTINOPOULOS PA, MATULONIS UA. PARP inhibitors in ovarian cancer: current status and future promise. Review. **Gynecol Oncol.** v.33, p.362–9. 2014.
68. LLOYD, K.M.; DENNIS, M. Cowden's disease. A possible new symptom complex with multiple system involvement. **Ann Intern Med.** v.58. p.136–42, 1963.
69. LOPES AL; GONÇALVES J; PALHA AM; FURTADO F; MARQUES A. SÍNDROME DE PEUTZ-JEGHERS: Diversidade de Expressão Gastrointestinal em Idade Pediátrica e Considerações sobre a sua Abordagem Clínica. **Acta Med Port.** v.17, p.445 – 450. 2004.
70. MACHADO PM, BRANDÃO RD, CAVACO BM, et al. Screening for a BRCA2 rearrangement in high-risk breast/ovarian cancer families: evidence for a founder effect and analysis of the associated phenotypes. **J Clin Oncol.** v.25, p.2027-34. 2007.
71. MAISTRO, S. M.; TEIXEIRA, N., ENCINAS, G.; et al. Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in epithelial ovarian cancer patients in Brazil. **BMC Cancer.** V.16. 2016.
72. MALKIN, D. Li-Fraumeni Syndrome. **Genes & Cancer.** v. 2, p. 475–484. 2011.
73. MARTIN AM, BLACKWOOD MA, ANTIN-OZERKIS D et al. Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast-ovarian families from a breast cancer risk evaluation clinic. **J Clin Oncol.** 2001.
74. MAVADDAT, N.; BARROWDALE, D.; ANDRULIS, I. L.; et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** v.21. 2012.
75. MESTER, J.; ENG, C. Estimate of de novo mutation frequency in probands with PTEN hamartoma tumor syndrome. **Genet Med.** v.14. p.819–22, 2012.
76. MOISAN AM, FORTIN J, DUMONT M, et al. No evidence of BRCA1/2 genomic rearrangements in high-risk French-Canadian breast/ovarian cancer families. **Genet Test.** v.10, p.104-15. 2006.
77. MONTAGNA M, DALLA PM, MENIN C, et al. Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. **Hum Mol Genet.** v.12, p.1055-61. 2003.
78. MOYNAHAN ME, PIERCE AJ, JASIN M. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. **Mol Cell.** v.7, p.263-72. 2001.

79. NAROD SA, FEUNTEUN J, LYNCH HT, et al. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. **Lancet**.v. 338, p.82-83. 1991.
80. NAROD SA, SALMENA L. BRCA1 and BRCA2 mutations and breast cancer. **Discov Med**. p.12, v.445-53. 2011.
81. ODDOUX, C.; STRUEWING, J. P.; CLAYTON, C. M.; NEUHAUSEN, S.; BRODY, L. C.; KABACK, M.; HAAS, B.; NORTON, L.; BORGEM, P.; JHANWAR, S.; GOLDFAR, D.; OSTRER, H.; OFFIT, K. The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. **Nat Genet**. V. 14, p. 188-190. 1996.
82. OSSA, C. A. & TORRES, D. Founder and Recurrent Mutations in BRCA1 and BRCA2 Genes in Latin American Countries: State of the Art and Literature Review. **Oncologist**. v. 21, p. 832-839. 2016.
83. PALANCA S, DE JUAN I, PEREZ-SIMÓ G, et al. The deletion of exons 3-5 of BRCA1 is the first founder rearrangement identified in breast and/or ovarian cancer Spanish families. **Fam Cancer**. v.12, p.119-23. 2013.
84. PALMERO, E. I.; CALEFFI, M.; SCHÜLER-FACCINI, L.; et al. Population prevalence of hereditary breast cancer phenotypes and implementation of a genetic cancer risk assessment program in southern Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. V. 32, p. 447-455. 2009.
85. PARMIGIANI, G. Determining carrier probabilities for breast cancer susceptibility genes BRCA1 and BRCA2. **The American Journal of Human Genetics**. v. 62, p.145-158, 1998.
86. PEIXOTO A, SANTOS C, ROCHA P, et al. The c.156_157insAlu BRCA2 rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious BRCA mutations in northern/central Portugal. **Breast Cancer Res Treat**. v.114, p.31-8. 2009.
87. PEIXOTO A, SANTOS C, PINHEIRO M, et al. International distribution and age estimation of the Portuguese BRCA2 c.156_157insAlu founder mutation. **Breast Cancer Res Treat** . v.127, p. 671-9. 2011.
88. PELTOMÄKI, P. Mutations and epimutations in the origin of cancer. **Exp. Cell. Res**. v. 318. p.299-310, 2012.
89. PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; REES, C.A.; POLLACK, J.R.; ROSS, D.T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L.A.; FLUGE, O.; PERGAMENSCHICOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S.X.; LONNING, P.E.; BORRESEN-DALE, A.; BROWN, P.O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**. v. 406. p. 747-752, 2000.
90. POLIAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **J. Clin. Invest**. v.117. p.3155-3163, 2007.

