

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa**

**TESE DE DOUTORADO**

**IDENTIFICAÇÃO DE REARRANJOS NOS GENES *BRCA1* E *BRCA2* EM  
MULHERES COM CRITÉRIOS PARA SÍNDROME HEREDITÁRIA DE  
CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO NO ESTADO DA BAHIA**

**JULIANA CÔRTEZ DE FREITAS**

**Salvador - Bahia  
2019**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa**

**IDENTIFICAÇÃO DE REARRANJOS NOS GENES *BRCA1* E *BRCA2* EM  
MULHERES COM CRITÉRIOS PARA SÍNDROME HEREDITÁRIA DE  
CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO NO ESTADO DA BAHIA**

**JULIANA CÔRTEZ DE FREITAS**

Orientadora: Dra. Kiyoko Abe-Sandes

Coorientadora: Dra. Taisa Manuela Bonfim Machado Lopes

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Doutor.

**Salvador - Bahia  
2019**

IDENTIFICAÇÃO DE REARRANJOS NOS GENES *BRCA1* E *BRCA2* EM  
MULHERES COM CRITÉRIOS PARA SÍNDROME HEREDITÁRIA DE CÂNCER  
DE MAMA E OVÁRIO NO ESTADO DA BAHIA

**JULIANA CÔRTEZ DE FREITAS**

COMISSÃO EXAMINADORA



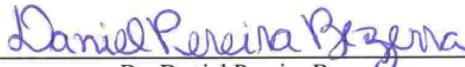
---

Dra. Renata Lucia Leite Ferreira Lima  
Professor Adjunto  
UFBA



---

Dra. Karine Araújo Damasceno  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



---

Dr. Daniel Pereira Bezerra  
Professor Adjunto  
UFBA

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

SESAB

UFBA

UNEB

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais, Luiz Arthur e Marli, pelo incentivo fundamental na minha educação e na minha formação como ser humano que me permitiu caminhar com os próprios passos;*

*À minha sementinha, metade dos meus cromossomos, minha filha, Marina, que chegou durante essa jornada, enchendo de luz a minha vida. Você deu sentido a tudo isso;*

*À meu esposo, Jadison, que sempre apoiou meus passos, me dando força quando eu achei que não ia conseguir;*

*À minha orientadora, Dra. Kiyoko Abe-Sandes pela confiança, sabedoria, amizade e por seu comprometimento profissional;*

*À minha co-orientadora, Dra. Taisa Machado “Mestre dos Magos”, que a toda hora, em qualquer tempo colaborou para a execução deste trabalho e a seu modo provocou ainda mais minha vontade de fazer ciência;*

*À Dra. Ivana Nascimento pela troca de conhecimento, relação de amizade e todo apoio na pesquisa;*

*Ao Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia pelo suporte neste estudo;*

*Ao Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, pelo apoio institucional e acadêmico;*

*Às amigas que ganhei nesse caminho: Polyanna Carôzo, Gabriela Felix, Gabrielle Manzoli, Paula Brito e Taise Lima;*

*À Dra. Thais Bomfim, pelo auxílio técnico-científico e certeza de grandes histórias;*

*À Selma São Bernardo e Aidil Garcez pelo apoio e cordialidade;*

*Aos amigos do Anexo III essenciais para os momentos mais lúdicos dessa jornada*

*Aos colegas da turma 2014.2 e ao corpo docente do PGBSMI por todas as trocas de experiência e conhecimento;*

*À Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna pelo suporte científico e correções da tese;*

*À toda minha “Árvore genealógica” pela vivacidade, alegria e por serem base da minha caminhada;*

*Aos amigos que compreenderam minhas ausências e estimaram minha vitória.*

*Aos pacientes, sem eles, nada disso seria possível.*

*Dedico aos meus pais, Luiz Arthur (in memorian) e Marli  
À minha filha, Marina*

*“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos”*

Friedrich Nietzsche

FREITAS, Juliana Côrtes. Identificação de rearranjos nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em mulheres com critérios para síndrome hereditária de câncer de mama e ovário no estado da Bahia. 100 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** Entre 5% a 10% dos casos de câncer de mama e ovário são de origem hereditária e estão associadas à presença de mutações germinativas em genes de predisposição, entre os quais se destacam *BRCA1* e *BRCA2*. Mutações pontuais nestes genes são mais comuns, no entanto, alterações estruturais provocados por rearranjos genômicos podem explicar a ocorrência de casos de HBOC (*Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome*) nos quais mutações não são detectadas por métodos convencionais, e portanto, não devem ser negligenciadas. **OBJETIVO:** Verificar a frequência de rearranjos genômicos em *BRCA1* e *BRCA2* em uma amostra de pacientes que atendam aos critérios de inclusão baseados nas diretrizes da NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) e ASCO (*American Society of Clinical Oncology*). **METODOLOGIA:** Foram selecionados 292 pacientes atendidos no Ambulatório de Oncogenética do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, considerados elegíveis para triagem de rearranjos genômicos por meio da técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) entre 2008 e 2017. Além disso, a amostra foi caracterizada quanto aos dados clínicos, a história individual e/ou familiar de risco para câncer e ancestralidade. **RESULTADOS:** Os rearranjos genômicos, deleção dos exons 16-17 de *BRCA1*, duplicação do exon 5 de *BRCA1*, deleção dos exons 1-2 de *BRCA1* e duplicação do exon 21 do *BRCA2* foram encontradas em sete pacientes com diagnóstico de câncer de mama e/ou ovário com história pessoal e familiar de câncer sugestivo de HBOC. Os rearranjos del exons 16-17 e del exons 1-2 de *BRCA1* já foram descritos na literatura como patogênicas. As outras mutações ainda não estão descritas, e estudos para determinação do efeito clínico e a caracterização molecular serão necessários. A frequência de rearranjos observada neste estudo foi de 2,4% e está de acordo com a frequência de outros estudos realizados no Brasil. Embora essa população tenha uma contribuição portuguesa relevante, a mutação fundadora portuguesa c.156\_157insAlu em *BRCA2* não foi encontrada. **CONCLUSÕES:** A recomendação de testes genéticos abrangentes para triagem de pequenas mutações, bem como de rearranjos genômicos em *BRCA* pode proporcionar um melhor desfecho nos prognósticos dos pacientes.

**Palavras chave:** *BRCA1*. *BRCA2*. Grandes rearranjos. HBOC.

FREITAS, Juliana Côrtes. Identification of *BRCA1* and *BRCA2* gene rearrangements in women with criteria for Hereditary breast and ovarian cancer syndrome in the state of Bahia 100 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Between 5% and 10% of cases of breast and ovary cancer are inherited and are associated with the presence of germline mutations in predisposing genes, among which *BRCA1* and *BRCA2*. Point mutations in these genes are more common, however, structural alterations caused by genomic rearrangements may explain the occurrence of HBOC (Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome) in which mutations are not detected by conventional methods, and therefore should not be neglected. **OBJECTIVE:** To verify the frequency of genomic rearrangements in *BRCA1* and *BRCA2* in a sample of patients meeting the inclusion criteria based on NCCN (National Comprehensive Cancer Network) and ASCO (American Society of Clinical Oncology) guidelines. **METHODOLOGY:** A total of 292 patients attended at the Oncogenetic Outpatient Clinic of the Health Sciences Institute of the Federal University of Bahia were selected as eligible for screening for genomic rearrangements using the MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) technique between 2008 and 2018. In addition, the sample was characterized in terms of clinical data, individual and / or family history of cancer risk and ancestry. **RESULTS:** Genomic rearrangements, deletion of *BRCA1* exons 16-17, duplication of *BRCA1* exon 5, deletion of *BRCA1* exons 1-2, and duplication of *BRCA2* exon 21 were found in seven patients diagnosed with breast cancer and / or ovary with a personal and family history of cancer suggestive of HBOC. The rearrangements of exons 16-17 and exons 1-2 of *BRCA1* have already been described in the literature as pathogenic. The other mutations are not yet described, and studies for clinical effect determination and molecular characterization will be required. The frequency of rearrangements observed in this study was 2.4% and is in agreement with the frequency of other studies carried out in Brazil. Although this population has a relevant Portuguese contribution, the founding mutation c.156\_157insAlu in *BRCA2* was not found. **CONCLUSIONS:** The recommendation of comprehensive genetic testing for small mutation screening as well as genomic rearrangements in *BRCA* may provide a better outcome in patient's prognoses.

Keywords: *BRCA1*. *BRCA2*. Large rearrangements. HBOC

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Comparação entre os mecanismos de NARH, NHEJ e FoSTeS na origem de deleções e duplicações. 24
- Figura 1.** Distribuição dos rearranjos genômicos identificados em *BRCA1* e *BRCA2* em 7 pacientes. 49
- Figura 2.** Principais tipos de elementos de transposição de acordo com a sua movimentação no genoma. 27
- Figura 2.** Genealogia dos casos identificados com rearranjos genômicos em *BRCA1* e *BRCA2* 52
- Figura 3.** Etapas referentes a reação de MLPA 37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Características clínicas associadas a HBOC	20
<b>Tabela 1.</b>	Dados clínico-epidemiológicos da amostra analisada	48
<b>Tabela 2.</b>	Características dos indivíduos com rearranjos genômicos em <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	50
<b>Tabela 3.</b>	Tipo de câncer e características do tumor em pacientes LGR positivos	51
<b>Tabela suplem. 1</b>	Características de pacientes diagnosticados com mutações pontuais	67

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1	CÂNCER DE MAMA.....	16
2.2	CÂNCER DE OVÁRIO.....	18
2.3	SÍNDROME HEREDITÁRIA DE CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO (HBOC).....	19
2.4	ORIGEM DOS REARRANJOS GENÔMICOS.....	22
2.4.1	<i>Elementos de Transposição</i> .....	27
2.5	GRANDES REARRANJOS GENÔMICOS EM <i>BRCA1</i> E <i>BRCA2</i> .....	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	32
3.1	GERAL.....	32
3.2	ESPECÍFICOS.....	32
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	33
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	33
4.1.1	<i>Aspectos éticos</i> .....	33
4.1.2	<i>Etapas do atendimento</i> .....	33
4.1.3	<i>Critérios de inclusão e exclusão</i> .....	34
4.2	ANÁLISES LABORATORIAIS.....	36
4.2.1	<i>Extração de DNA genômico</i> .....	36
4.2.2	<i>Amplificação Dependente da Ligação de Múltiplas Sondas (MLPA)</i> .....	37
4.2.3	<i>Deteção da mutação c.156_157insAlu de BRCA2</i> .....	38
4.2.4	<i>Análises estatísticas</i> .....	38
<b>5</b>	<b>ARTIGO ORIGINAL</b> .....	40
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	72
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74
	<b>ANEXO A</b> .....	90
	<b>APÊNDICE A</b> .....	91
	<b>APÊNDICE B</b> .....	94
	<b>ANEXO B</b> .....	96

## 1 INTRODUÇÃO

O termo câncer identifica uma variedade de doenças genéticas complexas caracterizadas pelo crescimento descontrolado das células em um determinado tecido (LICHTENSTEIN, 2017). O desenvolvimento da doença é dependente de alterações genéticas como também de interações entre as células malignas e o microambiente tumoral (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Essencialmente alterações genéticas e mudanças fisiológicas na célula são fundamentais para que a doença se manifeste, algumas delas modificam a fisiologia celular e possibilitam o crescimento tumoral, tais como: proliferação autônoma, insensibilidade a sinais de supressão tumoral, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, evasão de mecanismos de defesa imune, manutenção da angiogênese, invasão tecidual e metástase. Destacam-se ainda, variações metabólicas adaptativas e instabilidade genômica (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Logo, a identificação das alterações que induzem o processo de malignização e quais delas são consequências desse processo, é crítica para delineamento de estratégias de controle e prevenção da doença (FERNANDES et al., 2016; HOFF, 2013, RIAHI et al., 2017).

Entre as neoplasias malignas que apresentam altas taxas de prevalência no mundo está o carcinoma de mama. É o tipo mais comum entre a população feminina e de forma rara (cerca de 1%), homens também podem ser acometidos (INCA, 2018). Cerca de 75-80% dos casos de câncer de mama são do tipo esporádico, onde geralmente não se observa agregação de casos de câncer entre os familiares, nem padrão de herança definido, enquanto uma menor parcela, cerca de 20-25%, são do tipo familiar e/ou hereditário (PAL, 2014). Outro câncer que acomete mulheres é o câncer de ovário, representando 30% de todos os cânceres ginecológicos. Dados mostram que essa é a neoplasia maligna epitelial mais comum do trato genital feminino, somando cerca de 6% das neoplasias malignas em mulheres, no Brasil é o quinto em ordem de incidência (INCA, 2018).

Estima-se que 5% a 10% de todos os casos de câncer de mama e 10% a 15% dos cânceres de ovário são causados por mutações germinativas em genes com

padrão de herança autossômica dominante, de alta penetrância (EWALD, 2016; KING, 2003; NORQUIST, 2015; WALSH, 2006). Dentre estes, destacam-se os genes supressores tumorais *BRCA1* (MIKI, et al., 1994) e *BRCA2* (WOOSTER, et al., 1995) que foram relacionados à síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC).

A maioria dos estudos populacionais para triagem de mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, utilizando sequenciamento convencional e NGS (sequenciamento de nova geração), são eficientes para identificar variantes nucleotídicas (mutações pontuais) e pequenas inserções ou deleções, mas nem sempre conseguem identificar grandes rearranjos genômicos, com isso o conhecimento do espectro das variantes pontuais e de pequenas inserções ou deleções vem sendo constantemente ampliado. Contudo, a detecção de um menor número de mutações ocasionadas por grandes rearranjos genômicos, ainda é escasso.

Grandes rearranjos genômicos são alterações maiores como deleções ou adições em um ou mais exons que interferem na expressão dos genes e devido a sua extensão apresentam grande potencial de patogenicidade (JUDKINS, 2012). Rearranjos genômicos não são detectados por técnicas convencionais de sequenciamento, requerendo tecnologias alternativas como MLPA (Amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação), PCR quantitativo ou hibridização genômica comparativa (SHANNON, 2011).

A realização de triagem para grandes rearranjos genômicos ainda é muito reduzida mesmo em grupos com história pessoal ou familiar de câncer, seja por negligenciamento, uma vez a prevalência dos rearranjos varia significativamente em diferentes populações ou por desconhecimento das técnicas de análise mais eficientes (JARA, et al., 2017). A frequência de rearranjos genômicos entre as famílias com síndrome de predisposição ao câncer de mama e ovário hereditários, de diversos países, é bastante variável (de 0% a 57%), e os achados evidenciam que rearranjos em *BRCA1* ocorrem em maior frequência que em *BRCA2*. Uma revisão que agregou resultados de dezenas de estudos sobre a identificação de

rearranjos em *BRCA1* e 2 relacionou 81 rearranjos genômicos em *BRCA1* e 17 em *BRCA2* (SLUITER e RENSBURG, 2011).

Como resultado desses fatores, a prevalência e diversidade de variantes patogênicas em *BRCA* podem estar subestimadas, principalmente em relação a identificação de novos rearranjos genômicos (DUTIL, 2015). Alterações estruturais no genoma, originadas por rearranjos genômicos podem explicar casos da síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário que não são identificadas pelos métodos convencionais, de modo que, o rastreo destas mutações devem ser incorporados à rotina dos laboratórios de diagnóstico de mutações germinativas relacionadas ao câncer de mama e ovário (GARIBAY et al., 2012).

Devido à escassez de dados a respeito da ocorrência de rearranjos gênicos em *BRCA1* e *BRCA2* na população brasileira, o objetivo do nosso estudo foi identificar a frequência de rearranjos em uma amostra de pacientes com critérios clínicos para síndrome hereditária de câncer de mama e ovário no estado da Bahia e comparar o espectro de mutações observado em nossa população com outras populações.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 CANCER DE MAMA**

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente entre as mulheres no Brasil. Estima-se 59.700 novos casos, por ano, de câncer de mama diagnosticados para o biênio 2018-2019, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2017). Nos últimos anos, os países desenvolvidos apresentaram aumento nas taxas de sobrevivência em relação a doença, enquanto nos países em desenvolvimento como Brasil, Índia e China os índices de sobrevivência reduziram (BRAY et al., 2018; INCA, 2018).

Nota-se que existe evidente diferença global no acesso ao diagnóstico precoce e ao tratamento ideal que poderiam assegurar o aumento da sobrevivência entre pacientes com diagnóstico de câncer. O declínio observado nos coeficientes

de mortalidade decorrentes de neoplasias, em países mais desenvolvidos, deve-se, em grande parte, ao diagnóstico precoce e maior sucesso nas intervenções terapêuticas (ALLEMANI et al., 2015). Já nos países em desenvolvimento e com menores rendas, o diagnóstico do câncer de mama ocorre em estágios mais avançados da doença, aumentando a morbidade relacionada ao tratamento, comprometendo a qualidade de vida e reduzindo a sobrevida dos pacientes (INCA, 2018; TORRE et al., 2015). Por isso, os dados epidemiológicos do câncer de mama ainda são divergentes entre populações. O que se observa é a inexistência de políticas consistentes de controle da doença, principalmente em países onde a maioria dos pacientes tem baixa condição socioeconômica e menor acesso aos programas de prevenção (VIEIRA; FORMENTON; BERTOLINI, 2017).

A identificação dos fatores que podem contribuir para o desenvolvimento do câncer de mama também são úteis para definição de estratégias eficazes e preventivas no controle da doença e compreendem fatores internos - de predisposição hereditária ou dependente da constituição hormonal - e fatores externos - fatores ambientais, constituídos pelos agentes físico, químico e biológico capazes de causar danos ao genoma. Com a identificação destes fatores é possível reduzir fatores de risco modificáveis, alterar fatores ambientais, ajustar métodos de triagem para evitar os estágios avançados de diagnóstico em mulheres com risco câncer de mama (TORRE, et al., 2015; FELIX; ZHENG; OLOPADE, 2017).

A idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco. O acúmulo de exposições ao longo da vida e as próprias alterações biológicas com o envelhecimento aumentam o risco. Mulheres são mais propensas a desenvolver a doença após os 50 anos (INCA, 2013). Contudo, em mulheres jovens com mutações nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, observa-se aumento na frequência do câncer mama (HAMILTON et al., 2012; PETRUCCELLI; DALY; FELDMAN, 2010). Por isso, a história familiar da doença é, sem dúvida alguma, um fator epidemiológico de risco bem estabelecido (SMITH, 2013).

Entre 5 e 10% de todos os casos de câncer de mama está relacionado à herança de mutações patogênicas, tendo como características o início da doença

em idade inferior aos 45 anos e história familiar da doença. Indivíduos que carregam mutações patogênicas em genes de predisposição ao câncer tem maior probabilidade de desenvolver a doença ao longo da vida, sendo o risco entre 50-80% para *BRCA1*, enquanto para o *BRCA2* o risco varia entre 40-70% (PETRUCELLI; DALY; FELDMAN, 2010). Apesar de serem conhecidos como genes de alta penetrância na determinação da doença, outros fatores genéticos, comportamentais e ambientais podem modular esse risco (FRIEBEL; DOMCHEK; REBBECK, 2014).

Portanto, dados relacionados a prevalência, incidência, mortalidade e sobrevida de pacientes com câncer são uma fonte indispensável de informações com relação às estratégias, detecção precoce, diagnóstico e tratamento da doença e um suporte para a melhoria das políticas de saúde e dos sistemas de cuidados com a saúde (ALLEMANI et al., 2015).

## 2.2 CÂNCER DE OVÁRIO

A neoplasia maligna epitelial de ovário é o segundo câncer mais comum do trato genital feminino, somando cerca de 3,6% das neoplasias malignas em mulheres (INCA 2018; SIEGEL et al., 2015). Estima-se que entre 2018 e 2019 ocorram mais de 6.150 novos casos da doença no país (INCA, 2018).

O câncer de ovário é o tumor ginecológico mais difícil de ser diagnosticado e o de menor chance de cura (KUJAWA e LISOWSKA, 2015). Cerca de 3/4 dos cânceres desse órgão apresentam-se em estágio avançado no momento do diagnóstico. A maioria dos tumores de ovário são carcinomas epiteliais, podendo ocorrer também nas células germinativas (INCA, 2018). Alguns fatores dificultam a compreensão da biologia e evolução do câncer de ovário, uma vez que, a maioria das células neoplásicas não são fenotipicamente similares a suas homólogas normais (AIELLO et al., 2017), e a maioria dos tumores parece originar-se em outros tecidos ginecológicos e acabam por envolver secundariamente o ovário (REID; PERMUTH; SELLERS, 2017). Nesta neoplasia maligna, as manifestações clínicas não são evidentes na fase inicial dificultando o diagnóstico precoce, portanto 70% dos diagnósticos são tardios, por consequência, é comum a sua

expansão para além dos ovários (RISTOW et al., 2016; SMITH, 2013). O índice de sobrevida geral é de 50%, com 95% de sobrevida para pacientes com neoplasia restrita aos ovários, no estadiamento I, 79% naquelas com doença infiltrada em tecidos adjacentes aos ovários, estadiamento II é de 28% naquelas com estágio clínico avançado, diagnosticados no estadiamento IV (SMITH, 2013).

Uma das maneiras de interferir na história natural do câncer de ovário é estabelecer precocemente o diagnóstico, uma vez que seu desenvolvimento silencioso eleva as taxas de mortalidade. Mesmo em países desenvolvidos, pouco se avançou em termos de diagnóstico precoce. Avanços nesse campo, poderiam reduzir as taxas de mortalidade melhorando o prognóstico da doença e a assistência (FACINA et al., 2015),

Vários fatores reprodutivos e hormonais podem reduzir o risco do câncer de ovário, incluindo paridade, uso de contraceptivo oral e lactação, enquanto outros como idade avançada na menopausa e terapia de reposição hormonal conferem riscos aumentados (REID; PERMUTH; SELLERS, 2017). A incidência da doença aumenta com a idade, de 20 por 100.000, em mulheres entre os 30 e 40 anos e para 40 por 100.000 em mulheres entre os 50 e 75 anos. Cerca de 10% dos casos de tumor ovariano apresentam componente genético ou familiar, sendo a presença de casos na família o fator de risco isolado mais importante (INCA, 2013). Assim, a predisposição hereditária é reportada em 11-15% das mulheres com a doença. Pacientes com história familiar de câncer ovariano em duas ou mais parentes de primeiro grau têm mais de 50% de chance de desenvolver a doença (CHIRIVELLA et al., 2015).

Mulheres que carregam mutações deletérias em genes de susceptibilidade ao câncer de ovário tem maior risco de desenvolver essa doença. Merecem destaque os genes *BRCA1* e *BRCA2* que são os principais genes envolvidos na predisposição a síndrome hereditária de câncer de mama e ovário (OLIVEIRA et al., 2016). De acordo com estudos prévios (ALSOP et al., 2012; ZHANG et al., 2011) 13% a 18% dos casos de câncer de ovário estão associados a mutações germinativas em *BRCA1* e *BRCA2*. O risco ao longo da vida de desenvolver câncer

de ovário em mulheres com mutação *BRCA2* e *BRCA1* é de aproximadamente, 20% e 50%, respectivamente (NORQUIST et al., 2015).

### 2.3 SÍNDROME DE CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO HEREDITÁRIOS (HBOC)

As síndromes são definidas como combinações de sinais e sintomas formando apresentação clínica distinta, indicativa de anormalidade particular. As síndromes de predisposição hereditária ao câncer são afecções genéticas nas quais as neoplasias malignas acometem indivíduos aparentados, cujas principais características clínicas estão apresentadas na tabela 1.

Dos mais de 200.000 casos de câncer da mama diagnosticados anualmente nos Estados Unidos, 5-10% estão associados com predisposição hereditária, sendo essa condição relacionada principalmente com mutações em genes de susceptibilidade, com padrão de herança autossômico dominante (American Society of Breast Surgeons, ASBrS 2017). Mutações patogênicas em diferentes genes de suscetibilidade apresentam elevada taxa de penetrância, ou seja, o indivíduo que possui uma mutação em genes de susceptibilidade, tem risco elevado de desenvolver lesões associadas à síndrome durante toda a vida (DANTAS, 2010; FRIEBEL; DOMCHEK; REBBECK, 2014).

**Tabela 1 - Características clínicas associadas a HBOC**

---

Câncer de mama <50anos
Câncer de ovário (qualquer idade, com história familiar de CA de mama e/ou ovário)
Câncer de ovário e mama em um mesmo indivíduo
Câncer de mama bilateral
Descendência Judeu Ashkenazi e história familiar de câncer de mama e/ou ovário
Câncer de mama triplo negativo
Múltiplos familiares com câncer de mama em qualquer idade
Câncer de mama masculino
Mutação em <i>BRCA1/2</i> previamente identificada em algum membro da família

---

*Baseado nos critérios para diagnóstico clínico da síndrome HBOC segundo NCCN (2018) e ASCO (2017)*

A síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário é causada, principalmente, pela presença de pelo menos uma variante patogênica

germinativa nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*, e é caracterizada pelo aumento do risco para câncer de mama, câncer de ovário, câncer de próstata e câncer de pâncreas, entre outros. O risco para esses cânceres é de 40% a 80% para o câncer de mama; 11% a 40% para câncer de ovário; 1% a 10% para o câncer de mama masculino; até 39% para câncer de próstata e 1% a 7% para câncer de pâncreas. Indivíduos com variantes patogênicas no gene *BRCA2* também podem ter um risco aumentado de melanoma (PETRUCELLI et al., 2018).

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* estão envolvidos em vias importantes relacionadas ao reconhecimento de danos no DNA, no reparo de quebras duplas no DNA por recombinação homóloga, bem como regulação dos pontos de controle do ciclo celular, contribuindo para a integridade do genoma e manutenção da estabilidade cromossômica (WANG, 2000; HATMAN e FORD, 2002; FRIEDENSON, 2005). Portanto, a perda da função desses genes pode acarretar o surgimento de neoplasias malignas. Estima-se que 2/3 das mutações em genes de suscetibilidade associadas a HBOC ocorrem em *BRCA1* e *BRCA2* (ESTEVEES et al., 2009; PETRUCELLI et al., 2018). Embora *BRCA1* e *BRCA2* sejam os principais supressores tumorais associados ao câncer de mama e ovário hereditários, uma vez que são os mais frequentemente apresentam mutações e mais bem estudados, outros genes de predisposição a doença desempenham papel importante na estabilidade genômica e também estão associados a ocorrência de câncer de mama e/ou ovário como *TP53*, *BARD1*, *BRIP1*, *RAD50*, *RAD51C*, *MUTHY*, *PTEN*, *STK11*, *CDH1*, *CHEK2*, *ATM* e os genes *MMR*, *PALB2*, *MLH1* e *MSH2* (BENUSIGLIO et al., 2013; SMITH, 2013; WALSH et al. 2010; WATSON, 2013).

Segundo dados do CLINVITAE, até o momento, mais de 26900 variantes distintas, já foram descritas em *BRCA1* e *BRCA2*, sendo encontradas por toda a extensão de ambos os genes. Destas, são classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas 4.311 mutações em *BRCA1* e 5.198 em *BRCA2*. A maioria são pequenas alterações como substituições de base ou pequenas deleções e inserções, no entanto, grandes deleções e duplicações genômicas envolvendo um ou mais exons de *BRCA1* e menos comumente em *BRCA2*, também são descritas

em pacientes com síndrome HBOC (GUTIÉRREZ-ENRÍQUEZ et al., 2007; JUDKINS et al., 2012; PREISLER - ADAMS et al., 2016; SLUITER; RENSBURG, 2011; THOMASSEN et al., 2006).

O diagnóstico genético molecular de HBOC é feito com a identificação em um indivíduo ou família com alguma variante patogênica em genes de susceptibilidade ao câncer de mama e/ou ovário. Sendo mais comum o *screening* de genes de alta ou média penetrância como *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CDH1*, *CHECK2*, *PTEN*, *APC* e outros. Atualmente, os painéis genéticos utilizados para diagnóstico de mutações em genes de predisposição a síndrome de câncer de mama e ovário analisam mutações presentes em mais de 25 genes (BUYS, et al. 2017; ROSENTHAL et al., 2017; DOSSUS e BENUGLISIO, 2015). Testes para mutações em genes de alta penetrância, tem grande utilidade clínica, uma vez que são informativos para a tomada de decisões sobre prevenção e elaboração de abordagens terapêuticas (ROBSON, et al., 2010). Constatou-se que a identificação precoce de indivíduos elegíveis para testes genéticos está associada com o aumento da vigilância e estratégias de redução de riscos levando, finalmente, ao diagnóstico de tumores em fase inicial e melhores desfechos pós tratamento (PRUTHI, et al., 2010; DUTIL, 2015).

Embora as técnicas disponíveis apresentem limitações para identificação das variantes alélicas em genes que predisõem câncer, a combinação delas é capaz de detectar a grande maioria das alterações. Uma das grandes dificuldades do aconselhamento genético é a detecção de variantes de significado clínico incerto (VUS, *Variant of Uncertain Significance*) (PETRUCELLI, et al., 2018). As VUS são pouco informativas e não podem ser usadas nas decisões clínicas que devem ser propostas ao paciente, uma vez que relação delas e a origem do câncer ainda permanece desconhecida. Avanços em estudos de segregação familiar e análise de ligação podem fornecer elementos necessários para compreensão do impacto clínico dessas alterações (DOSSUS e BENUGLISIO, 2015).

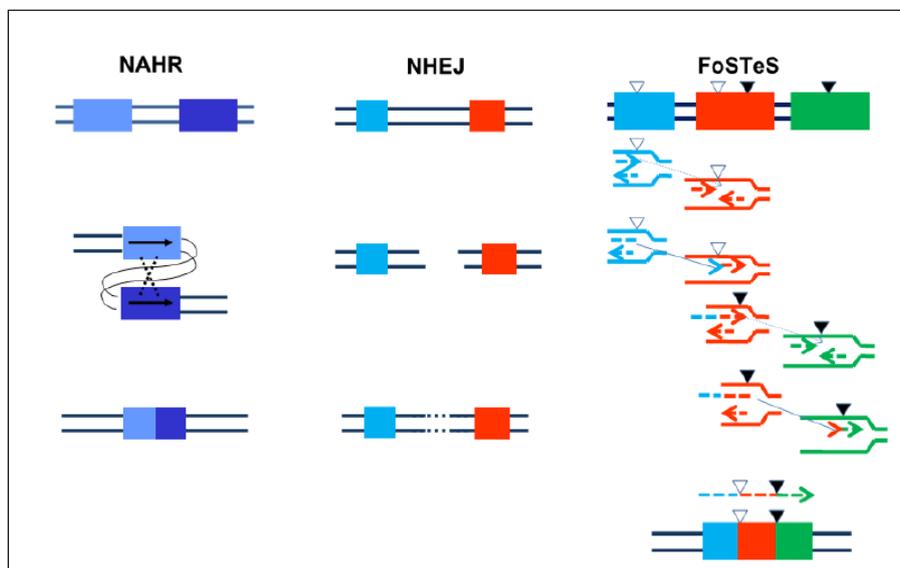
## 2.4 ORIGEM DOS REARRANJOS GENÔMICOS

Rearranjos genômicos resultam de quebras na dupla fita de DNA, as quais podem ocorrer em um único cromossomo ou em um conjunto de cromossomos, e subsequente reunião das regiões envolvidas de maneira reordenada. Essas reordenações geram: duplicações, deleções, inserções, inversões e transposições (GARCIA e GAIESKY, 2015; STANKIEWICZ e LUPSKI, 2005).

Os rearranjos podem representar polimorfismos neutros, ou gerar fenótipos patológicos por mecanismos que incluem mudança no número de cópias (CNV, *Copy Number Variation*) em genes sensíveis à dosagem ou criando fusão entre genes distintos, entre outros (GU et al., 2008). Tais alterações contribuem para a variação fenotípica observada entre os indivíduos (SEBAT et al., 2004), além de serem associadas a uma série de doenças como câncer (DENIZ et al., 2013; KARPARESK e HUMPHREY, 2011), alzheimer (ROVELET-LECRUX et al., 2006), parkinson (SIMON-SANCHEZ et al., 2008) e autismo (SEBAT et al., 2004). Quebras na dupla fita (DSBs - *Double-Strand Breaks*) de DNA são a principal fonte de instabilidade genômica e há muito, foram reconhecidos como iniciadores e intermediários de uma vasta gama de rearranjos no genoma. Além disso, DSBs podem surgir da exposição endógena do DNA a agentes prejudiciais, como vírus, enzimas de restrição, radicais livres, ou através da exposição a radiações ionizantes (IR) e luz ultravioleta (UV) entre outros agentes mutagênicos (KASPAREK e HUMPHREY, 2011). A consequência é que estas extremidades podem tornar-se substrato para uma gama de processos de recombinação (BAILEY, 2014).

Para reparar essas lesões, potencialmente letais, as células possuem diversas vias de reparo. O principal mecanismo de reparo de DSBs é a recombinação homóloga (HR, *Homologous Recombination*). HR é um mecanismo preciso que utiliza o modelo de sequência homóloga, a partir das cromátides irmãs, para reconstituição do DNA danificado (ILIAKIS et al., 2004; DENIZ, et al., 2013). Este tipo de reparo ocorre normalmente após a replicação do DNA, mas antes da divisão celular. Os genes de *BRCA1* e *BRCA2* realizam reparo por essa via (STRACHAN e READ, 2013).

Enquanto a manutenção da integridade genômica requer fidelidade no reparo da dupla fita de DNA, rearranjos resultam de falhas nestes processos levando a um mal reparo. Em algumas situações as quebras na dupla fita de DNA são reparadas por mecanismos que produzem alterações aberrantes levando a ocorrência de doenças (ILIAKIS et al., 2004). Os três principais mecanismos propostos que produzem rearranjos genômicos são: a recombinação homóloga não alélica (NAHR, *Nonallelic Homologous Recombination*), a ligação de pontas não homólogas (NHEJ, *Nonhomologous End-Joining*) e Modelo de troca de forquilha de replicação ou FoSTeS (*Fork Stalling and Template Switching*) (Figura 1).



**Figura 1** - Comparação entre os mecanismos de NARH, NHEJ e FoSTeS na origem de deleções e duplicações. Fonte: *Gu et al.*, 2008.

**NARH** - Representação de um evento NAHR entre duas LCRs (o grau de homologia entre LCRs é entre 97% e 98%) com orientação direta em uma mesma cromátide. No esquema, o alinhamento entre LCRs não alélicas acompanhado de um evento de recombinação origina deleção das sequências intervenientes e de parte das LCRs, o mesmo mecanismo também pode gerar duplicações a depender da posição das LCRs. **NHEJ** - DSBs são criadas entre as duas sequências representadas pelas caixas azul e vermelha. Na existência de microhomologias, a maquinaria da NHEJ pode ligar diretamente as pontas de DNA expostas e, na ausência, a ligação é antecedida do processamento das pontas por meio de ativação de um complexo enzimático. Em ambos os casos, ocorre deleção das sequências entre as duas DSBs. **FoSTeS** - Representação de dois eventos FoSTes na origem de uma deleção complexa que envolve dois fragmentos. As caixas azul, vermelha e verde representam as sequências envolvidas no mecanismo e as setas apontadas para baixo indicam sítios de microhomologia (2-5 nt) entre as caixas azul e vermelha (seta vazia) e entre vermelha e verde (seta preta). As forquilhas de replicação das duas sequências adjacentes estão representadas da mesma cor que as caixas. A fita contínua crescente (azul) invade a forquilha de replicação vizinha (vermelha) em um sítio com microhomologia e inicia sua replicação a partir deste ponto. O produto final é a justaposição de sequências genômicas de várias regiões diferentes dependendo de quantos forem os eventos FoSTeS necessários para completar a replicação.