91. PÖLSLER, L.; FIEGL, H.; WIMMER, K.; OBERAIGNER, W.; AMBERGER, A.; TRAUNFELLNER, P.; MORSCHER, R. J.; WEBER, I.; FAUTH, C.; WERNSTEDT, A.; SPERNER-UNTERWEGER, B.; OBERGUGGENBERGER, A.; HUBALEK, M.; MARTH, C.; ZSCHOCKE, J. High prevalence of BRCA1 stop mutation c.4183C>T in the Tyrolean population: implications for genetic testing. **European Journal of Human Genetics**. v. 24, p. 258-262. 2016.
92. RAMALHO, E. A. V. F.; SILVA-FILHO, J. L. Q.; CARTAXO, M. F. S.; CAVALCANTI, C. B. L.; RÊGO, M. J. B. M.; OLIVEIRA, M. B. M.; BELTRÃO, E. I. C. Assessment of changes in the *brca2* and *p53* genes in breast invasive ductal carcinoma in northeast Brazil. **Biol Res**. V. 47. 2014.
93. RIAHI, A.; KHARRAT, M.; GHOURABI, M. E.; KHOMSI, F.; GAMOUDI, A.; LARIANI, I.; MAY, A. E.; RAHAL, K.; CHAABOUNI-BOUHAMED, H. Mutation spectrum and prevalence of BRCA1 and BRCA2 genes in patients with familial and early-onset breast/ovarian cancer from Tunisia. **Clin Genet**. v. 87, p. 155-160. 2015.
94. RIVERNBARK, A.G; O'CONNOR, S.M.; COLEMAN, W.B. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. **American Journal of Pathology**. v. 183. p. 1113-1124, 2013.
95. RIZZOLO, P; SILVESTRI, V.; TOMMASI, S. Male breast cancer: Genetics, epigenetics, and ethical aspects. **Ann Oncol**. v.24. p. viii75- viii82, 2013.
96. RODRÍGUEZ, A. O.; LLACUACHAQUI, M.; PARDO, G. G.; et al. BRCA1 and BRCA2 mutations among ovarian cancer patients from Colombia. **Gynecol Oncol**. v. 124, p. 236-243. 2012.
97. ROY R, CHUN J, POWELL SN. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nat Rev Cancer**.v.12, p.68-78. 2011.
98. RUBINSTEIN, W. S.; Hereditary breast cancer in Jews. **Familial Cancer**. V. 3, p. 249-257. 2004.
99. RUDNICKA H, DEBNIAK T, CYBULSKI C, et al. Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Polish high risk breast and ovarian cancer families. **Mol Biol Rep**. v.40, p.6619-23. 2013.
100. RUISANCHEZ, N.; ALVAREZ, M.T.; MENENDEZ, I.; RAMIREZ, I. Alternativas preventivas em câncer de mama. **Rev Inst Nac de Cancerol (Mex)**. v.46. p.232-36, 2000.
101. SALMONM, S.E. **Farmacología Básica & Clínica**, Katzung, B.G., ed.; Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 1998, p. 629-655.
102. SAMPIERI, K; FODDE, R. Cancer stem cells and metastasis. **Seminars in Cancer Biology**. v. 22. p. 187-193, 2012.

103. SAN FILIPPO, J.; KLEIN, H. A. Mechanism of eukaryotic homologous recombination. **Rev Biochem.** V. 77, p. 229-57. 2008.
104. SCHAYEK, H.; DE MARCO, L.; STARINSKY-ELBAZ, S.; ROSSETTE, M.; LAITMAN, Y.; BASTOS-RODRIGUES, L.; DA SILVA FILHO, A. L.; FRIEDMAN, E. The rate of recurrent BRCA1, BRCA2, and TP53 mutations in the general population, and unselected ovarian cancer cases, in Belo Horizonte, Brazil. **Cancer Genet.** V. 209, p. 50-52. 2015.
105. SCHLACHER, K.; WU, H.; JASIN, M. A Distinct Replication Fork Protection Pathway Connects Fanconi Anemia Tumor Suppressors to RAD51-BRCA1/2 . **Cancer Cell.** v. 22, p.106–116. 2012.
106. SCHWARTZ RA, TORRE DP. The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect. **J Am Acad Dermatol.** V.33p.90- 104. 1995.
107. SCHOUTEN J.P, et al. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Nucleic Acids Research.** v. 30, 2002.
108. SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics 2012. **CA Cancer J. Clin.** v.62. p.10-29, 2012.
109. SNAW PH. The role of p53 in cell cycle regulation. **Pathol Res Pract** 1996;192:669-75.
110. SÖKMEN HM; INCE AT; BÖLÜKBAS C; KILIÇ G; DALAY R; KURDAS OÖ. A Peutz-Jeghers syndrome case with iron deficiency anemia and jejuno-jejunal invagination. **Turk J Gastroenterol.** v.14, p.78-82. 2003.
111. SOMOANO B, NIENDORF KB, TSAO H. Hereditary cancer syndromes of the skin. **Clin Dermatol.** V.23, p.85- 106. 2005.
112. STRUEWING, J. P.; HARTGE, P.; WACHOLDER, S.; BAKER, S. M.; BERLIN, M.; MCADAMS, M.; TIMMERMAN, M. M.; BRODY, L. C.; TUCKER, M. A. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. **N Engl J Med.** V. 336, p. 1401-1408. 1997.
113. STUCKI M, CLAPPERTON JA, MOHAMMAD D, et al. MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. **Cell.** v. 123, p.1213-26. 2005.
114. 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.
115. TEIXEIRA, L.A.; FONSECA, C.M.O. **De doença desconhecida a problema de saúde pública: o INCA e o controle do câncer no Brasil.** RJ: Ministério da Saúde. 2007.

116. THOMASSEN M, GERDES AM, CRUGER D, et al. Low frequency of large genomic rearrangements of BRCA1 and BRCA2 in Western Denmark. **Cancer Genet Cytogenet.** v.168, p.168-71. 2006
117. TONIN, P.; WEBER, B.; OFFIT, K.; COUCH, F.; REBBECK, T. R.; NEUHAUSEN, S.; GODWIN, A. K.; DALY, M.; WAGNER-COSTALOS, J.; BERMAN, D.; GRANA G.; FOX, E.; KANE, M. F.; KOLODNER, R. D.; KRAINER, M.; HABER, D. A.; STRUEWING, J. P.; WARNER, E.; ROSEN, B.; LERMAN, C.; PESHKIN, B.; NORTON, L.; SEROVA, O.; FOULKES, W. D.; GARBER, J. E.; et al. **Nat Med.** V. 2, p. 1179-1183. 1996.
118. URBAN, L.A.B.D.; CHALA, L.F.; BAUAB, S.P.; et al. Recomendações do Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem, da Sociedade Brasileira de Mastologia e da Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia para o rastreamento do câncer de mama. **Radiol Bras.** v.50. 2017
119. VENCKEN PM, KRIEGE M, HOOGWERF D, BEUGELINK S, VAN DER BURG ME, HOONING MJ, et al. Chemosensitivity and outcome of *BRCA*- and *BRCA2*-associated ovarian cancer patients after first-line chemotherapy compared with sporadic ovarian cancer patients. **Ann Oncol.** v. 22, p.1346–52. 2011.
120. VILLARREAL-GARZA, C.; ALVAREZ-GÓMEZ, R. M.; PÉREZ-PLASENCIA, C.; et al. Significant clinical impact of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexico. **Cancer.** v. 121, p. 372-378. 2015.
121. WANG H, WANG M, WANG H, et al. Complex H2AX phosphorylation patterns by multiple kinases including ATM and DNA-PK in human cells exposed to ionizing radiation and treated with kinase inhibitors. **J Cell Physiol.** v.202, p.492-502. 2005.
122. WEITZEL JN, CLAGUE J, MARTIR-NEGRON A, OGAZ R, HERZOG J, RICKER C, et al. Prevalence and type of BRCA mutations in Hispanics undergoing genetic cancer risk assessment in the southwestern United States: a report from the Clinical Cancer Genetics Community Research Network. **J Clin Oncol.** v.31, p.210-6. 2013.
123. WOOD ME, KADLUBEK P, PHAM TH, WOLLINS DS, LU KH, WEITZEL JN, et al. Quality of cancer family history and referral for genetic counseling and testing among oncology practices: a pilot test of quality measures as part of the American Society of Clinical Oncology Quality Oncology Practice Initiative. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.** v.32, p.824–9. 2014.
124. WOOSTER R, BIGNELL G, LANCASTER J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature.** v.378, p.789-92. 1995.
125. YOSHIDA K, MIKI Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. **Cancer Sci.**v.95, p.866- 71. 2004.