**NAHR**- São rearranjos estruturais originados por recombinação homóloga entre sequências homólogas não alélicas. Cerca de 50% do genoma humano é constituído por sequências repetitivas, destas entre 5% e 10% correspondem as repetições de poucas cópias (LCR, *Low-Copy Repeats*) também conhecidos como segmentos mínimos com identidade de sequências perfeita (MEPs, *Minimal Efficient Processing Segments*) (BAILEY, 2014). Esses segmentos têm aproximadamente entre 10 e 500 kb de extensão e apresentam alto grau de homologia, e é especialmente por meio dos LCRs que a recombinação homóloga não alélica (NARH) ocorre durante a meiose. As características físicas do LCRs como tamanho e orientação afetam a arquitetura do genoma gerando instabilidade e possibilitando a formação de NAHR. A combinação desta arquitetura particular e NAHR podem resultar em rearranjos incluindo deleções, duplicações, inversões, translocações entre outros rearranjos complexos (GU; LUPSKI, 2008)

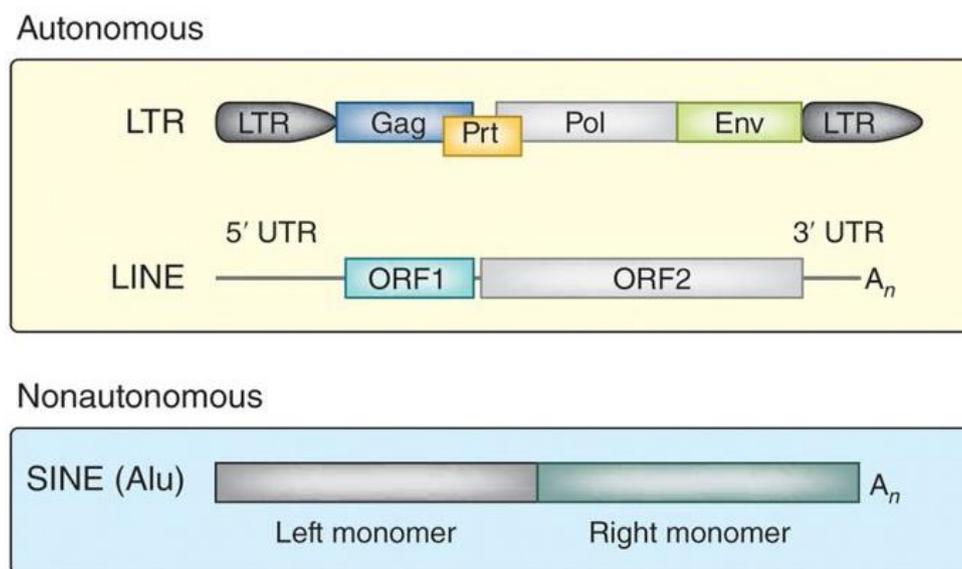
**NEHJ** – É o reparo mediado pela junção de extremidades não homólogas, isto é união de extremidades não contíguas originando rearranjos estruturais. Inicialmente as extremidades quebradas emparelham-se com base na homologia de alguns poucos pares de bases e sua junção ocorre após a adição ou perda de bases, tornando as fitas compatíveis (LEE e LUPSKI, 2007). Células de mamíferos utilizam do mecanismo de NHEJ para reparar quebras consequentes de processos fisiológicos da célula, causadas por radiação ionizante, agentes genotóxicos ou por algumas formas reativas de oxigênio. Este mecanismo é considerado o mais frequente determinante de translocação cromossômica em células cancerosas (GU et al. 2008). O processo de NHEJ ocorre em quatro etapas: detecção das DSBs, ligação do heterodímero Ku 70/80, complexo proteico requerido pelo mecanismo NHEJ e que auxilia o processo de reparo; aproximação física das pontas pela formação de um complexo que envolve heterodímeros Ku e proteínas quinase dependente de DNA (DNA-PKcs); processamento das extremidades não compatíveis por nucleases e polimerases e reação de ligação envolvendo um complexo da enzima ligase (WETERINGS E CHEN, 2008). O NHEJ não é dependente de regiões de alta similaridade como LCRs ou MEPs. Entretanto, LCRs e elementos repetitivos como LTR (*LTR, Long Terminal Repeats*), LINE

(Long Interspersed Nuclear Elements) e sequências *Alu* foram identificados em pontos de quebra de rearranjos genômicos implicados com NHEJ (STANKIEWICZ, et al., 2003). Isso demonstra que apesar de não ser necessários para ocorrência de NHEJ, estas sequências podem estimular o processo sem estarem fisicamente envolvidas. A inserção ou deleção de poucos nucleotídeos nas extremidades quebradas é necessária para que ocorra a compatibilização das extremidades das fitas permitindo a consequente junção (VIEIRA, 2012).

**FoSTeS-** Além da NARH e NHEJ, alterações estruturais no genoma também podem ser gerados por FoSTeS. O mecanismo é induzido por erros no processo de replicação do DNA e origina rearranjos complexos com micro-homologias nas junções dos pontos de quebra (LEE et al. 2007; GU et al. 2008). Este modelo propõe que uma pausa da forquilha de replicação ocorre em virtude da presença de estruturas secundárias ou lesões na fita de DNA em regiões de instabilidade genômica próximas a LCRs, podendo levar quaisquer uma das fitas, contínua ou descontínua, a se desprender da original e alternar para outras forquilhas de replicação ativas que estejam próximas fisicamente ou que tenham sido aproximadas, continuando sua síntese de maneira errônea. A invasão da fita original requer regiões de micro-homologia com sítios invadidos, em seguida, a fita recomeça sua síntese na forquilha invadida (LEE et al., 2007). Este processo pode se repetir diversas vezes, gerando regiões deletadas, caso a forquilha de replicação invadida esteja posicionada posteriormente em relação à sequência original, regiões duplicadas se a forquilha invadida esteja em posição anterior em relação a sequência original e inversões, a depender da direção da progressão da forquilha invadida (GU et al., 2008; ZHANG, 2013). Ou seja, o rearranjo resultante deste mecanismo ocorre em função da posição relativa entre as forquilhas, do sentido das forquilhas invadidas e da ação da polimerase que irá influenciar nos números de eventos FoSTeS necessários para completar a replicação (GU et al., 2008).

#### 2.4.1 *Elementos de Transposição*

Além dos processos descritos anteriormente, as alterações no número de cópias e as alterações na organização dos genes podem ocorrer via inserção de elementos móveis. Mais de 45% do genoma humano é constituído por sequências de elementos de transposição (TEs, *Transposable elements*) (LANDER et al., 2011; MEDINA, 2015). Os TEs são classificados com base nos mecanismos que utilizam para se movimentar dentro do genoma. Essa movimentação pode ser autônoma ou não autônoma, com base na presença ou não de genes que codificam proteínas associadas a sua própria mobilização como constituintes de um determinado TE (WICKER et al., 2007). Dessa maneira, são considerados de classe I aqueles elementos que utilizam uma molécula de RNA como intermediária durante a sua mobilização e de classe II aqueles que se mobilizam na forma de DNA (VARANI et al., 2015) (Figura 2).



**Figura 2** - Principais tipos de elementos de transposição de acordo com a sua movimentação no genoma. Fonte: Volkman & Stetson., 2014.

Os elementos de classe I são conhecidos como retrotransposons e sua transposição ocorre a partir da síntese de uma molécula de RNA mensageiro e de um conjunto de enzimas relacionadas a transposição. Fazem parte desta classe retrotransposons contendo nas duas extremidades longas repetições terminais (LTR) ou retrotransposons sem LTRs, neste grupo estão incluídos os elementos nucleares intercalantes longos, LINEs, transposons autônomos que podem

produzir todas as moléculas necessárias para a transposição, incluindo transcriptase reversa. Eles correspondem a cerca de 20% do genoma. Os elementos nucleares intercalantes curtos, SINEs, são representados pelas sequências *Alu* que apresentam tamanho pequeno, de 80 a 300 nucleotídeos e são assim chamadas por conterem um sítio de corte para a endonuclease de restrição bacteriana denominada *AluI*, não tem capacidade codificadora e são mobilizados pela maquinaria dos elementos LINE (VARANI et al., 2015). Estima-se que constituam cerca de 3% do DNA humano.

Pertencem a Classe II elementos conhecidos como transposons de DNA, realizam transposição sem a participação de molécula de mRNA para a síntese de um novo transposon. O processo de transposição depende apenas da síntese de enzimas necessárias à mobilização do transposon, as transposases. Elas reconhecem o sítio doador, do qual o elemento vai ser excisado e o sítio receptor do genoma, realizando o processo de quebra e junção da ligação fosfodiéster da molécula de DNA (WICKER et al., 2007).

As inserções destes elementos têm o potencial de influenciar a expressão e a atividade de genes humanos (MEDINA e CARARETO, 2015). Durante a sua movimentação os TEs podem promover mutações pela sua inserção e/ou alterar a organização dos genes e o seu tamanho. A excisão e a inserção podem gerar rearranjos estruturais como deleções, duplicações ou inversões, dessa maneira atuam como sítios de recombinação promovendo grandes reorganizações no genoma (VARANI et al., 2015). O papel das variações genômicas estruturais na origem das doenças tem sido foco de muitas pesquisas. A frequência e os efeitos dessas inserções não são completamente conhecidos, porém inserções da subfamília *Alu* mais ativa do nosso genoma, a *AluYa5*, têm sido relacionada a mais de 15 doenças que incluem dentre outras neurofibromatose, hemofilia e alguns tipos de câncer, como ovário, mama e leucemias (BATZER e DEININGER, 2012).

Por muito tempo as recombinações mediadas por sequências *Alu* foram superestimadas, pois era o mecanismo mais bem compreendido para a origem dos grandes rearranjos, uma vez que explicavam a maioria dos casos. No entanto, análises moleculares mais extensas, envolvendo a identificação dos pontos de

quebra e junção entre as regiões dos genes que sofreram rearranjos tem mostrado outros mecanismos que viabilizam essas alterações (GARIBAY, 2012; FACHAL, 2014).

## 2.5 GRANDES REARRANJOS GENÔMICOS EM *BRCA1* E *BRCA2*

A identificação de grandes rearranjos genômicos em famílias portadoras da síndrome de câncer de mama e ovário hereditários tem baixa ocorrência, mas há uma significativa proporção de casos em diferentes populações. Essas mutações são normalmente patogênicas, já que deleções ou inserções de grandes sequências genômicas nas regiões codificantes de genes com funções importantes na manutenção da integridade genômica como *BRCA1* e *BRCA2* geralmente levam a uma proteína mutante de estrutura e/ou função anormal (PREISLER-ADAMS et al., 2016). Grandes rearranjos genômicos de *BRCA1* podem representar até um terço de todas as mutações causadoras de doenças em várias populações, enquanto grandes rearranjos genômicos no *BRCA2* são menos frequentes (HANSEN et al., 2009). A maioria dos rearranjos são causados por eventos de recombinação desigual entre elementos *Alu* que são particularmente abundantes em *BRCA1* (BATZER e DEININGER, 2012; PAYNE et al., 2000). Já no gene *BRCA2* observa-se menor número desses rearranjos o que pode ser explicado pelo menor número de repetições *Alu* nas sequências intrônicas deste gene quando comparado ao do gene *BRCA1*. Aparentemente, rearranjos neste gene são mais comuns em famílias HBOC com câncer de mama masculino (SARA, 2007; SHARIFAH, 2010).

A frequência de rearranjos genômicos entre as famílias com síndrome de predisposição ao câncer de mama e ovário hereditários, é bastante variável e a proporção e a distribuição dos grandes rearranjos em *BRCA* variam amplamente entre diferentes grupos populacionais e por região geográfica.

Na população holandesa, a frequência de grandes rearranjos em *BRCA1* é superior a 27% de todas as mutações diagnosticadas no gene, por sua vez, a ocorrência do mesmo tipo de alteração em *BRCA2* é cerca de 1% (SLUITER e RENSBURG, 2011). Por outro lado, em Portugal, grandes rearranjos em *BRCA1*

representam 6% das mutações neste gene, no entanto, em *BRCA2* devido a mutação fundadora c.156\_157insAlu a frequência de grandes rearranjos é a mais alta já reportada: 57,89% das mutações em *BRCA2* (PEIXOTO, et al., 2009; PEIXOTO, et al., 2011). A classificação da mutação c.156\_157insAlu como fundadora, se dá em detrimento da sua alta frequência na população de Portugal (FACHAL et al., 2014).

Na Espanha a frequência de grandes rearranjos em *BRCA1* está em torno de 9,8% e para *BRCA2* o valor é desconhecido, por outro lado, na região da Galícia um estudo realizado com 830 pacientes (FACHAL, et al., 2014) identificou a taxa de 2,34% e 1,81% de mutações do tipo grandes rearranjos em *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente, sendo que a mutação encontrada em *BRCA2* é de origem portuguesa. Nos Estados Unidos, grandes rearranjos representam a fração de 6% a 22% das mutações presentes em *BRCA1* e *BRCA2* (JUDKINS et al., 2012). Em outros estudos de triagem populacional para diagnósticos de grandes rearranjos nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foram observadas taxas semelhantes entre as populações.

James e colaboradores (2015) identificaram em uma coorte de 1.222 indivíduos, associação significativa ( $p=0,008$ ) entre a presença de características de alto risco (câncer bilateral, diagnóstico inferior aos 40 anos, câncer de ovário e câncer de mama masculino) e o diagnóstico de grandes rearranjos em *BRCA1* e *BRCA2* nos pacientes do estudo. Portanto, a detecção de mutações em famílias de risco pode gerar informações decisivas, permitindo que medidas preventivas sejam planejadas também, para os membros não afetados (JAMES et al., 2015).

No Brasil, os dados a respeito da ocorrência de grandes rearranjos ainda são insuficientes. Em estudo recente realizado no Brasil, Palmero e colaboradores (2018) agregaram dados de triagem das variantes patogênicas e provavelmente patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2* de 649 probandos, em 23 centros de pesquisas, de 11 estados brasileiros. A frequência total de grandes rearranjos encontrada em *BRCA1* e *BRCA2* foi de 4,9%. Foram identificados 11 diferentes rearranjos em *BRCA1* e 5 em *BRCA2*. Portanto, o conhecimento sobre a variabilidade de mutações germinativas entre pacientes brasileiros com HBOC ainda é limitado.

Muitos estudos tem como foco apenas mutações específicas ou triagem de poucas regiões de *BRCA1* e/ou *BRCA2*. Até o momento, apenas 5 estudos (CARRARO et al., 2013; FERNANDES et al., 2016; SILVA et al., 2014; MAISTRO et al., 2016; ALEMAR et al., 2017) realizados no Brasil realizaram o teste abrangente que inclui, além da triagem para pequenas mutações, a análise para grandes rearranjos, isso corresponde a 1041 indivíduos testados em uma população com mais de 207 milhões de pessoas.

Portanto, conhecer a variabilidade de mutações patogênicas em genes de susceptibilidade que induzem ao câncer nas populações podem subsidiar a geração de novas políticas públicas para o atendimento de famílias com histórico familiar de alto risco para câncer, principalmente entre membros que ainda não foram acometidos pela doença, mas tem alta probabilidade de portar mutações deletérias e por isso, devem ser informados quanto as medidas profiláticas existentes para cada condição distinta (DUTIL, 2015). Para Allemani et al. (2015), algo é evidente, seja em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, quando o diagnóstico do câncer de mama ocorre na fase inicial da doença, as chances de cura e o aumento no tempo da sobrevida são significativos.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 GERAL

Identificar a presença de rearranjos genômicos nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em uma amostra de pacientes do estado da Bahia que atendem aos critérios clínicos para síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a frequência de rearranjos genômicos em *BRCA1* e *BRCA2* em uma amostra de pacientes do estado da Bahia.
- Caracterizar famílias com rearranjos em *BRCA1* e *BRCA2* em seus aspectos clínicos, de história familiar, idade ao diagnóstico, ancestralidade fenotípica e referida, tipo de neoplasia maligna e estadiamento tumoral.
- Associar as características clínico patológicas à presença de grandes rearranjos genômicos encontrados nos pacientes
- Descrever a relação entre o risco teórico de ser portador de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e a presença de rearranjos genômicos nestes genes.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Este é um estudo descritivo realizado em pacientes atendidos no Ambulatório de Oncogenética do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia desde 2008, contabilizando até o momento 680 pacientes (probandos) com história pessoal e/ou familiar de risco para câncer de mama e/ou ovário ou com diagnóstico de câncer em idade inferior a 50 anos, confirmado por exame clínico e histopatológico em qualquer fase de estadiamento tumoral. Os participantes do estudo são procedentes de clínicas e hospitais, públicos ou particulares de Salvador e de outros municípios do estado da Bahia. Com o objetivo de identificar a frequência de rearranjos genômicos em *BRCA1* e *BRCA2*, nesta população, foram selecionados 292 pacientes de acordo com os critérios estabelecidos no item 4.1.3.

#### 4.1.1 Aspectos éticos

A execução do estudo foi devidamente aprovada pela CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e registrado na Plataforma Brasil, CAAE 37352114.5.0000.5032 (ANEXO A). Por meio da apresentação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), os pacientes foram informados sobre os objetivos, riscos e benefícios da sua participação na pesquisa (APÊNDICE A).

#### 4.1.2 Etapas do atendimento

##### a. Consulta pré-teste

Na consulta pré-teste, os pacientes foram informados sobre o projeto de pesquisa e aqueles que concordaram em participar do mesmo, assinaram o TCLE. Em seguida foram avaliados por médico geneticista. No momento da consulta foram

coletadas informações sobre a história pessoal e familiar de câncer, além dos dados clínicos do paciente e calculado o risco teórico, pessoal e familiar para estimar a probabilidade do indivíduo apresentar mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Para o cálculo de risco foi utilizado o modelo estatístico BRCAPro (Berry 1997; Parmigiani, 1998) O *software* foi utilizado com a finalidade de inferir o valor do risco para um indivíduo ser portador de mutação germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2*, a partir da história pessoal e familiar para câncer de mama feminino e masculino, câncer de ovário, outros tipos de câncer na família e idade do diagnóstico.

#### *Coleta de material biológico*

Os pacientes que atenderam aos critérios de inclusão foram submetidos a um questionário clínico-epidemiológico padronizado (APÊNDICE B). Em seguida, aqueles que aceitaram participar do estudo foram encaminhados para coleta de material biológico (sangue periférico) no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA para análise molecular dos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

#### *c. Aconselhamento genético (consulta pós-teste)*

Após a conclusão da análise genética os pacientes foram convocados e informados sobre o resultado do exame, receberam aconselhamento genético e as orientações necessárias sobre como proceder diante do resultado, seja com ou sem alteração patogênica. Durante toda participação no estudo, o paciente poderia buscar orientação com os médicos, pesquisadores e psicólogos que participam do projeto.

#### *4.1.3 Critérios de inclusão e exclusão*

Foram incluídos na investigação molecular para identificação de grandes rearranjos em *BRCA1* e *BRCA2*, indivíduos maior de 18 anos com diagnóstico

histopatológico de câncer de mama e/ou de ovário considerados de risco para câncer hereditário ou indivíduos sem câncer, mas com história familiar de risco, com pelo menos um dos fatores discriminados a seguir:

- Diagnóstico de câncer de mama em idade inferior a 50 anos;
- Diagnóstico de câncer de mama ou ovário em qualquer idade somado a histórico familiar de risco para HBOC;
- Câncer de ovário em qualquer idade;
- Características de alto risco como câncer de mama bilateral, câncer de mama masculino, múltiplos tumores primários.
- Possuir parentes de 1º a 3º grau com câncer de mama (pelo menos 2 casos), câncer bilateral, câncer de ovário, câncer de mama masculino, câncer de pâncreas ou câncer de próstata.
- Probabilidade de risco para mutação em *BRCA1* e *BRCA2* superior a 10%, exceto para os casos onde o diagnóstico da doença ocorreu abaixo dos 40 anos mesmo sem história familiar;
- Pacientes com câncer de mama triplo negativo.

Os critérios de inclusão foram elaborados com base nas diretrizes da NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) Guidelines in Oncology - Avaliação de Câncer de mama e ovário genético/familiar de alto risco (Version 2.2019) e nos critérios da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO, *American Society of Clinical Oncology*, 2017).

Foram excluídos da pesquisa indivíduos que a qualquer tempo se recusaram a participar do estudo.