ZHANG, J.; FACKENTHAL, J. D.; ZHENG, Y.; et al. Recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients of African ancestry. **Breast Cancer Res treat.** V. 134, p. 889-894. 2012.

Anexo 1 – Comprovante de Submissão

Manuscript submitted - CGE-00204-2018  Entrada x

 **Clinical Genetics** <onbehalf@manuscriptcentral.com> 2 de mar ☆  

para mim, paulabiomedici., gamba.bf, gamba_sp, thaisbteixeira, carlosgynufg, silveiralacerda, elacerta ▾

 inglês ▾ > português ▾ [Traduzir mensagem](#) [Desativar para: inglês](#) x

Dear Authors:

Thank you for submitting your manuscript entitled "First analysis of gene rearrangements in BRCA1 and BRCA2 of the Brazil-Central" for review. For internal purposes, we have assigned it the internal reference number CGE-00204-2018. Please refer to this number in any future correspondence you may send regarding this submission.

Authors are requested to send a list of at least four names of potential reviewers, including their email addresses. If you have not already done so, please email the editorial office with this information at your earliest convenience.

Finally, if you like to publish your figures in colour, please post/courier the original colourworks form to our Customer Services office at the address below. The form can be accessed at [http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/\(ISSN\)1399-0004/asset/homepages/CGE_CWA.pdf?v=1&s=4d96451cfd95e8afb360c62f4d5cd67f0fe388cf&isAguDoi=false](http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/(ISSN)1399-0004/asset/homepages/CGE_CWA.pdf?v=1&s=4d96451cfd95e8afb360c62f4d5cd67f0fe388cf&isAguDoi=false)

Customer Services (OPI)
John Wiley & Sons Ltd,
European Distribution Centre
New Era Estate
Oldlands Way
Bognor Regis
West Sussex
PO22 9NQ

We will get back to you shortly with our review of the manuscript.

Yours sincerely,

Prof. Reiner A. Veitia, Ph.D., M.A.E
Editor-In-Chief
Clinical Genetics

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise molecular de mutações nos genes BRCA1/2 e TP53 em pacientes com carcinoma de mama atendidos pelo SUS.

Pesquisador: Elisângela de Paula Silveira Lacerda

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniente com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Versão: 3

CAAE: 50626315.6.0000.5078

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO
FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.791.010

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Anexo 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).



Serviço Público Federal
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Meu nome é Aliny Pereira de Lima sou Bióloga e pesquisadora responsável e minha área de atuação é Biologia Molecular.

Após ler com atenção este documento e ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine em todas as folhas e ao final deste documento, que está em duas vias e também será assinado por mim, pesquisador, em todas as folhas, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis, **Profa. Dra Elisângela de Paula Silveira Lacerda e Dra Aliny Pereira de Lima** nos telefones: 3521-1481; 8229-8040, que poderá ser feito ligações à cobrar. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: 3269-8338 e 3269-8426 ou no endereço: 1ª Avenida S/Nº Setor Leste Universitário, Unidade de Pesquisa Clínica, 2º andar. Horário de funcionamento: 2ª a 6ª das 7:00 às 17:00hs.

ANÁLISE MOLECULAR DE MUTAÇÕES NOS GENES *BRC41/2* E *TP53* EM PACIENTES COM CARCINOMA DE MAMA ATENDIDOS PELO SUS

Pesquisadora Aliny Pereira de Lima : _____

Rubrica do participante da pesquisa : _____

TCLE – Pág. NR. 1



Serviço Público Federal
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

INFORMAÇÕES IMPORTANTES QUE VOCÊ PRECISA SABER SOBRE A PESQUISA:

Título: Análise molecular de mutações nos genes *BRCA1/2* e *TP53* em pacientes com carcinoma de mama atendidos pelo SUS

Informações sobre quem está aplicando o termo de consentimento: Aliny Pereira de Lima, Bióloga e aluna de Pós-Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Objetivo da pesquisa: O objetivo principal desta pesquisa é analisar as alterações nos genes *BRCA1/2* e *TP53* que estão associados ao câncer de mama hereditário e após o resultado do diagnóstico genético, daremos as orientações necessárias para que você possa tomar as decisões necessárias para um melhor tratamento da doença.

Porque você está sendo convidado a participar desta pesquisa: A incidência crescente do câncer de mama torna importante os esforços no sentido de se identificar elementos que possam aumentar a compreensão do comportamento biológico desta neoplasia e identificar pacientes com alto risco para desenvolvimento do câncer hereditário. No Brasil ainda temos poucas informações sobre quais são as mutações mais frequentes em nossas pacientes e com a realização do seu teste genético poderíamos conseguir informações necessárias para um melhor tratamento da doença.