## 4.2 ANÁLISES LABORATORIAIS

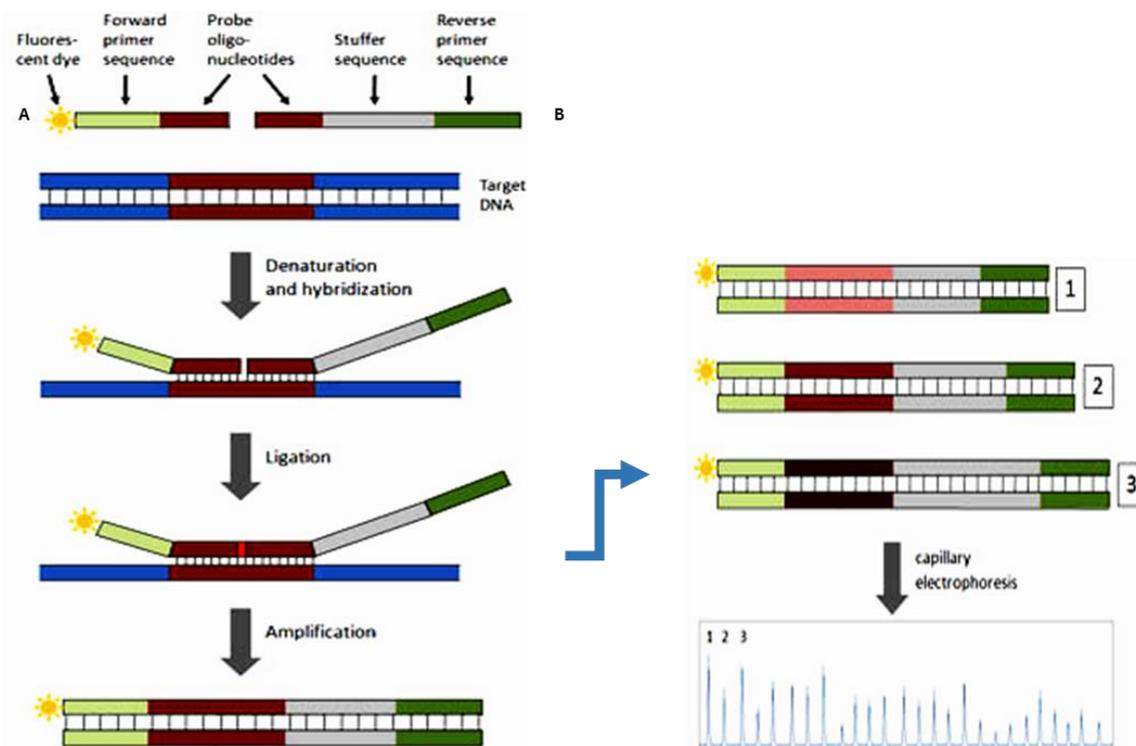
### 4.2.1 Extração de DNA genômico

O DNA genômico obtido de sangue periférico foi extraído utilizando o kit comercial DNeasy® Blood & Tissue QIAGEN® kit (Austin, TX, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro Nanodrop KASVI®. O processo permitiu avaliar a pureza e concentração da amostra. As configurações de comprimento de ondas recomendado (A260:A280 nm) estavam entre 1.8 e 2.0 e a concentração do DNA, variou entre 80ng/μL a 150ng/μL.

### 4.2.2 Amplificação Dependente da Ligação de Múltiplas Sondas (MLPA)

Foram investigadas as muta es classificadas como rearranjos genômicos, nos genes *BRCA1* e *BRCA2* utilizando a técnica de MLPA® (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* - MRC-Holland, Amsterdam, Holanda). Este método apresenta alta sensibilidade e visa   quantifica o relativa, quanto ao número de cópias, de mais de 50 sequências de ácidos nucléicos em um único experimento. A técnica   capaz de detectar dele es e duplica es em diversos genes e discriminar sequências que diferem em apenas um nucleotídeo (SCHOUTEN et al., 2002). A rea o de MLPA consiste na utiliza o de sondas compostas de dois oligonucleotídeos (A e B) localizados muito próximos e complementares a uma sequência alvo no gene. Além desta região de hibridiza o, as sondas possuem regiões complementares a um par de oligonucleotídeos iniciadores marcados com o flur foro FAM e uma sequência *stuffer*, que   diferente para cada sonda e diferencia os fragmentos amplificados por tamanho. Quando as sequências alvo estão presentes na amostra, os oligonucleotídeos A e B se hibridizam para posteriormente serem conectados pela enzima *Ligase-65*. Somente as sondas já ligadas são amplificadas por PCR, cada uma gerando um produto de tamanho único (130 a 490 pb) (Figura 3). Diferenças nos valores

relativos referentes à amplificação são expressas em tamanhos ou áreas diferentes entre as amostras de pacientes e de controles negativos. Segundo o protocolo do fabricante, cada reação de MLPA deve conter no mínimo três amostras controle.



**Figura 3:** Etapas referentes a reação de MLPA. Fonte: *MRC Holland*, 2010

Além dos controles externos, cada kit contém seus controles internos e controles de quantidade e desnaturação do DNA: Q-fragments e D-fragments, respectivamente. Estes controles permitem identificar a qualidade do DNA da amostra e da reação. As etapas de execução da técnica de MLPA foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante: Hibridização, Reação de ligação, PCR, e separação dos produtos por eletroforese capilar, por fim, os dados gerados são importados para o programa Coffalyser<sup>®</sup>, versão V.140721 MRC-Holland, que analisa as reações e fornece o resultado final.

Para detecção dos rearranjos genômicos em *BRCA1* foram utilizadas as sondas dos kits: **SALSA MLPA P002 BRCA1** (exons 1a, 2 e 3 e exons 5-24) e para confirmação da alteração: **SALSA MLPA P087 BRCA1** (exons 1-3 e 5-24).

Para *BRCA2* foram utilizadas as sondas de triagem contidas nos kits: **SALSA MLPA P090 BRCA2** (exons 1-27); **SALSA MLPA P045 BRCA2/CHEK2** (exons *BRCA2* 1-27 e exons *CHEK2* 1, 9 e no exon 11 a mutação 1100delC) e para confirmação: **SALSA MLPA P077 BRCA2** (exons 1-27 introns 3,7,12,13,21). Os resultados positivos foram verificados em experimento independente, realizado em um segunda amostra de DNA.

Uma relação das sondas e as respectivas posições cromossômicas nas quais é realizado o *screening*, bem como das sondas confirmatórias utilizadas para identificação de rearranjos genômicos em *BRCA1* e *BRCA2* estão em anexo (ANEXO B). A análise dos resultados da reação de MLPA foi realizada utilizando o software Coffalyser. Este software faz a leitura dos arquivos com extensão FSA gerados pelo sequenciador e utiliza a plataforma Windows para análise dos dados.

#### 4.2.3 Detecção da mutação c.156\_157insAlu de *BRCA2*

Para identificar a mutação de c.156\_157insAlu, foram utilizadas as técnicas de MLPA (kit SALSA MLPA P045) de acordo com instruções do fabricante e também reação em cadeia da polimerase (PCR). O ensaio foi realizado usando dois PCRs independentes, um para amplificação do exon 3 e outro específico para o rearranjo *Alu*, conforme descrito em Peixoto et al. (2009). Para controle da reação foi usada uma amostra positiva para a mutação c.156\_157insAlu. Em outra etapa da análise, 20% das amostras, escolhidas aleatoriamente, foram sequenciadas para confirmação dos resultados.

#### 4.2.4 Análises estatísticas

Para a análise dos dados foi utilizado o programa estatístico SPSS versão 18. Para análise descritiva, as variáveis categóricas foram descritas por suas frequências absolutas e as variáveis quantitativas foram expressas como a média e desvio padrão (DP); um nível de significância de 0,05 foi considerado aceitável.

Para calcular o risco associado a presença de grandes rearranjos genômicos em pacientes com câncer, foi utilizado o programa Winpepi versão 3.85.

## 5. ARTIGO ORIGINAL

**Rearranjos genômicos em *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes com risco para HBOC (Síndrome hereditária de câncer de mama e ovário) em uma amostra da região Nordeste do Brasil.**

Juliana Côrtes de Freitas<sup>1,2,3</sup>, Taisa Manuela Bonfim Machado Lopes<sup>1</sup>, Thaís Ferreira Bonfim Palma<sup>1</sup>, Gabriela do Espírito Santo Felix<sup>1,2</sup>, Betânia Pereira Toralles<sup>1</sup>, Roberto Meyer<sup>1</sup>, Ivana Lucia de Oliveira Nascimento,<sup>1</sup> Kiyoko Abe-Sandes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brasil*

<sup>2</sup>*Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Bahia, Brasil*

<sup>3</sup>*Universidade do Estado da Bahia, Bahia, Brasil*

<sup>4</sup>*Núcleo de Oncologia da Bahia, Bahia, Brasil*

## Resumo

Testes genéticos para triagem de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* podem fornecer aos indivíduos e suas famílias informações importantes sobre o risco de desenvolver tipos específicos de câncer. Muitos estudos tem fornecido evidências a respeito da importância da triagem rotineira de grandes rearranjos genômicos como parte do teste padrão para mutações de *BRCA* em famílias de alto risco, uma vez que essas alterações são responsáveis por pelo menos 10% das mutações em *BRCA1* e 5% das mutações em *BRCA2* nas famílias com câncer de mama e ovário hereditários. Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar a frequência de rearranjos genômicos em *BRCA1* e *BRCA2* em uma amostra de 292 pacientes com história familiar de risco para HBOC (Síndrome hereditária de câncer de mama e ovário) do Estado da Bahia, selecionados de acordo com os critérios da ASCO (*American Society of Clinical Oncology, 2017*) e NCCN (*National Comprehensive Cancer Network, 2018*). A análise dos rearranjos foi realizada por MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) - MRC Holland. Os seguintes rearranjos foram detectados: deleção dos exons 16-17 de *BRCA1*, duplicação do exon 5 de *BRCA1*, deleção dos exons 1-2 de *BRCA1* e duplicação do exon 21 do *BRCA2* encontrados em sete pacientes com diagnóstico de câncer de mama e/ou ovário com história pessoal e familiar de câncer, sugestivo de HBOC. Em relação às mutações encontradas, a deleção dos exons 16-17 e deleção dos exons 1-2 de *BRCA1* já foram descritas na literatura como patogênicas. As outras mutações ainda não estão descritas e estudos para determinação do efeito clínico e a caracterização molecular serão necessários. A frequência de rearranjos observada neste estudo foi de 2,4% e está de acordo com a frequência de outros estudos realizados no Brasil. A mutação fundadora portuguesa c.156\_157insAlu em *BRCA2* não foi encontrada, embora essa população tenha uma contribuição portuguesa relevante. Dados históricos mostram que o fluxo migratório de Portugal para o Nordeste e Sul/Sudeste do Brasil foi divergente e, portanto, esses achados sugerem que efeito fundador ou deriva genética ocorreram no país em diferentes lugares e momentos. Portanto, estratégias de triagem baseadas em testes genéticos abrangentes para *screening* de pequenas mutações e de rearranjos genômicos em *BRCA* pode proporcionar terapias mais eficientes e melhores prognósticos.

**Palavras-chave:** Grandes rearranjos Genômicos. *BRCA1*. *BRCA2*. HBOC

## Introdução

Mutações germinativas patogênicas nos genes supressores tumorais *BRCA1* e *BRCA2* representam 26% dos casos de HBOC (Síndrome hereditária de câncer de mama e ovário) [1]. Indivíduos que apresentam mutações deletérias nestes genes estão fortemente predispostos a desenvolver câncer de mama e/ou ovário, além de outros tumores sólidos [2], assim, a identificação de mutações em genes de susceptibilidade podem contribuir para a melhoria das estratégias de prevenção ao câncer em indivíduos afetados.

O termo, grandes rearranjos genômicos (LGRs), é utilizado para explicar o espectro de mutações envolvendo variações no número de cópias (CNVs, Copy Number Variation) de uma sequência de DNA que podem variar entre menos de 500 pb até a perda ou ganho de todo gene [3]. Alterações geradas por rearranjos genômicos em *BRCA1* e *2* explicam uma proporção não negligenciável de casos de câncer de mama e ovário com características de alto risco [4], de modo que o rastreamento dessas alterações tem sido recomendado à rotina dos laboratórios, mesmo em pacientes já submetidos a sequenciamento genético para diagnóstico de mutações pontuais.

A amplificação dependente da ligação de múltiplas sondas (MLPA) é atualmente o método mais utilizado na detecção dessas alterações [5, 6]. Apesar de outras metodologias como PCR quantitativo e hibridização genômica comparativa serem capazes de identificar rearranjos genômicos em amostras de pacientes, o MLPA é padrão ouro no diagnóstico. Recentemente, tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) tem se aperfeiçoado em detectar LGRs, contudo, é necessário adaptar as plataformas de sequenciamento para otimizar a identificação destas alterações [7, 8].

A ocorrência de grandes rearranjos genômicos em famílias HBOC é baixa, mas há uma significativa proporção de casos em diferentes populações [9]. Essas mutações são normalmente patogênicas, uma vez que geralmente levam a um peptídeo mutante de estrutura e/ou função anormal [10]. Grandes rearranjos de

*BRCA1* podem representar até um terço de todas as mutações causadoras de câncer em várias populações, enquanto rearranjos *BRCA2* são menos frequentes [11].

A frequência de rearranjos genômicos entre as famílias com síndrome de predisposição ao câncer de mama e ovário hereditários em diversos países é bastante variável. Na Holanda, a frequência de rearranjos genômicos é de 1% em *BRCA2* e 27% em *BRCA1* [12]. Na Dinamarca, 2% em *BRCA2* e 12,5% em *BRCA1* [13]. Achados similares foram observados em amostras de populações da Austrália (2.3% vs. 14.9%) [14], Malásia (4% vs. 8%) [15], Itália (0% vs. 10.5%) [16], República Checa (0% vs. 12.3%) [17] e Estados Unidos (6% vs. 22%) [18]. Por outro lado, em Portugal, grandes rearranjos em *BRCA1* representam 6% das mutações neste gene. Em *BRCA2*, devido a mutação c.156\_157insAlu, a frequência de grandes rearranjos é a mais alta já reportada (57,89%) entre as mutações em *BRCA2* [19,20]. Tal variação pode ser explicada pela presença de mutações fundadoras, ou recorrentes em certos grupos populacionais. No Brasil, os dados a respeito da ocorrência de rearranjos genômicos em *BRCA1* e *BRCA2* na população são escassos. Estudo recente, realizado em uma amostra de pacientes de alto risco para HBOC, encontrou a frequência de 2,75% de rearranjos genômicos em *BRCA1* e 2,0% em *BRCA2* [21]. A proposta deste estudo é definir a frequência de LGRs nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em uma amostra de pacientes com risco para HBOC do estado da Bahia.

## Metodologia

### *Pacientes*

Para rastreamento de rearranjos genômicos em *BRCA 1* e *2* foram selecionados 292 participantes de uma amostra de 680 indivíduos com história pessoal e/ou familiar sugestiva de HBOC. Os pacientes são procedentes de clínicas e hospitais, públicos ou particulares de Salvador, Bahia e de outros municípios do estado e foram encaminhados ao Ambulatório de Oncogenética do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia entre 2008 e 2018 para avaliação e indicação de diagnóstico molecular de mutações germinativas.

A execução do estudo foi devidamente aprovada pela CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa e registrado na Plataforma Brasil, CAAE 37352114.5.0000.5032.

Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e atenderam um ou mais critérios de inclusão, tais como: (1) história pessoal e familiar para HBOC de acordo com as diretrizes da NCCN (Version 2.2019) [22] e nos critérios da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO, American Society of Clinical Oncology, 2017) e (2) probabilidade superior a 10% de portar mutação em *BRCA* calculado pelo modelo preditivo BRCAPro [23, 24]. Em seguida, os pacientes foram submetidos a um questionário clínico-epidemiológico, para coleta de informações pessoais e ancestralidade. A ascendência foi considerada, brasileira, se os pais do paciente nasceram no Brasil e não referiram ancestrais em segundo grau de outro grupo populacional.

### *Extração de DNA genômico*

O DNA genômico obtido de sangue periférico foi extraído utilizando o kit comercial DNeasy® Blood & Tissue QIAGEN® kit (Austin, TX, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas

no espectrofotômetro Nanodrop KASVI®. Para realização da técnica de MLPA recomenda-se que a razão A260:A280 nm, esteja entre 1.8 e 2.0 e a concentração do DNA, variando entre 80ng/μL a 150ng/ μL.

#### *Análise para rearranjos genômicos em BRCA por MLPA*

A análise de rearranjos genômicos, nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foi realizada por MLPA® (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - MRC-Holland, Amsterdam, Holanda), técnica utilizada para determinar o número de cópias de determinadas sequências de DNA. Os produtos amplificados obtidos do PCR multiplex, conforme recomendação do fabricante, foram separados por eletroforese em gel capilar em sequenciador ABI PRISM 3130XL e em seguida os dados foram analisados usando o software Coffalyser®, versão: V140721. Os resultados positivos foram confirmados em um experimento independente, realizado em um segunda amostra de DNA. Para triagem do gene *BRCA1* foram utilizados os kits SALSA MLPA P002 e confirmatório, o kit SALSA P087 MLPA. Para análise do gene *BRCA2* os kits SALSA MLPA P090 e P045, e confirmatório, o kit SALSA P077 MLPA. O kit P045 inclui sondas adicionais para triagem do gene *CHECK2* - exons 1, 9, e mutação 1100delC no exon 11.

#### *Deteção da mutação c.156\_157insAlu BRCA2*

Para identificar a mutação de c.156\_157insAlu, foram utilizadas as técnicas de MLPA (kit SALSA MLPA P045) e reação em cadeia da polimerase (PCR) conforme descrito em estudo anterior [19, 20]. Para controle da reação foi usada uma amostra positiva para a mutação c.156\_157insAlu. Em outra etapa da análise, 20% das amostras (escolhidas aleatoriamente) submetidas a técnica de PCR, foram sequenciadas pra confirmação dos resultados.

### *Análise estatística*

Na análise dos dados foi utilizado o programa estatístico SPSS versão 18. Para análise descritiva, as variáveis categóricas foram descritas por suas frequências absolutas e as variáveis quantitativas foram expressas como a média e desvio padrão (DP); o nível de significância de 0,05 foi considerado aceitável. Para calcular o risco associado a presença de grandes rearranjos genômicos em pacientes com câncer, foi realizada uma análise entre duas categorias de variáveis dependentes com o programa Winpepi versão 3.85.

## Resultados

### *Perfil clínico e epidemiológico da amostra*

Os dados clínicos dos 292 pacientes incluídos no estudo estão sumarizados na Tabela 1. A amostra é constituída, em maioria, por mulheres (98,9%) e por menor número de indivíduos do sexo masculino (1,02%), a média da idade de diagnóstico foi 42 anos (DP±11,2). O diagnóstico de câncer em idade igual ou inferior a 50 anos ocorreu em 73,3% dos casos, em 19,5% dos participantes, acima dos 50 anos, 7,2% dos pacientes não tinham diagnóstico de câncer, porém apresentavam história familiar para a doença. A idade de diagnóstico do primeiro tumor variou dos 15 aos 78 anos, sendo o câncer de mama o mais frequente (80%). A localização unilateral responde por 78,7% dos tumores diagnosticados. O segundo câncer mais frequente foi de ovário (4,4%), seguido pelos cânceres de mama masculino (1%) e câncer de útero (0,3%). Câncer de mama e ovário ocorreu em 3,7% da amostra. Somados, a frequência de casos de câncer de mama e outro tumor primário como: intestino, útero, estômago, laringe, linfoma de Hodgkin e parótida foi de 3,0%. A frequência de recidiva do primeiro câncer foi de 24%.

A maioria dos pacientes (84%) afirmaram ter história familiar de risco para câncer. Em 16%, a história familiar de câncer era inexistente ou desconhecida, contudo possuíam história pessoal de risco, com diagnóstico da doença em idade precoce (< 50 anos) portanto, encontravam-se elegíveis para o teste genético.