Procedimento: Após a concordância desse Termo de consentimento, será realizada uma coleta de aproximadamente 5 mL de sangue total em tubo à vácuo com EDTA no momento em que você vier para a consulta de rotina no ambulatório de mastologia no HC e este sangue será encaminhado ao Laboratório de Genética Molecular e Citogenética (LGMC) da UFG. Após coletado seu sangue, será extraído o DNA, que é um componente do núcleo das células no qual ficam armazenadas as informações que

ANÁLISE MOLECULAR DE MUTAÇÕES NOS GENES *BRCA1/2* E *TP53* EM PACIENTES COM CARCINOMA DE MAMA ATENDIDOS PELO SUS

Pesquisadora Aliny Pereira de Lima :

Rubrica do participante da pesquisa :

TCLE – Pág. NR. 1



Serviço Público Federal
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

determinam as características de uma pessoa. Neste caso, após extraído o DNA, serão feitos estudos detalhados de laboratório para identificar possíveis alterações nos genes *BRCA1/2* e *TP53* responsáveis por 5 a 10% dos cânceres de mama hereditário. As amostras coletadas serão mantidas armazenadas em freezer -80°C no Laboratório de Genética Molecular e Citogenética durante o período de realização da pesquisa e, ao término deste período as mesmas serão incineradas.

Forma de acompanhamento: Você será convidado a participar do estudo para a coleta de dados e uma única coleta sanguínea. Ao final do projeto você será convidado a receber informações sobre os resultados de seu estudo.

Especificação dos riscos, prejuízos, desconforto, lesões que podem ser provocados pela pesquisa: Os riscos associados com a coleta de sangue incluem dor, hematoma, ou outro desconforto no local da coleta. Raramente desmaio ou infecções no local de punção podem ocorrer. Em caso de ocorrer alguma alteração descrita acima, você será orientado pelo profissional da coleta do sangue ou conduzido ao atendimento médico mais próximo conduzido(a) pela pesquisadora até a unidade de saúde mais próxima. Quanto os resultados dos exames estiverem prontos, você será convidado para ir até o HC para receber seus resultados. Você somente receberá os resultados caso positivo se realmente você manifestar interesse e desejo em saber a sua pré-disposição genética para o câncer de mama. Caso contrário, seu resultado será guardado até o momento em que você achar que estará pronto para recebê-lo, pois existem riscos psicológicos e emocionais para resultados positivos. Caso ocorrer, você receberá assistência psicológica da nossa equipe além de uma consulta junto ao um aconselhador genético capacitado por nossa equipe.

Informação sobre o direito de pleitear indenização em caso de danos decorrentes de sua participação na pesquisa: EM CASO DE DANOS DECORRENTES DESTA PESQUISA, VOCÊ TEM O DIREITO DE PLEITEAR INDENIZAÇÃO

ANÁLISE MOLECULAR DE MUTAÇÕES NOS GENES *BRCA1/2* E *TP53* EM PACIENTES COM CARCINOMA DE MAMA ATENDIDOS PELO SUS

Pesquisadora Aliny Pereira de Lima :



Serviço Público Federal
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Informação sobre o direito de ressarcimento de despesas pela sua participação: Em caso de despesas de locomoção, alimentação devido às atividades da pesquisa, você terá o direito de ressarcimento de despesas. A pesquisadora te abordará antes ou após sua consulta na referida unidade, não sendo necessária a sua vinda, "apenas para coleta de material sanguíneo".

Esclarecer que não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela sua participação: Você não será obrigado a participar da mesma, sendo sua participação de livre e espontânea vontade. Além disso, você não será gratificado financeiramente pela sua participação.

Descrever os benefícios decorrentes da participação na pesquisa: Espera-se com este estudo proporcionar a você informações sobre o seu perfil genético em relação aos genes em estudo, no qual informações sobre o câncer de mama hereditário, sua forma de herança, estratégias preventivas e de redução de risco, assim como as chances de recorrência para outros familiares serão discutidas e avaliadas.

Detalhar intervenções, tratamento, métodos alternativos existentes: A triagem de mutações nos genes supressores de tumor *BRCA1/2* e *TP53* é de grande importância para a prevenção e detecção precoce do câncer de mama e ovário além de permitir identificar familiares de elevado risco para o desenvolvimento de câncer. Quando uma mutação é identificada, o risco para o câncer pode ser reduzida através intervenções preventivas cirurgias que poderão prevenir o câncer e tratamento com medicamentos já conhecidos no mercado. No caso das intervenções preventivas, a retirada das duas mamas é a intervenção de maior redução de risco de câncer de mama em mulheres portadoras de mutação nos genes *BRCA1/BRCA2* (redução de até 90% do risco). Entre as opções não cirúrgicas destacam-se o tratamento com medicamentos. Dependendo do tipo de câncer de mama que você for diagnosticado, as intervenções poderão ser diferentes.

Esclarecimento sobre o período de participação do participante na pesquisa e término de sua participação: Você será submetido uma única coleta de sangue. Posteriormente, ao final do estudo, você terá um retorno, onde os pesquisadores

ANÁLISE MOLECULAR DE MUTAÇÕES NOS GENES *BRCA1/2* E *TP53* EM PACIENTES COM CARCINOMA DE MAMA ATENDIDOS PELO SUS

Pesquisadora Aliny Pereira de Lima :

Rubrica do participante da pesquisa :

T010-004-001



Serviço Público Federal
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

responsáveis apresentarão com uma consulta, todo o resultado final da pesquisa, como uma forma de “esclarecimento a você”. A participante ou seu representante legal, podem ainda, a qualquer tempo e sem qualquer prejuízo, retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no biorrepositório do estudo, tendo direito a devolução das amostras biológicas. A desistência será válida a partir da data de formalização, por escrito e assinada.

Garantir o sigilo: Este estudo garante a confidencialidade das informações geradas e a sua privacidade, conforme normas da Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, onde garante que a sua identidade e seus dados e/ou resultados não serão revelados. Os dados obtidos durante o estudo, incluindo as informações obtidas dos prontuários dos participantes, serão anonimizados/codificados imediatamente após a obtenção dos mesmos.

Apresentar a garantia expressa de liberdade de não aceitação, bem como de retirar o consentimento, sem qualquer prejuízo da continuidade do acompanhamento/tratamento usual: A participante ou seu responsável poderá ter acesso aos seus dados genéticos, assim como terá o direito de retirá-los de bancos onde se encontrem armazenados, a qualquer momento. Sua participação é de caráter voluntário e este consentimento poderá ser retirado a qualquer momento, sem causar prejuízos a você.

Caro participante voluntário, seu material coletado será utilizado apenas para esta pesquisa e não será armazenado para estudos futuros. Ao término desta pesquisa as amostras serão incineradas.

Nome e assinatura do pesquisador:

ANÁLISE MOLECULAR DE MUTAÇÕES NOS GENES *BRCA1/2* E *TP53* EM PACIENTES COM CARCINOMA DE MAMA ATENDIDOS PELO SUS

Pesquisadora Aliny Pereira de Lima :

Rubrica do participante da pesquisa :



Serviço Público Federal
Universidade Federal de Goiás
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO PARTICIPANTE DA PESQUISA

Eu, _____,

“RG _____, CPF _____, N° de prontuário _____, abaixo assinado, concordo em participar deste estudo como participante voluntário “Análise molecular de mutações nos genes *BRCA1/2* e *TP53* em pacientes com carcinoma de mama atendidos pelo SUS” sob a responsabilidade da Dr^a. Elisângela de Paula Silveira Lacerda. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora e bióloga Aliny Pereira de Lima sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/ tratamento.

Local e data: _____

Nome e assinatura do participante ou responsável: _____

Assinatura Dactiloscópica: _____

Nome e assinatura do pesquisador responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite do participante em fazer parte da pesquisa.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____

ANÁLISE MOLECULAR DE MUTAÇÕES NOS GENES *BRCA1/2* E *TP53* EM PACIENTES COM CARCINOMA DE MAMA ATENDIDOS PELO SUS

Pesquisadora Aliny Pereira de Lima : _____

Rubrica do participante da pesquisa : _____

Anexo 4 – Questionário

Questionário

Nome:

Nome da mãe:

Nº Prontuário:

Data Nascimento: _____

CPF: _____

Cidade e UF: _____

Data: _____

1) Ascendência do paciente:

Lado materno:

☐ Judeu Ashkenazi

☐ Outros: _____

Lado paterno:

☐ Judeu Ashkenazi

☐ Outros: _____

2) Histórico de Câncer do Paciente:

a) Com qual/quais idade(s) você teve câncer e que tipo?

☐ sim.

☐ não

b) Há, entre seus familiares próximos (pais, irmãos, filhos, avós, primos e tios (as)), algum caso de:

• Câncer de mama? Se sim com qual idade?

☐ sim.