A respeito da classificação racial a amostra foi composta por brancos (36,3%), negros (6,8%), mestiços (56,5%), e outros (0,003%), a maior parte dos indivíduos referiram ancestralidade brasileira (48,3%) e europeia (30,6%). Ascendência indígena (14%) e africana (5,3%) foram referidas. Ancestralidade japonesa, árabe e israelense também foram mencionadas (1,6%).

**Tabela 1** - Dados clínico-epidemiológicos da amostra analisada

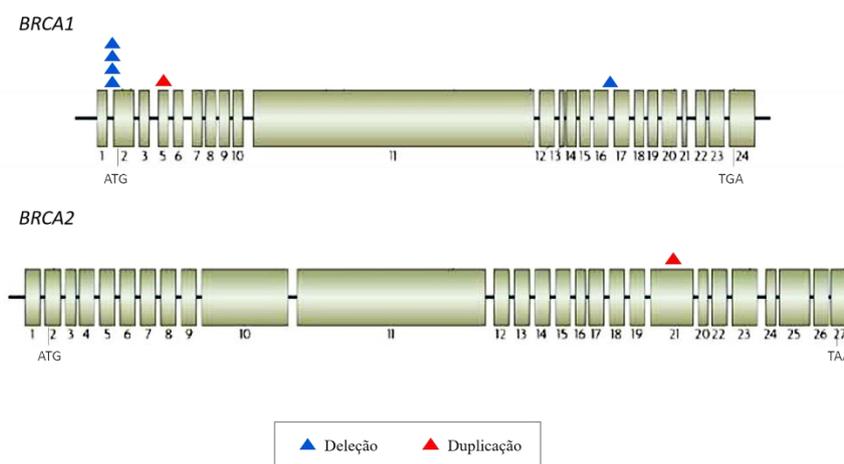
Características		N	%	Idade média $\pm$ DP
<b>Sexo</b>	Feminino	289	98,9	
	Masculino	3	1,02	
<b>Idade</b>				42,0 $\pm$ 11,2
<b>Idade ao Diagnóstico</b>	15-30	33	11,3	
	31-40	100	34,3	
	41-50	81	27,7	
	51-60	34	11,6	
	61-78	23	7,9	
	NA	21	7,2	
<b>História Pessoal/Familiar</b>	Com história familiar de câncer <sup>a</sup>	245	84	42,2 $\pm$ 11,3
	Sem história familiar de câncer <sup>b</sup>	47	16	38,6 $\pm$ 10,4
<b>Tipo de Câncer</b>	Mama unilateral	230	78,7	
	Ovário	13	4,4	
	Mama bilateral	4	1,3	
	Mama e ovário	11	3,7	
	Mama/outros tumores primários	9	3,0	
	Útero	1	0,3	
	Mama masculino	3	1,0	
	Sem câncer	21	7,2	
<b>Classificação raça/cor</b>	Mestiço	165	56,5	
	Branco	106	36,3	
	Negro	20	6,8	
	Outros	1	0,003	
<b>Idade da menopausa<sup>c</sup></b>				47,1 $\pm$ 7,1

Abreviações: DP, desvio padrão; NA, não aplicável; <sup>a</sup> Pacientes com historia familiar segundo criterios da NCCN e ASCO; <sup>b</sup> Pacientes com diagnóstico de cancer antes dos 50 anos; <sup>c</sup> Menopausa não induzida por cirurgia.

### *Características clínicas dos pacientes com Grandes Rearranjos em BRCA1 e BRCA2*

Rearranjos genômicos em *BRCA1* e *BRCA2* foram identificados em sete pacientes, 2,4% da amostra (Fig 1). No primeiro caso (CM007) foi identificada uma deleção envolvendo os exons 16 e 17 no gene *BRCA1* (c.4675+467\_5075-990del). A paciente foi diagnosticada com câncer de ovário aos 49 anos e câncer de mama aos 55 anos, o *score* de risco para mutação em *BRCA1* de 76,9% e de

13,3% para *BRCA2*, calculado pelo BRCAPro. A história familiar e pessoal da paciente foi considerada de alto risco para síndrome hereditária de câncer de mama e ovário (Fig. 2A) No segundo caso (CM049) foi identificada uma duplicação no exon 21 em *BRCA2*. A paciente foi diagnosticada com câncer de ovário aos 39 anos e câncer de mama aos 42 anos, risco para mutação em *BRCA1* foi de 99,4% e de 0,5% para mutação em *BRCA2* (Fig 2B). O terceiro caso (CM172) tinha uma duplicação do exon 5 em *BRCA1*. A paciente foi diagnosticada com câncer de mama aos 33 anos e câncer de colorretal aos 58 anos, o risco calculado foi de 4,7% e de 1,7% para *BRCA1* e para *BRCA2*, respectivamente. Embora, a taxa de risco seja considerada baixa, a prematuridade do câncer de mama foi critério importante para inclusão da paciente na análise (Fig 2C).



**Figura 1:** Distribuição dos rearranjos genômicos identificados em *BRCA1* e *BRCA2* em 7 pacientes.

Em quatro casos foi identificada a deleção dos exons 1-2 de *BRCA1*, todas as pacientes tiveram diagnóstico de câncer de mama, duas delas em idade inferior a 45 anos (CM589; CM721), o que justificou a elegibilidade para o teste genético. A paciente CM200 obteve diagnóstico de câncer de mama aos 55 anos e *score* de risco de 35,4% para probabilidade de mutação em *BRCA1*. Duas pacientes foram diagnosticadas com um segundo tumor primário: intestino (CM718) e ovário (CM721) e *score* de risco para mutação em *BRCA1* de 11,2% e 18%, respectivamente. A história familiar das pacientes consta na figura 2 (D, E, F).

Sobre a ancestralidade referida, cinco das sete pacientes informaram ter contribuição ancestral europeia juntamente com brasileira ou africana e duas afirmaram ter ancestralidade brasileira e indígena (Tab. 2). Dados sobre ancestralidade, quando bem definidos, geram informações importantes a respeito da migração de indivíduos portadores de variantes genéticas e podem explicar como uma mutação específica pode tornar-se frequente em uma determinada região que não a de origem.

Dos 292 pacientes genotipados para identificação de LGRs, 130 também realizaram sequenciamento de Sanger e NGS para identificação de mutações pontuais (os 162 pacientes restantes ainda serão analisados por sequenciamento).

Entre as sete pacientes identificadas com rearranjos genômicos, duas (1,5%), apresentavam também mutação pontual, patogênica. Na paciente CM049, a variante identificada foi c.211A>G (p.Arg71Gly) no gene *BRCA1* e na paciente CM718, a variante c.2T>C (p.Met1Thr) em *BRCA2* (Tab. 2). A ocorrência de uma segunda mutação é rara e esses achados são de extrema importância para definir estratégias de redução do risco da doença entre as pacientes.

**Tabela 2** – Características dos indivíduos com rearranjos genômicos em *BRCA1* e *BRCA2*

Caso	Exon deleção/duplicação	Outras variantes	Idade do diagnóstico	Risco BRCAPro <i>BRCA1/BRCA2</i>	Ancestralidade referida
CM007	del 16-17 ( <i>BRCA1</i> )	-	49	76,9/13,3	BRA/BRA
CM049	dup 21 ( <i>BRCA2</i> )	c.211A>G (p.Arg71Gly) <i>BRCA1</i>	39	99,4/0,5	BRA/IND
CM172	dup 5 ( <i>BRCA1</i> )	-	33	1,7/1,7	POR/POR
CM200	del 1-2 ( <i>BRCA1</i> )	-	55	35,4/19,5	AFR/EUR
CM589	del 1-2 ( <i>BRCA1</i> )	-	38	7,0/3,0	BRA/ITA
CM718	del 1-2 ( <i>BRCA1</i> )	c.2T>C (p.Met1Thr) <i>BRCA2</i>	60	11,2/13,6	BRA/POR
CM721	del 1-2 ( <i>BRCA1</i> )	-	34	18,0/7,0	BRA/POR

Abreviações: BRA, ancestralidade brasileira; IND, indígena; POR, portuguesa; EUR, europeia; AFR, africana; ITA, italiana; del, deleção; dup, duplicação.

Estudos afirmam que a presença de LGRs em pacientes com câncer, parece estar associada a um incremento nas características de risco, como: surgimento da doença em idade precoce e ocorrência de um segundo tumor primário. Deste modo, calculamos o risco de aumento da severidade da doença entre pacientes LGR positivos (Tab. 2 e 3) e pacientes LGR negativos, mas com mutação pontual (Tab.

Supl. 1). As variáveis utilizadas foram: presença de um segundo tumor primário e idade precoce do câncer. Significativamente, a presença de LGRs aumenta o risco para segundo tumor primário entre pacientes (OR=23.1, p=0,001). O aumento do risco para ocorrência da doença em idade precoce em pacientes LGR positivos, não foi significativo (OR= 0,81 p= 0,6).

Os rearranjos identificados em *BRCA2* duplicação do exon 21, e em *BRCA1* duplicação do exon 5, ainda não foram descritos na literatura e ensaios adicionais serão necessários para caracterização molecular dessas alterações. A mutação fundadora portuguesa c.156\_157insAlu não foi encontrada na amostra. Informaram ancestralidade portuguesa 21% dos pacientes entrevistados. Os relatórios dos pacientes LGRs positivos, gerados pelo programa Coffalyser estão disponibilizados em material suplementar 1.

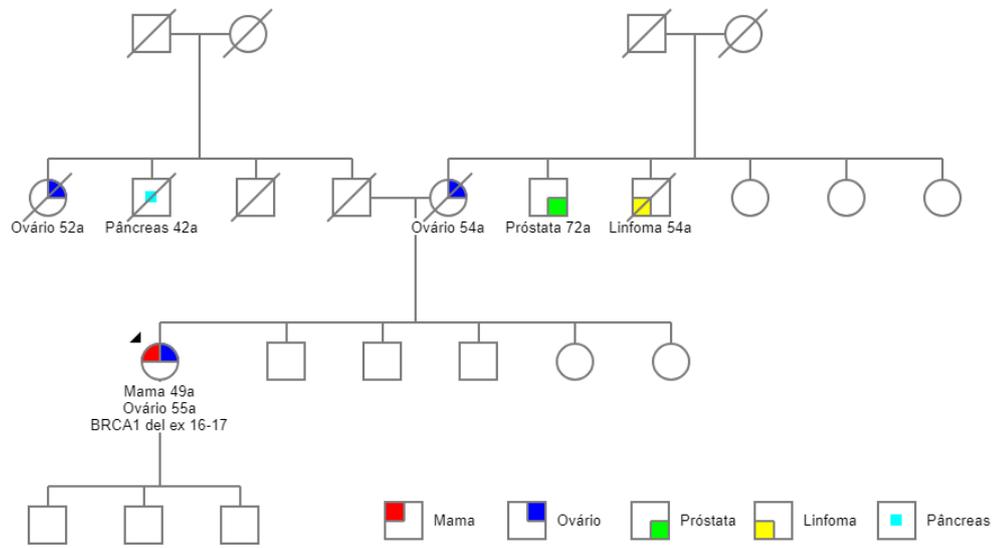
O tipo histológico predominante entre tumores de mama foi o carcinoma ductal infiltrante (CDI) de grau III e o tumor de ovário foi o segundo tumor primário mais frequente. A análise imunohistoquímica dos tumores de mama revelou que o perfil recorrente foi aquele que apresentava o fenótipo: receptor de estrógeno (RE) negativo, progesterona (RP) negativo e HER-2 negativo, conhecido como triplo negativo, importante clinicamente por ser considerado o mais agressivo e de pior prognóstico (Tabela 3).

**Tabela 3** - Tipo de câncer e características do tumor em pacientes LGR positivos

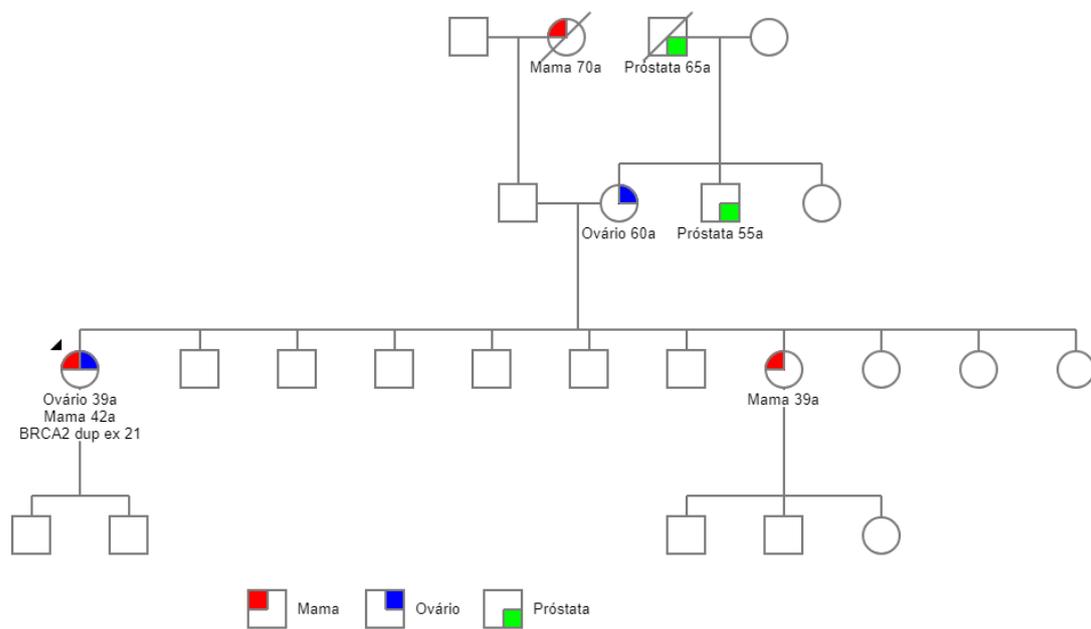
Caso	Tipo de câncer	Estadiamento tumoral	Histologia	Imunohistoquímica				
				ER	PR	HER2	TP53	Ki67
CM007	Mama e ovário	Grau III	CDI /Adenocarcinoma seroso	NEG	NEG	NEG	POS	POS
CM049	Mama e ovário	Grau III	CDI/ Cistoadenocarcinoma seroso	NEG	NEG	NEG	POS	POS
CM172	Mama e intestino	-	CDI/ -	-	-	-	-	-
CM200	Mama	-	CDI	-	-	-	-	-
CM589	Mama	Grau III	CDI	NEG	NEG	NEG	POS	POS
CM718	Mama e intestino	Grau III	CDI/ Adenocarcinoma mucinoso	POS	NEG	NEG	-	POS
CM721	Mama e ovário	Grau III	CDI/ - Adenocarcinoma seroso	POS	NEG	POS	POS	-

Abreviações: CDI, carcinoma ductal invasivo de mama; POS, positivo; NEG, negativo; ER, receptor de estrógeno; PR, receptor de progesterona, HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2; TP53, proteína tumoral p53; Ki67, marcador de proliferação ki67 e dados ausentes ou desconhecidos (-).

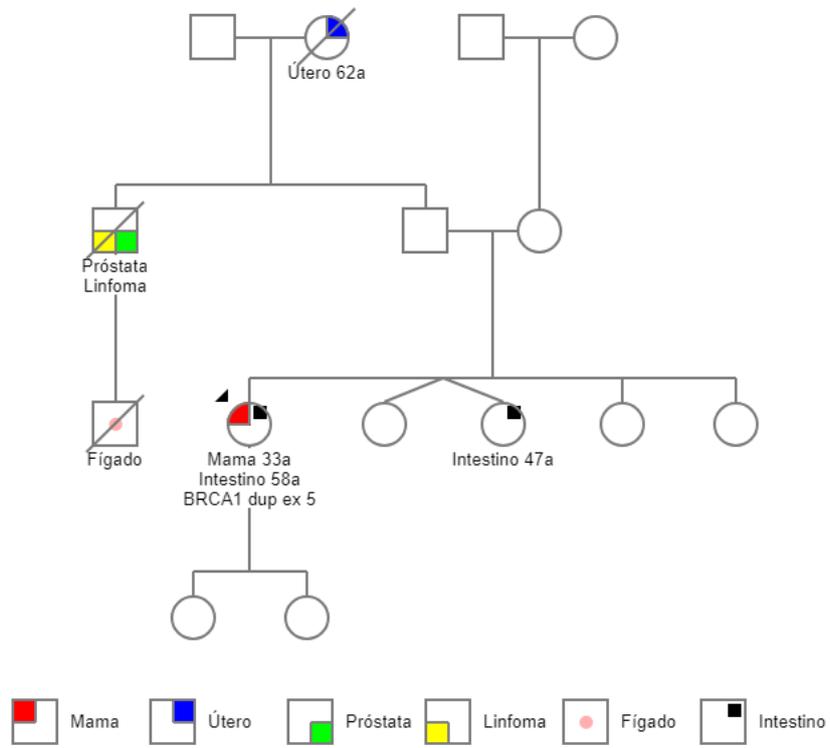
(A)



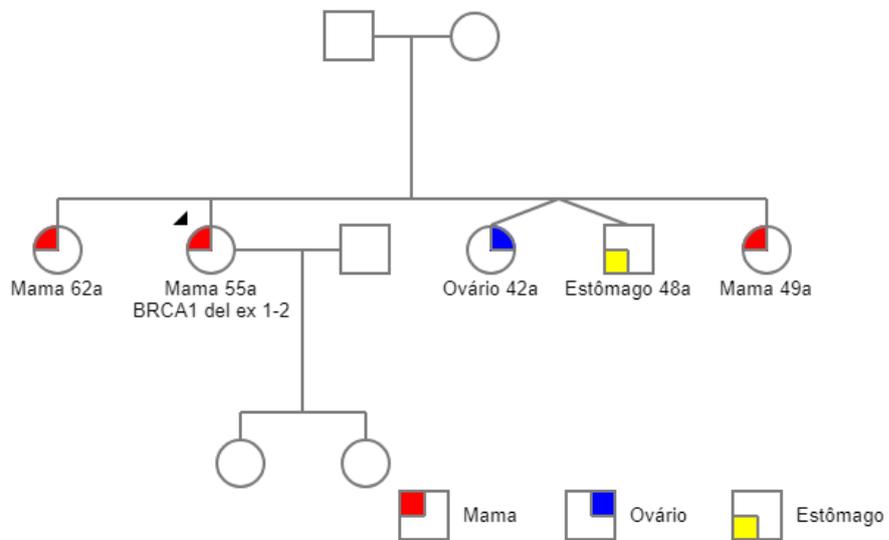
(B)