Familiar 1 _____

Familiar 2 _____

Familiar 3 _____

() não

• Câncer de ovário? Se sim, com qual idade?

() sim

Familiar 1 _____

Familiar 2 _____

Familiar 3 _____

() não

• Outros tipos de cânceres? Se sim com qual idade e que tipo?

() sim

Familiar 1 _____

Familiar 2 _____

Familiar 3 _____

() não

c) Há, entre seus familiares próximos (pais, irmãos, filhos, avós e tios (as)), 3 ou mais casos de câncer antes dos 50 anos de idade?

() sim () não

4) Você ou algum membro de sua família já fez testes genéticos para risco de câncer hereditário?

() Sim () Não

Se fez, qual foi? obtenha cópias dos resultados de exames de parentes

5) Anatomopatológico

- ☐ CDI
- ☐ CDIns
- ☐ Lobular
- ☐ Papiliforme
- ☐ outros

6) Imuno-histoquímica

- ☐ RE +
- ☐ RP +
- ☐ HER 2 +

7) Houve Recidivas?

- ☐ Sim
- ☐ Não

8) Qual o Tratamento utilizado?

9) Houve troca de tratamento? Por qual motivo?

- ☐ Sim

- ☐ Não

10) Quais efeitos colaterais foram observados durante o tratamento?

Anexo 5 – sondas presentes no kit *BRCA1*

BRCA1 probes arranged according to chromosomal location

Length (nt)	SALSA MLPA probe	BRCA1 exon	Ligation site NM_007294.2	Partial sequence (20 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
		<i>Start codon</i>	<i>201-204</i>		
148	0763-L0268	exon 1A	160-159 Rev.	CAGAGGGTGA-AGGCCTCCTG	0.3 Kb
157±	0764-L0269	exon 1B	3672-3673	GGGGCACTGA-GTGTCCGTGG	1.0 Kb
166	0765-L0270	exon 2	216-217	TTTATCTGCTC-TTCGCGTTGA	8.3 Kb
175	0826-L0341	exon 3	303-304	AAGGAACCTG-TCTCCACAAA	9.3 Kb
184	0767-L0272	exon 5	361-362	TTCTCAACCA-GAAGAAAGGG	1.6 Kb
208	0827-L0342	exon 6	441-442	AGATTTAGTC-AACTTGTTGA	0.8 Kb
217	0769-L0274	exon 7	605-606	CCGTGCCAAA-AGACTTCTAC	4.4 Kb
226	1004-L0569	exon 8	686-687	TGGAAGTGTG-AGAAGCTCTGA	2.6 Kb
235	1005-L0581	exon 9	781-782	TTAATAAGGC-AACTTATTGC	1.3 Kb
244	0772-L0277	exon 10	821-822	GTTACAAATC-ACCCCTCAAG	1.2 Kb
268	0830-L0345	exon 11	962-963	GCGTGCAGCT-GAGAGGCATC	2.8 Kb
277	0774-L0279	exon 11	3778-3779	CTAGCCCTTT-CACCCATACA	1.0 Kb
286	0775-L0280	exon 12	4345-4346	CTGAAGACTG-CTCAGGGCTA	8.5 Kb
295	2603-L2074	exon 13	4441-4442	TGGCTGAAGT-AGAAGCTGTG	5.9 Kb
304	0833-L0349	exon 14	4616-4617	AGAAGGCCTT-TCTGCTGACA	2.1 Kb
328	0778-L0347	exon 15	4750-4751	CTGGGAGTCT-TCAGAATAGA	3.2 Kb
337	0779-L0003	exon 16	4906-4907	CTGGAATCAG-CCTCTTCTCT	3.5 Kb
346	0780-L0283	exon 17	5214-5215	GCCAGAAAAC-ACCACATCAC	3.7 Kb
355	0781-L0284	exon 18	5294-5295	TGTGTGTGAA-CGGACACTGA	0.6 Kb
364	0782-L0285	exon 19	5369-5370	CCAGTCTATT-AAAGAAAGAA	6.3 Kb
388	0783-L0356	exon 20	5430-5431	GTCAATGGAA-GAAACCACCA	6.0 Kb
397	0784-L0287	exon 21	5504-5505	AATCTGTTGC-TATGGGCCCT	1.9 Kb
406	0785-L0288	exon 22	5578-5579	CTGTGGTGAA-GGAGCTTTCA	1.5 Kb
415	0786-L0289	exon 23	5622-5623	CACCCAATTG-TGGTTGTGCA	2.0 Kb
		<i>Stop codon</i>	<i>5790-5792</i>		
424	2831-L2260	exon 24	6242-6243	AATGGAAGGA-GAGTGCTTGG	