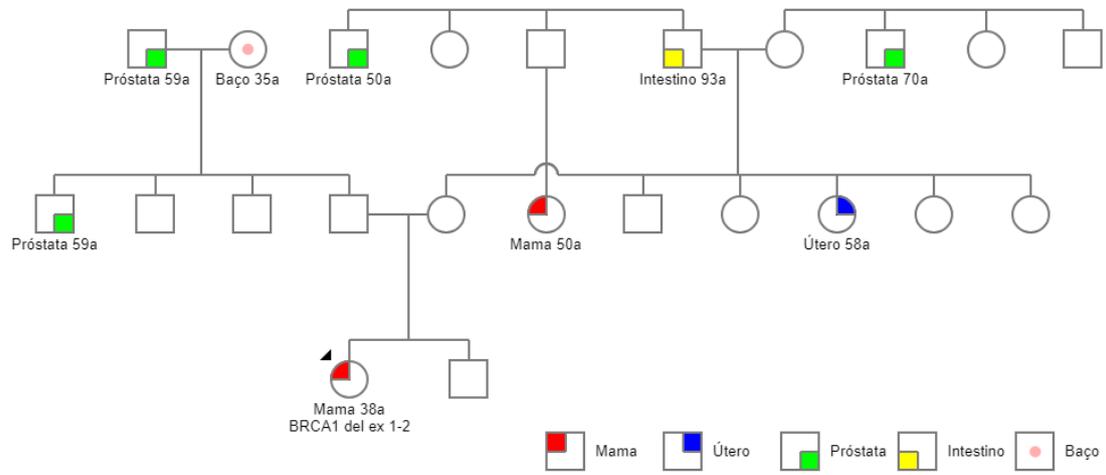
(C)



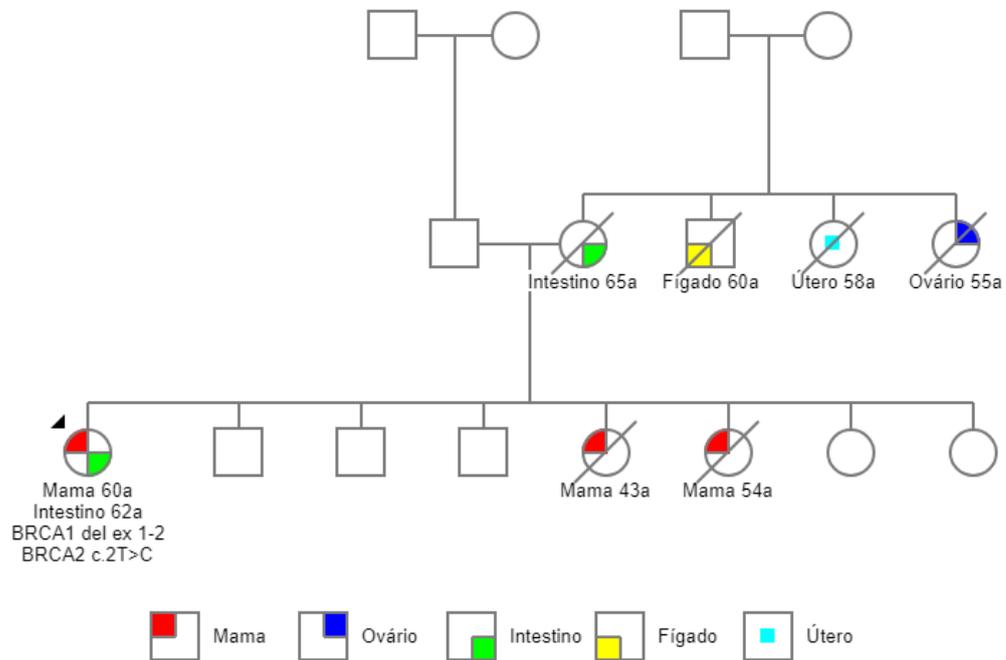
(D)



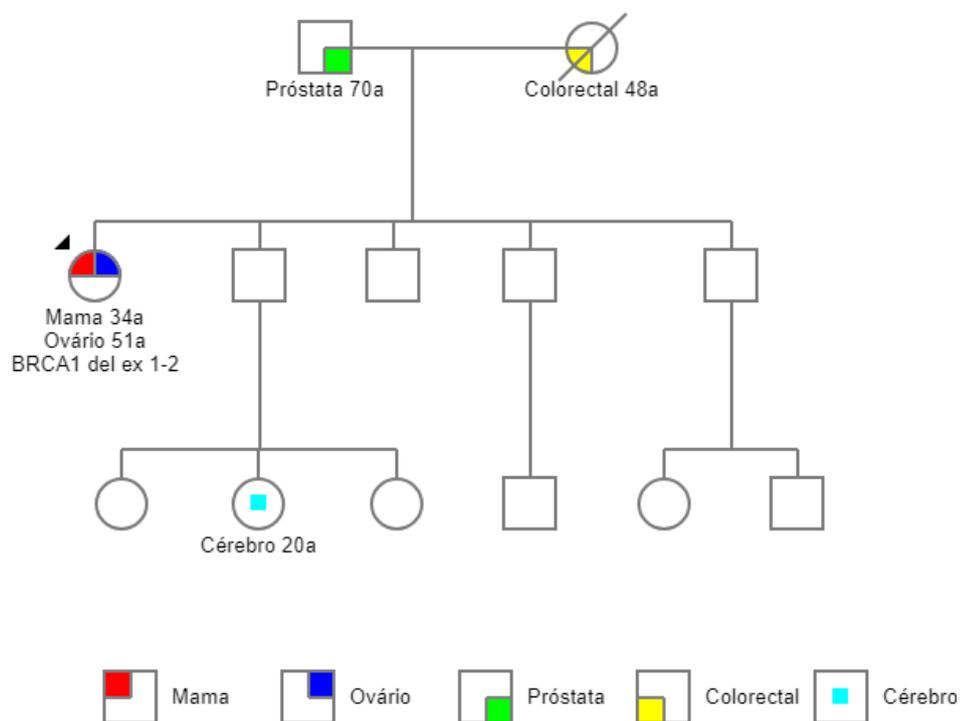
(E)



(F)



(G)



**Figura 2** - Genealogia dos casos identificados com rearranjos genômicos em *BRCA1* e *BRCA2*. (A) Caso CM007 (*BRCA1* deleção exons 16-17). (B) Caso CM049 (*BRCA2* duplicação exon 21). (C) Caso CM172 (*BRCA1* duplicação exons 5). (D, E, F, G) Casos CM200, CM589, CM718, 721 (*BRCA1* deleção exons 1-2). Os rearranjos genômicos foram identificados por MLPA, com sondas de *screening* (em duplicata) e confirmados (em duplicata) por outro conjunto de sondas.

## Discussão

Este foi o primeiro estudo realizado na região Nordeste com o objetivo de genotipar por meio da técnica de MLPA, mutações germinativas do tipo grandes rearranjos genômicos em *BRCA1* e *BRCA2*. Realizamos a triagem em uma amostra de 292 pacientes com história familiar de câncer de mama e/ou ovário. Foram identificados em seis pacientes, três rearranjos em *BRCA1*, deleção exon 16-17 (c.4675+467\_5075-990del), deleção exon 1-2 e duplicação exon do 5. Em *BRCA2*, uma duplicação do exon 21, foi observada em uma paciente (Fig 1). A ocorrência de rearranjos genômicos encontrados no estudo foi de 2,4%, sendo semelhante a outras frequências encontradas em estudos prévios envolvendo a triagem de rearranjos genômicos em *BRCA* desenvolvidos no Brasil [21, 25, 26, 27, 28, 29].

A deleção dos exons 16-17 foi descrita pela primeira vez em uma paciente australiana sem nenhuma outra mutação em *BRCA* [30]. O rearranjo é comum e tem sido descrito em outras populações, sendo identificado mais frequentemente em indivíduos com ancestralidade Latino/Caribenha [7, 31]. Em estudo publicado por Jackson e colaboradores (2014), o mesmo rearranjo foi identificado em uma participante com ascendência latina e europeia, o que corrobora com os dados sobre ocorrência dessa variante em latinos. A consequência dessa mutação é a perda dos aminoácidos 1559-1692 que representam os exons 16 e 17 do gene *BRCA1*. A perda desses exons afeta drasticamente a função do gene e por isso é descrita como patogênica [21, 30, 31], levando a predisposição ao câncer. Em nosso estudo, a mutação foi detectada em uma paciente com câncer de ovário aos 49 anos e câncer de mama aos 55 anos, com *score* de risco de 76,9% para mutação em *BRCA1*. A paciente foi diagnosticada com carcinoma ductal invasivo (CDI) de mama, de grau III, triplo negativo (Tab 3). Estudos sugerem que a presença de dois tumores, câncer em idade precoce, CDI triplo negativo, alta taxa de risco calculada por preditores, mais de um parente com câncer de mama e/ou ovário, além da ancestralidade do indivíduo, estariam significativamente associados ao diagnóstico positivo de grandes rearranjos [31, 32].

Em quatro pacientes não relacionadas foi identificada a deleção dos exons 1-2 de *BRCA1*. Um estudo realizado na Holanda [33], classificou essa alteração como patogênica combinando análises de haplótipos, LOH (perda de heterozigosidade), array-CGH, identificação da posição dos pontos de quebra que permitiram identificar a deleção de 8 kb (começando no intron 2 de *NBR2* e finalizando no intron 2 de *BRCA1*) compreendendo região promotora de *BRCA1*, sugerindo que o transcrito de RNA não era produzido.

Todas as pacientes com essa alteração foram acometidas com câncer de mama, no entanto, duas delas foram diagnosticadas também com outro câncer primário. A idade de diagnóstico foi inferior a 45 anos em dois casos e os tumores de mama classificados por anatomia patológica como CDI (Tab.3). Esse rearranjo tem ampla distribuição principalmente entre indivíduos europeus e sugere-se que ocorre com certa frequência em indivíduos de origem alemã e holandesa [7, 10, 33, 34]. No Brasil, um estudo realizado em São Paulo testou 100 mulheres com câncer de mama e ovário e identificou este rearranjo, em uma paciente com diagnóstico de câncer de mama aos 50 anos que referiu ancestralidade brasileira e europeia [35]. Em nosso estudo, as quatro pacientes informaram ancestralidade europeia. A contribuição ancestral tem caráter importante do ponto de vista da herança genética, uma vez que fluxos migratórios podem ter influenciado na frequência de mutações deletérias, além da sua região de origem. Para Fernandes e colaboradores (2016) a ancestralidade genética da população é um fator importante que pode influenciar na incidência, prognóstico e mortalidade de pacientes com câncer de mama [36] e evidências sugerem que a origem ancestral pode estar relacionada ao aumento na incidência de câncer. Um trabalho desenvolvido por Fejerman e colaboradores [37] na população mexicana, mostrou que para cada 25% de aumento na ascendência europeia, houve um aumento de 20% no risco de câncer de mama. No Brasil, até o momento, nenhuma associação foi encontrada entre ancestralidade genética e o perfil de mutações já identificados em *BRCA* [36]. O conhecimento sobre a variabilidade mutacional de uma população pode contribuir para definir estratégias economicamente viáveis para identificação de famílias HBOC, mas em populações heterogêneas como a

brasileira, onde o espectro de mutações é muito diversificado e mutações fundadoras podem ter diferentes origens como Europa, Ásia e África, a tarefa é mais laboriosa [38, 39, 40].

Embora o rearranjo deleção dos exons 1-2 *BRCA1* esteja bem caracterizado, existem pelo menos seis pontos de quebra distintos que determinam a alteração [41], portanto é possível identificar em uma mesma região geográfica portadores da mutação com diferentes segmentos de DNA deletado [33]. O mecanismo de rearranjo mais comum que leva a deleção dos exons 1A, 1B e 2 de *BRCA1* envolve recombinação homóloga entre  $\Psi$ *BRCA1* e *BRCA1*. A deleção remove o gene *NBR2* e a região promotora de *BRCA1* resultando em um gene quimérico que compreende os exons de 1 a 2 de  $\Psi$ *BRCA1* que se fundem aos exons 3-24 de *BRCA1* [41]. Ensaio moleculares adicionais como LR-PCR (PCR de longo alcance) seguido de sequenciamento de Sanger [9] serão necessários para determinar a região gênica onde ocorreram os pontos de quebra dos rearranjos del exons 1-2 *BRCA1* encontrados em nosso estudo.

A duplicação do exon 5 em *BRCA1* e a duplicação do exon 21 em *BRCA2* encontrados em duas pacientes com câncer de mama e intestino; e câncer de mama e ovário, respectivamente, ainda não foram descritos na literatura e outras análises realizadas por PCR em tempo real e/ou PCR de longo alcance seguido de sequenciamento para identificação dos pontos de quebra tem sido sugeridas como técnicas complementares para melhor caracterização dessas alterações. O MLPA é uma ferramenta muito eficaz para detecção de grandes deleções e duplicações [42]. No entanto, a precisão dos resultados para detecção de deleção ou duplicação de um único exon é discutível, em contraste com os resultados da deleção ou duplicação de múltiplas sequências de exons [43, 44]. Nas alterações envolvendo múltiplos exons contíguos, a confirmação é fornecida por proporções de dosagem das sondas vizinhas, sendo o resultado positivo consistente. No entanto, nos casos onde uma única sonda indica a alteração, é essencial verificar a ausência de variantes, nos locais de ligação, que pode afetar a hibridização da sonda. Nestes casos, o uso de uma técnica alternativa para confirmação é fortemente recomendada, particularmente no manejo clínico. Em estudo recente, realizado na

Tunísia, [45] um ensaio de PCR quantitativo em tempo real foi desenvolvido com o propósito de confirmar deleções ou duplicações de exons únicos em *BRCA*, houve 100% de concordância entre os resultados da técnica de MLPA e do PCR em tempo real.

Para Köhler e colaboradores, [46] variações no número de cópias cujo significado clínico ainda permanece desconhecido pode representar variação polimórfica neutra ou transmitir fenótipos clínicos, por indução de efeitos de dosagem de genes ou por desregulação de genes. A interpretação e classificação destas alterações é sobretudo complexa, uma vez que a associação de rearranjos genômicos a fenótipos clínicos é relativamente recente [47]. Portanto, avaliar como a presença de CNVs em um dado gene pode estar associado a características fenotípicas observadas no paciente é necessário, mas ainda um desafio [46].

A respeito a severidade do câncer, sugere-se que existe associação entre casos LGRs patogênicos e um somatório de características individuais de alto risco como câncer bilateral, diagnóstico inferior aos 45 anos, ocorrência de múltiplos tumores primários, câncer de ovário, câncer de mama masculino, e alto risco preditivo para mutações em *BRCA1/2* calculado pelos modelos de estimativa ou pelas tabelas de prevalência de mutação [31, 32, 45]. Em nossa amostra a presença de LGRs em pacientes com câncer foi significativamente, associado a maior agressividade da doença (OR=23.1, p=0,001). Um estudo realizado na Austrália, com 2003 famílias, afirmou que ocorrência de câncer de mama contralateral é duas vezes maior entre pacientes LGRs positivos (p=0,03), e a idade média de diagnóstico foi de 42,5 anos para indivíduos com LGRs, versus 46,7 anos para aqueles não portadores de LGRs (p=0,008). Além disso, dados sobre a história familiar dos participantes revelaram que entre pacientes LGRs positivos há aumento no número de familiares com câncer de mama e/ou de ovário (3,7 vs 2.8) [32].

No Brasil, os dados a respeito da ocorrência de grandes rearranjos são escassos. Em um estudo realizado com 145 indivíduos não relacionados, com diagnóstico de câncer de mama e história pessoal e/ou familiar sugestiva para síndrome de HBOC foi encontrada a frequência de 2,75% para rearranjos em

*BRCA1* e de 2,0% em *BRCA2*, nesse caso a alteração identificada foi exclusivamente a mutação fundadora portuguesa c.156\_157insAlu em *BRCA2*, encontrada em pacientes da região sudeste e sul do país [21]. Um estudo recente [48], relacionou 649 variantes patogênicas e provavelmente patogênicas de 28 centros de pesquisa do Brasil, concluindo que, até o momento, a frequência de rearranjos genômicos em *BRCA* não excede 5% de todas as mutações e, 34% destas, correspondem a mutação fundadora portuguesa c.156\_157insAlu. Os probandos identificados com esse rearranjo no Brasil eram de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul. No Nordeste brasileiro, ainda não há registros sobre a ocorrência da mutação fundadora portuguesa c.156\_157insAlu [49], apesar do fluxo migratório da população portuguesa para esta região no início do século XVI. Mais tarde, no final do século XVIII, um número de imigrantes portugueses muito superior (aproximadamente 15.000) ao que aportou na região nordeste fixaram-se na cidade do Rio de Janeiro [50]. Este fluxo para a região sudeste, possivelmente contribuiu para a ocorrência da mutação c.156\_157insAlu na população carioca atual. A classificação da mutação c.156\_157insAlu como fundadora, se dá em detrimento da sua alta frequência na população de Portugal [9, 19, 20], e portanto, a ocorrência dessa mesma alteração no Brasil está implicado com fluxo migratório da população portuguesa para terras brasileiras provavelmente durante o século XVI. As baixas frequências para grandes rearranjos em *BRCA1* e para a mutação fundadora c.156\_157insAlu encontradas no estudo realizado no Brasil, podem estar relacionadas ao pequeno tamanho da amostra analisada e, portanto, sendo necessários estudos adicionais mais abrangentes a fim de identificar a taxa de ocorrência dos grandes rearranjos no Brasil.

A frequência e o tipo dos rearranjos genômicos encontrados em diferentes populações, é influenciado pela ancestralidade genética, por isso, obter dados moleculares sobre as populações, podem contribuir para melhorar a saúde de indivíduos com potencial risco para câncer, por meio da implementação de medidas preventivas e tratamento personalizadas.

Estas observações demonstram os desafios associados com a triagem dos indivíduos. A maioria dos estudos que evidenciam a frequência de rearranjos genômicos em *BRCA1* e *BRCA2* em indivíduos com história familiar para síndrome HBOC tem selecionado indivíduos somente após o resultado negativo do sequenciamento desses genes [7, 9, 21]. Considerando o custo e complexidade da reação de sequenciamento completo, é plausível levar em consideração a realização da triagem dos pacientes com suspeita de portar mutações causadas por grandes rearranjos no primeiro momento, uma vez que as técnicas de sequenciamento convencionais não detectam rearranjos genômicos. Dessa maneira, estudos de triagem para grandes rearranjos levando em consideração a ancestralidade genética da população poderiam ser mais eficientes e com menor custo. No Brasil, contudo, devido ao grau de miscigenação da população as estratégias para análise de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* devem ser adequadas à esta realidade. Além disso, as ferramentas para cálculo do risco de mutação em genes de susceptibilidade, também devem estar adaptadas as características genéticas de cada grupo populacional.

Ao considerarmos que o diagnóstico de mutação patogênica em pacientes de risco para HBOC é fundamental para implementação de medidas profiláticas capazes de reduzir o risco de câncer de mama e ovário, inferimos que a recomendação de testes genéticos abrangentes para triagem de pequenas mutações tais como substituições ou pequenas inserções e deleções de nucleotídeos por meio de sequenciamento genético, associado ao estudo de rearranjos genômicos através da técnica de MLPA viabiliza uma abordagem complementar essencial para uma ampla análise das mutações em *BRCA*, proporcionando melhor desfecho nos prognósticos dos pacientes.