Anexo 6 – Sondas presentes no Kit *BRCA2*

Table 2. *BRCA2* probes arranged according to chromosomal location

Length (nt)	SALSA MLPA probe	BRCA2 exon	Ligation site NM_000059.3	Partial sequence (20 nt adjacent to ligation site)	Distance to next probe
160	02143-L09586	FRY gene		CCCAGAGTTA-CCGAGTCCTC	20.1 kb
	<i>Start codon</i>		<i>228-230 (exon 2)</i>		
137	02283-L12281	Exon 1	Promoter region	GCGCGGGCTT-GTGGCGCGAG	0.2 kb
148	02285-L01776	Exon 1	Promoter region	GTAGTGGGTT-GGGACGAGCG	0.8 kb
166	02486-L01985	Exon 2	271-270 reverse	CGTGTCTTAA-AAATTTCAAA	2.8 kb
178	01599-L10642	Exon 3	472-473	TAATATTCAA-AGAGCAAGGG	0.2 kb
172 ∞	08898-L09587	Exon 3	108 nt after exon 3	GGGCAAATCA-GTCTCTCTGG	5.7 kb
197	01600-L04671	Exon 4	569-570	TAGTAGACAT-AAAAGTCTTC	1.0 kb
310 ∞	09809-L10257	Exon 5	688-689	TAACACCACA-AAGAGATAAG	0.1 kb
346	04585-L03983	Exon 6	728-727 reverse	AACTTTGGT-GTATGAAACA	0.3 kb
202	08265-L08128	Exon 7	812-813	GTCTTGGTCA-AGTTCTTTAG	2.6 kb
220	01602-L01184	Exon 8	264 nt before exon 8	TGACTTTCCA-CTCATTGTG	1.8 kb
229	01603-L01185	Exon 9	1001-1002	CACAAATCAA-AGAGAAGCTG	1.6 kb
247	01604-L01186	Exon 10	1374-1375	AGTGACAAAA-TCTCCAAGGA	3.7 kb
256 °	02279-L01770	Exon 11	2192-2193	TGAAGAACCA-ACTTTGTCT	4.8 kb
274	01606-L01188	Exon 11	6992-6993	TCTTTTACA-TGTCCGAAA	3.3 kb
283	01607-L01189	Exon 12	183 nt before exon 12	ACAGAACAAA-AATGTAATTG	2.5 kb
301	02280-L01771	Exon 13	7216-7215 reverse	ACACAGGTAA-TCGGCTCTAA	8.2 kb
154	09297-L08066	Exon 14	7394-7395	TGCTACAAGA-AATGAAAAAA	1.5 kb
326	01610-L01192	Exon 15	7762-7763	GTCTGTATCT-TGCAAAAACA	1.3 kb
337	01611-L01193	Exon 16	7975-7976	AGTTGGCTGA-TGGTGGATGG	4.8 kb
355	02281-L01772	Exon 17	8158-8157 reverse	AGGCATCTAT-TAGCAAATTC	0.8 kb
364~	01613-L01195	Exon 18	8482-8483	AGAAGATTAT-TCTTCATGGAG	7.0 kb
382	01614-L01196	Exon 19	8602-8603	ATACCAAAT-TGGATTCTTT	0.5 kb
391	08266-L08129	Exon 20	8743-8744	CTGGATTATA-CATATTTCGC	5.7 kb
409	02069-L01970	Exon 21	8909-8910	AAGACAGCAA-GTTCGTGCTT	2.7 kb
418	01617-L01199	Exon 22	9100-9101	CTGAACAAAA-GGAACAAGGT	0.3 kb
191	09812-L10643	Exon 23	9214-9215	CATCAGATTT-ATATTCTCTG	0.3 kb
436	08267-L08130	Exon 24	9455-9454 reverse	AACGACAAAT-OCTATTAGGT	14.8 kb
445	08268-L08131	Exon 25	9706-9707	AGACATTCAA-CAAATGAAA	2.0 kb
463	11984-L15346	Exon 26	9786-9787	CTGCATGCAA-ATGATCCCAA	1.3 kb
476 ±	09293-L15678	Exon 27	9988-9989	AGTCTTGTA-AGGGGAGAAA	0.6 kb
319 ±	09296-L11090	Exon 27	10638-10639	CGGGCAAAAA-TCGTTTGCC	8.4 kb
	<i>Stop codon</i>		<i>10482-10484</i>		
454	02144-L01619	N4BP2L1 (CG018) gene		TTATTATTGA-TAATACCAAC	