## Referências

1. LALLOO F., EVANS D.G. Familial breast cancer. **Clinical Genetics** v.82, n.2, p.105–14, 2012.
2. MERSCH, J. et al. Cancers associated with *BRCA1* and *BRCA2* mutations other than breast and ovarian. **Cancer** v.121, p.269–75, 2015.
3. GARIBAY, R., G. et al. Characterization of four novel *BRCA2* large genomic rearrangements in Spanish breast/ovarian cancer families: review of the literature, and reevaluation of the genetic mechanisms involved in their origin. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 1, p. 273–283, 2012.
4. PAL, T. et al. *BRCA* sequencing and large rearrangement testing in young Black women with breast cancer. **Journal of community genetics**, v. 5, n. 2, p. 157–165, 2014.
5. ARMOUR JA, Barton DE, Cockburn DJ, Taylor GR. The detection of large deletions or duplications in genomic DNA. **Human Mutation**, v.20, p.325-337, 2002.
6. RUDNICKA, H. et al. Large *BRCA1* and *BRCA2* genomic rearrangements in Polish high-risk breast and ovarian cancer families. **Molecular Biology Reports**, v. 40, n. 12, p. 1–5, 2013.
7. JUDKINS, T. et al. Clinical significance of large rearrangements in *BRCA1* and *BRCA2*. **Cancer**, v.118, n.21, p.5210–5216, 2012.
8. ENYEDI, M. Z. et al. Simultaneous detection of *BRCA* mutations and large genomic rearrangements in germline DNA and FFPE tumor samples. **Oncotarget**, v. 7, n. 38, 2016.
9. FACHAL, L. et al. Large genomic rearrangements of *BRCA1* and *BRCA2* among patients referred for genetic analysis in Galicia (NW Spain): delimitation and mechanism of three novel *BRCA1* rearrangements. **PloS one**, v.9, n.3, p.e93306, 2014.
10. PREISLER-ADAMS S., SCHÖNBUCHNER I., FIEBIG B., WELLING B., DWORNICZAK B AND WEBER BH. Gross rearrangements in *BRCA1* but not *BRCA2* play a notable role in predisposition to breast and ovarian cancer in high-risk families of German origin. **Cancer Genetics Cytogenetics** v.168, p.44-49, 2006.
11. KWONG, A. et al. The importance of analysis of long-range rearrangement of *BRCA1* and *BRCA2* in genetic diagnosis of familial breast cancer. **Cancer Genetics**, p. 1–7, 2015.

12. PETRIJ-BOSCH A, PEELEN T, VAN VLIET M, VAN EIJK R, OLMER R, DRÜSEDAU M, HOGERVORST FB, HAGEMAN S, ARTS PJ, LIGTENBERG MJ, et al. *BRCA1* genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. **Nature Genetics**. v.17, p.341-345, 1997.
13. HANSEN T.O., et al. Large *BRCA1* and *BRCA2* genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. **Breast Cancer Research Treatment**. n.115, 315–323 p. 2009.
14. WOODWARD A.M., et al. Large genomic rearrangements of both *BRCA2* and *BRCA1* are a feature of the inherited breast/ ovarian cancer phenotype in selected families. **Journal of Medical Genetics**, v.3, n.42, 2005.
15. KANG P, et al. Large *BRCA1* and *BRCA2* genomic rearrangements in Malaysian high risk breast ovarian cancer families. **Breast Cancer Research Treatment**. n.124, p.579–584, 2010.
16. BUFFONE A., et al. Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* genomic rearrangements in a cohort of consecutive Italian breast and/or ovarian cancer families. **Breast Cancer Research and Treatment**, n.106, p.289–296, 2007.
17. TICHA I., et al. Screening for genomic rearrangements in *BRCA1* and *BRCA2* genes in Czech high-risk breast/ovarian cancer patients: high proportion of population specific alterations in *BRCA1* gene. **Breast Cancer Research and Treatment**, n.124, p.337–347, 2010.
18. WALSH T, et al. Spectrum of mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, and *TP53* in families at high risk of breast cancer. **JAMA** n. 295, p.1379–1388, 2006.
19. PEIXOTO A, SANTOS C, ROCHA P, PINHEIRO M, et al. The c.156\_157insAlu *BRCA2* rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious BRCA mutations in northern/central Portugal. **Breast Cancer Research and Treatment** v.114, p.31–38, 2009.
20. PEIXOTO A, SANTOS C, PINHEIRO M, PINTO P, et al. International distribution and age estimation of the Portuguese *BRCA2* c.156\_157insAlu founder mutation. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.127, p. 671–679, 2011.
21. EWALD, I. P. et al. *BRCA1* and *BRCA2* rearrangements in Brazilian individuals with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. **Genetics and Molecular Biology** v. 231, p. 223–231, 2016.
22. BERRY, M. P. National Comprehensive Cancer Network, Version 2.2019 Familial High-Risk Assessment: **Breast and Ovarian**. 2019.

23. BERRY D.A., PARMIGIANI G., SANCHEZ J., SCHILDKRAUT J., WINER E. Probability of carrying a mutation of breast-ovarian cancer gene *BRCA1* based on family history 11. **Journal Natl Cancer Institute**. v.89 p. 227-238, 1997.
24. PARMIGIANI G., BERRY D., AGUILAR O. Determining carrier probabilities for breast cancer-susceptibility genes *BRCA1* and *BRCA2*. **Am Journal Human Genetics** v.62, p. 145–158, 1998.
25. CARRARO, D. M. et al. Comprehensive analysis of *BRCA1*, *BRCA2* and *TP53* germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. **PLoS One** v.8, e57581, 2013.
26. FERNANDES, G. C. et al. Prevalence of *BRCA1/BRCA2* mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. **Oncotarget** v.49, p.80465–81, 2016.
27. SILVA, F. C. et al. Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. **BMC Medical Genetics** v.15, n.55, 2014.
28. MAISTRO, S. et al. Germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* in epithelial ovarian cancer patients in Brazil. **BMC Cancer** v.16, n.934, 2016.
29. ALEMAR, B. et al. *BRCA1* and *BRCA2* mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population? **PLoS One**, v.12, p.e0187630, 2017.
30. CARVALHO, M. et al. NIH Public Access. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 660, n. 1–2, p. 1–11, 2010.
31. JACKSON, S. A. et al. Characteristics of Individuals with Breast Cancer Rearrangements in *BRCA1* and *BRCA2*. **Cancer**. p. 1557–1564, 2014.
32. JAMES, P. A et al. Large genomic rearrangements in the familial breast and ovarian cancer gene *BRCA1* are associated with an increased frequency of high risk features. **Familial cancer**. v.14, n.2, p.287-295, 2015.
33. VAN DEN OUWELAND, A. M. W et al. Deletion of Exons 1a–2 of *BRCA1* : A Rather Frequent Pathogenic Abnormality. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 13, n. 3, p. 399–406, 2009.
34. ENGERT S, W. B., et al. MLPA screening in the *BRCA1* gene from 1.506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of

exon 17, and occurrence in single early onset cases. **Human Mutation**, v. 29, p.948–958, 2008

35 MAISTRO, S. et al. Germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* in epithelial ovarian cancer patients in Brazil. **BMC Cancer**, v. 16, n. 934, p. 1–8, 2016.

36. FERNANDES, G. C. et al. Prevalence of *BRCA1/BRCA2* mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. **Oncotarget**, v. 7, n. 49, p. 80465–80481, 2016.

37. FEJERMAN L, et al. European ancestry is positively associated with breast cancer risk in Mexican women. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v.194, p. 1074–1082, 2010.

38. ASHTON-PROLLA, P.; VARGAS, F. R. Prevalence and impact of founder mutations in hereditary breast cancer in Latin America. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, p. 234–240, 2014.

39. DUTIL, J. et al. The spectrum of *BRCA1* and *BRCA2* alleles in Latin America and the Caribbean: a clinical perspective. **Breast cancer research and treatment**, v. 154, n. 3, p. 441–453, 2015.

40. 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. **The oncologist**, v. 21, n. 7, p. 832–839, 2016.

41. SLUITER M.D.; VAN RENSBURG E.J. Large genomic rearrangements of the *BRCA1*, *BRCA2* genes: review of the literature, report of a novel *BRCA1* mutation. **Breast Cancer Research Treatment** v.125, n.2, p.325-349, 2011.

42. HÖMIG-HÖLZEL C.; SAVOLA S. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in tumor diagnostics and prognostics. **Diagnostic Molecular Pathology**, v.21, n. 4, p.189-206, 2012

43. EIJK-VAN O. S.; SCHOUTEN J. P. Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) for the detection of copy number variation in genomic sequences. **Methods Molecular Biology**, v. 688, p.97-126, 2011.

44. WEHNER M, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: pitfalls in deletion screening in *MSH2* and *MLH1* genes. **European Journal Human Genetics**. v.13, p.983–986, 2005.

45. RIAHI, A.; CHABOUNI-BOUHAMED, H.; KHARRAT, M. Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* large genomic rearrangements in Tunisian high risk breast /

ovarian cancer families : Implications for genetic testing. **Cancer Genetics**, v. 210, p. 22–27, 2017.

46. KÖHLER, S. et al. Clinical interpretation of CNVs with cross-species phenotype data. *Journal of Medicine and Genetics*. v. 51, n. 11, p. 766–772, 2015.

47. ZHANG, F.; GU, W. et al. Copy Number Variation in Human Health, Disease, and Evolution, **Annual Review of Genomics Human Genetics**. v.10, p.451–481, 2010.

48. PALMERO, E. I. et al. The germline mutational landscape of *BRCA1* and *BRCA 2* in Brazil. **Scientific Reports** (Nature), v.8, n. 9188, p. 1–10, 2018.

49. FELIX, G. E. S. et al. Germline mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* and *TP53* in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population. **Human Genome Variation**, v. 1, p.e14012, 2014.

50. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Brasil 500 anos de povoamento**. Centro de Documentação e Disseminação de Informações IBGE: Rio de Janeiro: Brasil, 2007.

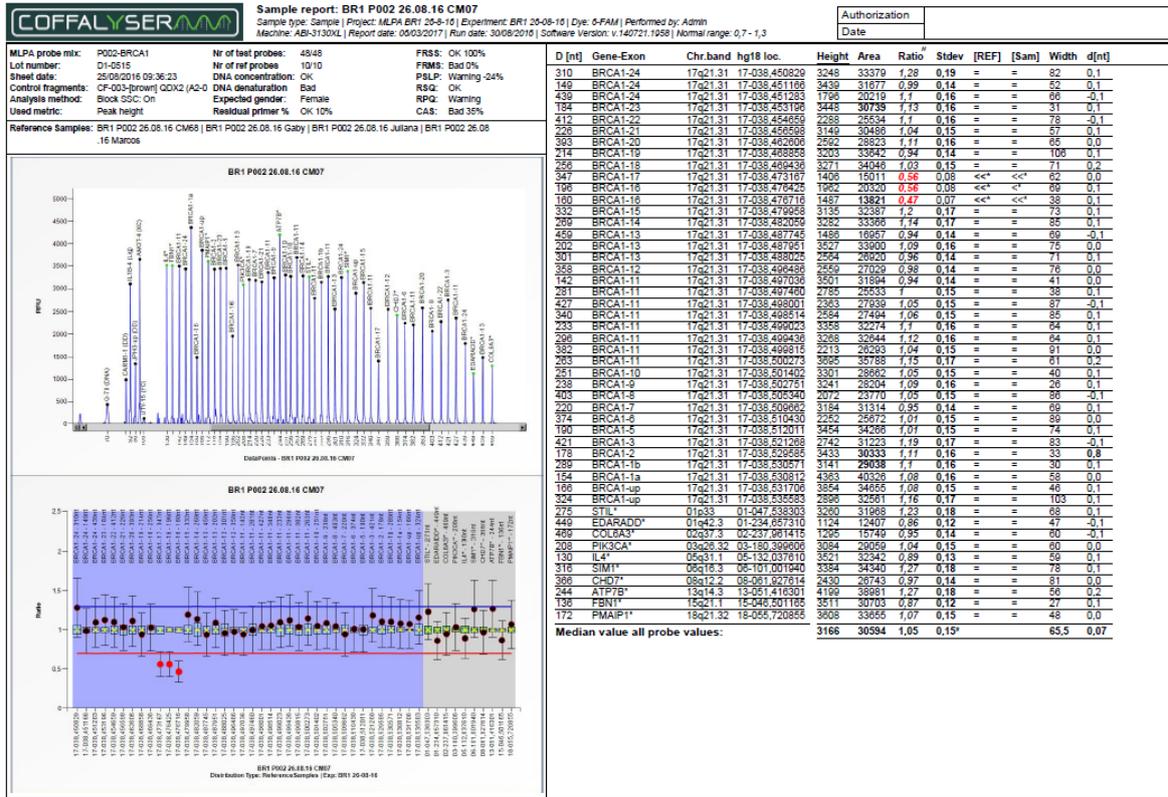
Tabela suplementar 1 - Características de pacientes diagnosticados com mutações pontuais\*

Caso	Variantes	Idade do diagnóstico	Tipo de Cancer	Risco	
				<i>BRCA1</i> / <i>BRCA2</i>	
ACM015	<i>P TEN</i> :c.421C>T (VUS)	48	Mama	0,2	0,2
ACM076	<i>NBN</i> :c.156_157delTT	56	Mama	-	-
ACM088	<i>BRIP1</i> :c.1741C>T	40	Mama	-	-
CM003	<i>BRCA2</i> :c.2108delC	42	Mama	2,00	91,60%
CM023	<i>BRCA1</i> :c.3331_3334delCAAG	36	Mama	64,3	13,2
CM033	<i>BRCA1</i> :c.1115G>A	36	Mama e Ovário	16,9	11,6
CM048	<i>BRCA1</i> :c.211A>G	39	Mama	99,4	0,4
CM125	<i>CHEK2</i> :c.592+3A>T 9 (VUS)	40	Mama	5,6	4,5
CM130	<i>BRCA1</i> :c.825_826insGCCATGTGGA	64	Mama e Tireoide	32,5	11,8
CM179	<i>BRIP1</i> :c.2392C>T	42	Mama e Ovário	0,1	0,1
CM211	<i>SLX4</i> :c.4828delT	28	Mama	0,1	9
CM223	<i>BRCA1</i> :c.3331_3334delCAAG	28	Mama	80,6	11,3
CM242	<i>BRCA1</i> :c.211A>G	41	Mama	73,9	15,8
CM245	<i>CHEK2</i> :c.1141A>G (VUS)	49	Mama	2,1	3,2
CM247	<i>BRCA2</i> :c.5904_5907delAGTC	34	Mama	5,9	5,1
CM252	<i>BRCA1</i> :c.211A>G	52	Mama	-	-
CM266	<i>PALB2</i> :c.1671_1674delTATT	35	Mama	3	2,5
CM277	<i>PALB2</i> :c.1671_1674delTATT	49	Mama	-	-
CM278	<i>BRIP1</i> :c.2097+1G>C	52	Mama	0,1	0,5
CM293	<i>PALB2</i> :c.355delC	49	Mama	14,2	9,3
CM297	<i>ATM</i> :c.3801delG	38	Mama	1	12,6
CM309	<i>FANCM</i> :c.5766_5769delGACT	38	Mama	17,7	5,2
CM315	<i>CHEK2</i> :c.1141A>G (VUS)	47	Mama	20,6	17
CM318	<i>BRCA2</i> :c.7672G>T	27	Mama	3,1	2,9
CM322	<i>FAM175A</i> :c.1011delA	43	Mama	5,1	3,9
CM362	<i>BRCA2</i> :c.1389_1390delAG	47	Mama	0,8	12,1
CM385	<i>TP53</i> :c.1010G>A	28	Mama	40	17,6
CM389	<i>BRCA1</i> :c.1327A>T	34	Mama	8	5,8
CM403	<i>BRCA2</i> :c.8488-1G>A	34	Mama	3	2,3
CM420	<i>BRCA1</i> :c.3331_3334delCAAG	38	Mama	44,7	20,1
CM440	<i>BRCA2</i> :c.736delT	42	Mama	58,7	26,5
CM512	<i>ATM</i> :c.7913G>A	38	Mama	89,8	4,5
CM243	<i>BRCA1</i> :c.470_471delCT	60	Mama	37,5	17,1
CM536	<i>BRCA2</i> :c.1389delAG	46	Mama	8,8	6,8
CM550	<i>BRCA1</i> :c.3331_3334delCAAG	26	Mama	4,4	3,0
CM564	<i>BRCA1</i> :c.5251C>T	40	Mama	2,1	1,7
CM569	<i>BRCA2</i> :c.9945delA	35	Mama	12,7	11,2
CM575	<i>BRCA2</i> :c.3860delA, <i>BARD1</i> :c.1921C>T	41	Mama	0,7	0,9
CM581	<i>BRCA2</i> :c.6938-1G>C	43	Mama	15,5	17,4
CM582	<i>BRCA2</i> :c.2T>G	49	Mama e Ovário	31,3	22,1
CM590	<i>ATM</i> :c.8264_8268delATAAG	41	Breast	5,2	4,4

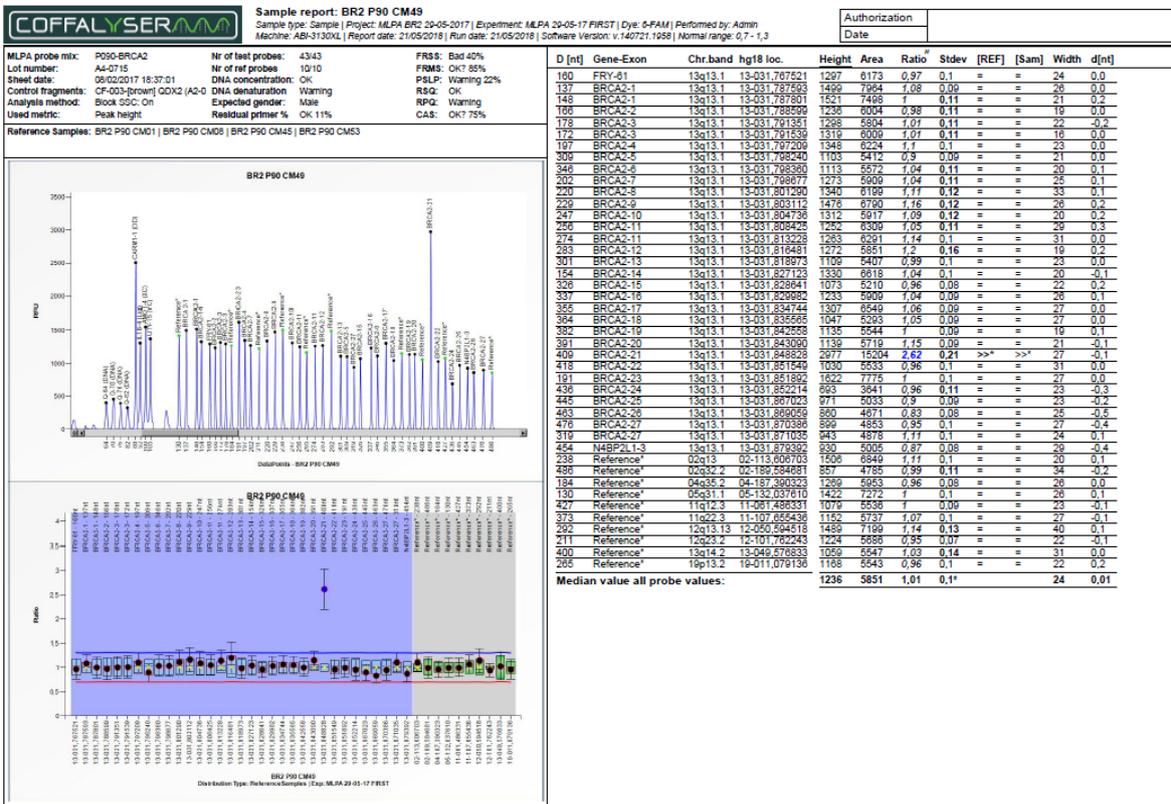
\*Dados não publicados (Felix, et al., 2018. Comunicação pessoal)

Material suplementar 1. Relatório da análise de MLPA dos pacientes com rearranjos em *BRCA1/BRCA2*

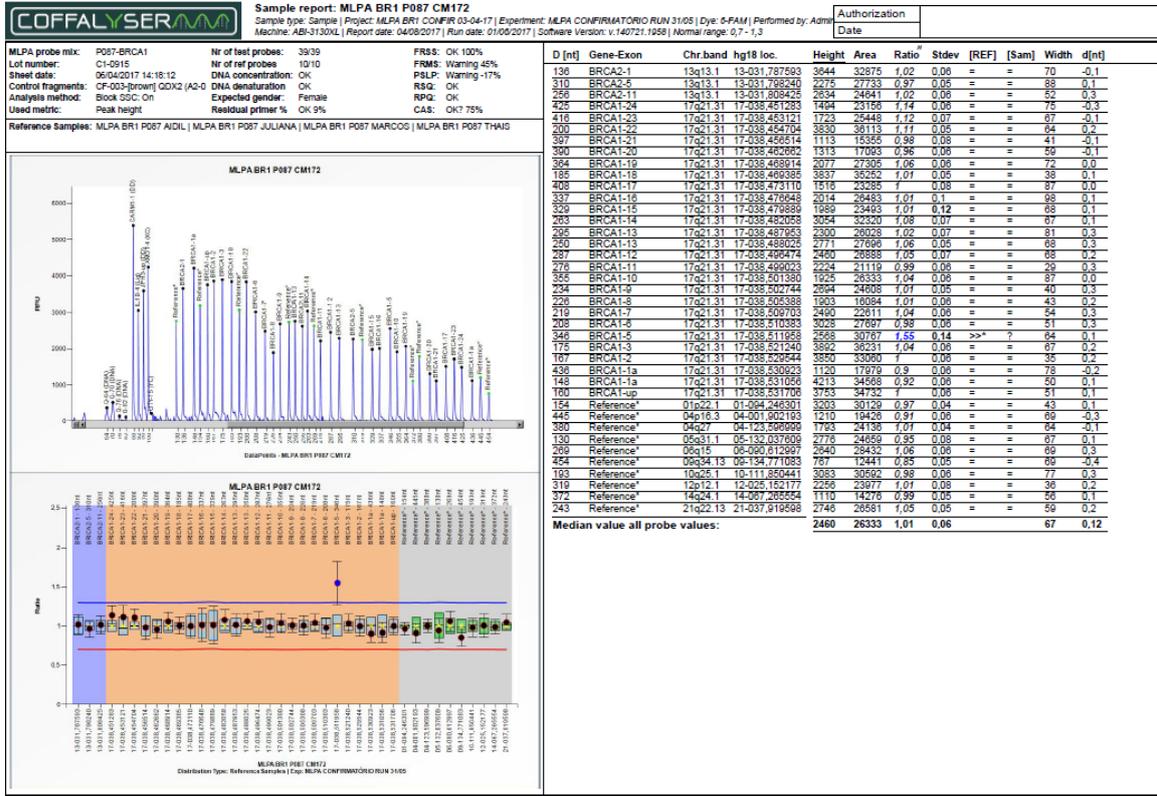
CM007



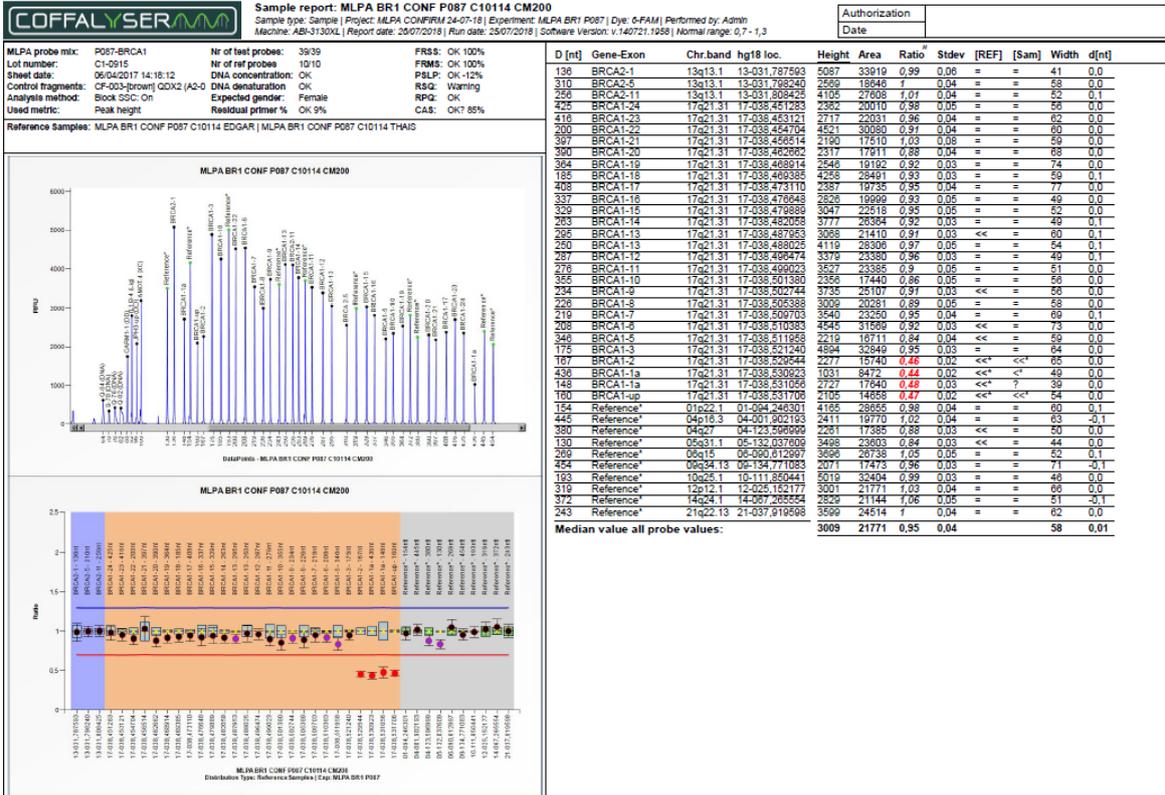
CM 49



CM172



CM200



CM589



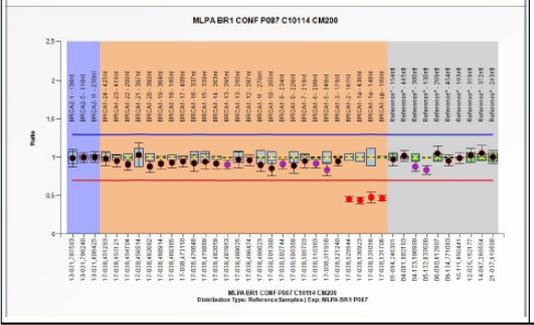
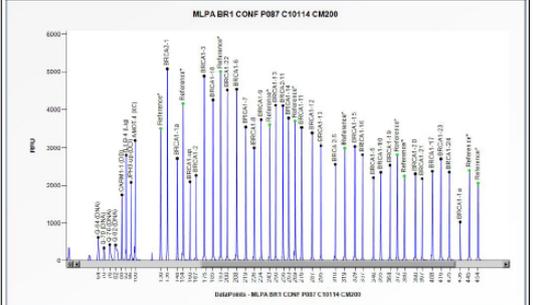
Sample report: MLPA BR1 CONF P087 C10114 CM200

Sample type: Sample | Project: MLPA CONF BR1 24-07-18 | Experiment: MLPA BR1 P087 | Dye: 4-FAM | Performed by: Admin  
Machine: ABI3130XL | Report date: 25/07/2018 | Run date: 25/07/2018 | Software Version: v.140721.1058 | Normal range: 0.7 - 1.3

Authorization
Date

MLPA probe mix: POST-BRC1A1	Nr of test probes: 39/39	FRS: OK 100%
Lot number: C1-0915	Nr of ref probes: 10/10	FRMS: OK 100%
Sheet date: 06/04/2017 14:18:12	DNA concentration: OK	PSLP: OK -12%
Control fragments: CF-003-(brown) QDX2 (A2-Q)	DNA denaturation: OK	RSQ: Warning
Analysis method: Block SSC: On	Expected gender: Female	RPIQ:
Used metric: Peak height	Residual primer %: OK 9%	CAS: OK 85%

Reference Samples: MLPA BR1 CONF P087 C10114 EDGAR | MLPA BR1 CONF P087 C10114 THAI



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	[Sam]	Width	d[nt]
136	BRCA2-1	13q13.1 13-031.787593	5087	33919	0.99	0.05	=	=	41	0.0
310	BRCA2-5	13q13.1 13-031.788240	2669	18946	1	0.04	=	=	58	0.0
256	BRCA2-11	13q13.1 13-031.808426	4105	27608	1.01	0.04	=	=	82	0.1
425	BRCA2-24	17q21.31 17-038.451283	2382	20010	0.98	0.05	=	=	56	0.0
418	BRCA1-23	17q21.31 17-038.453121	2717	23031	0.96	0.04	=	=	82	0.0
200	BRCA1-22	17q21.31 17-038.454704	4521	30350	0.97	0.04	=	=	80	0.0
397	BRCA1-21	17q21.31 17-038.456514	2190	17510	1.03	0.08	=	=	59	0.0
380	BRCA1-20	17q21.31 17-038.462892	2317	17911	0.86	0.04	=	=	88	0.0
384	BRCA1-19	17q21.31 17-038.465814	4546	31192	0.92	0.03	=	=	74	0.0
185	BRCA1-18	17q21.31 17-038.468385	4248	28491	0.92	0.03	=	=	59	0.1
408	BRCA1-17	17q21.31 17-038.473110	2387	19735	0.95	0.04	=	=	77	0.0
337	BRCA1-16	17q21.31 17-038.476948	3636	19999	0.93	0.05	=	=	49	0.0
329	BRCA1-15	17q21.31 17-038.479889	3047	22518	0.95	0.05	=	=	82	0.0
283	BRCA1-14	17q21.31 17-038.482058	3777	26364	0.92	0.03	=	=	49	0.1
295	BRCA1-13	17q21.31 17-038.487955	3088	21410	0.91	0.03	<<	<<	80	0.1
280	BRCA1-13	17q21.31 17-038.488026	4119	28306	0.97	0.05	=	=	54	0.1
257	BRCA1-12	17q21.31 17-038.496974	3319	23380	0.96	0.03	=	=	49	0.1
276	BRCA1-11	17q21.31 17-038.499023	3527	23385	0.9	0.05	=	=	51	0.0
345	BRCA1-10	17q21.31 17-038.501380	2369	17440	0.86	0.05	=	=	56	0.0
234	BRCA1-9	17q21.31 17-038.502744	3735	25107	0.97	0.03	<<	<<	86	0.0
226	BRCA1-8	17q21.31 17-038.505388	3009	20261	0.89	0.05	=	=	58	0.0
219	BRCA1-7	17q21.31 17-038.509703	3540	23260	0.95	0.04	=	=	89	0.1
208	BRCA1-6	17q21.31 17-038.510383	4545	31569	0.92	0.03	<<	<<	73	0.0
348	BRCA1-5	17q21.31 17-038.511958	2219	16711	0.84	0.04	<<	<<	89	0.0
315	BRCA1-4	17q21.31 17-038.512540	4894	32646	0.94	0.03	=	=	64	0.0
167	BRCA1-2	17q21.31 17-038.529544	2277	15740	0.48	0.02	<<<	<<<	85	0.0
436	BRCA1-1a	17q21.31 17-038.530923	1031	8472	0.44	0.02	<<<	<<<	49	0.0
148	BRCA1-1a	17q21.31 17-038.531056	2727	17840	0.48	0.03	<<<	<<<	39	0.0
180	Reference*	04p16.3 04-001.856999	4105	14855	0.92	0.02	<<<	<<<	54	0.1
154	Reference*	01p22.1 01-094.248301	4185	28855	0.98	0.04	=	=	60	0.1
445	Reference*	04p16.3 04-001.802193	2411	16770	1.02	0.04	=	=	83	-0.1
454	Reference*	06q24.13 06-133.596999	2071	17335	0.98	0.03	<<	<<	29	0.0
193	Reference*	12p12.1 12-025.152341	2019	33494	0.93	0.03	=	=	46	0.0
319	Reference*	12p12.1 12-025.152177	3001	21771	1.03	0.04	=	=	66	0.0
372	Reference*	14q24.1 14-067.285554	2829	21444	1.06	0.05	=	=	51	-0.1
243	Reference*	21q22.13 21-037.819598	3669	24514	1	0.04	=	=	82	0.0

Median value all probe values: 3069 21771 0.95 0.04 58 0.01

CM718



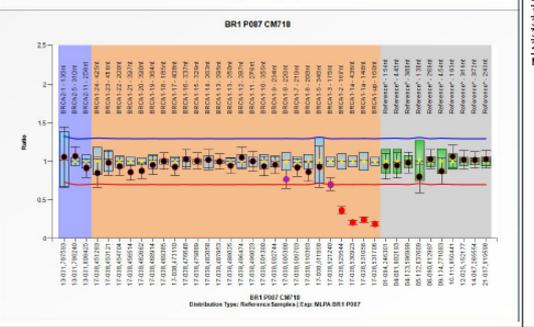
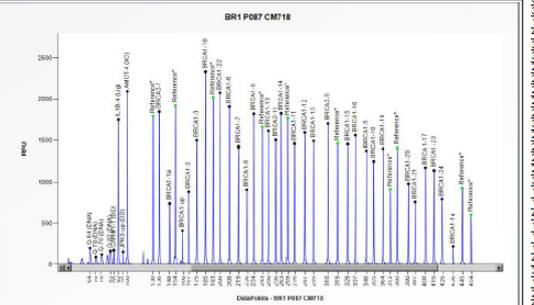
Sample report: BR1 P087 CM718

Sample type: Sample | Project: MLPA CONF BR1 25-09-18 | Experiment: MLPA BR1 P087 | Dye: 4-FAM | Performed by: Admin  
Machine: ABI3130XL | Report date: 20/11/2018 | Run date: 28/09/2018 | Software Version: v.140721.1058 | Normal range: 0.7 - 1.3

Authorization
Date

MLPA probe mix: POST-BRC1A1	Nr of test probes: 39/39	FRS: OK 100%
Lot number: C1-0915	Nr of ref probes: 10/10	FRMS: Bad 35%
Sheet date: 06/04/2017 14:18:12	DNA concentration: OK	PSLP: Bad -30%
Control fragments: CF-003-(brown) QDX2 (A2-Q)	DNA denaturation: Bad	RSQ: Warning
Analysis method: Block SSC: On	Expected gender: Female	RPIQ:
Used metric: Peak height	Residual primer %: OK 6%	CAS: Bad 35%

Reference Samples: BR1 P087 AIDL | BR1 P087 CM324 | BR1 P087 JULIANA | BR1 P087 MARCIO



D [nt]	Gene-Exon	Chr.band hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	[Sam]	Width	d[nt]
136	BRCA2-1	13q13.1 13-031.787593	1847	12495	1.06	0.19	=	=	49	0.0
310	BRCA2-5	13q13.1 13-031.788240	7035	12483	1.07	0.08	=	=	80	-0.1
256	BRCA2-11	13q13.1 13-031.808426	1608	9997	0.92	0.05	=	=	46	0.0
425	BRCA2-24	17q21.31 17-038.451283	789	8600	0.85	0.09	=	=	70	0.1
418	BRCA1-23	17q21.31 17-038.453121	1141	8737	0.98	0.08	=	=	61	0.0
200	BRCA1-22	17q21.31 17-038.454704	2078	13345	0.94	0.05	=	=	49	0.5
397	BRCA1-21	17q21.31 17-038.456514	760	5698	0.86	0.05	=	=	83	0.0
380	BRCA1-20	17q21.31 17-038.462892	980	7455	0.88	0.05	=	=	57	0.0
384	BRCA1-19	17q21.31 17-038.465814	1406	10489	0.96	0.05	=	=	69	0.1
185	BRCA1-18	17q21.31 17-038.468385	2333	15184	1.01	0.05	=	=	70	0.0
408	BRCA1-17	17q21.31 17-038.473110	1175	8072	0.93	0.06	=	=	57	0.0
337	BRCA1-16	17q21.31 17-038.476948	1569	11269	1.03	0.08	=	=	82	-0.1
329	BRCA1-15	17q21.31 17-038.479889	1483	10517	1.01	0.05	=	=	74	-0.1
283	BRCA1-14	17q21.31 17-038.482058	1827	12571	1.03	0.07	=	=	85	0.0
295	BRCA1-13	17q21.31 17-038.487955	1462	10383	1	0.05	=	=	41	0.0
280	BRCA1-13	17q21.31 17-038.488026	1914	10189	0.95	0.05	=	=	51	-0.1
257	BRCA1-12	17q21.31 17-038.496974	1594	11254	1.05	0.07	=	=	49	0.0
276	BRCA1-11	17q21.31 17-038.499023	1459	8678	1.01	0.06	=	=	51	-0.1
345	BRCA1-10	17q21.31 17-038.501380	1263	9215	0.94	0.06	=	=	46	0.0
234	BRCA1-9	17q21.31 17-038.502744	1822	12427	0.96	0.05	=	=	88	0.0
226	BRCA1-8	17q21.31 17-038.505388	908	5973	0.77	0.08	<<	<<	42	0.0
219	BRCA1-7	17q21.31 17-038.509703	1426	8688	0.92	0.08	=	=	79	0.0
208	BRCA1-6	17q21.31 17-038.510383	1910	12833	0.87	0.05	=	=	89	0.0
348	BRCA1-5	17q21.31 17-038.511958	1380	10286	0.93	0.13	=	=	89	0.0
175	BRCA1-3	17q21.31 17-038.521240	1500	10111	0.7	0.04	<<	<<	62	0.0
167	BRCA1-2	17q21.31 17-038.529544	894	5609	0.77	0.03	<<<	<<<	47	0.0
436	BRCA1-1a	17q21.31 17-038.530923	220	1791	0.21	0.01	<<<	<<<	44	0.0
148	BRCA1-1a	17q21.31 17-038.531056	742	4795	0.24	0.02	<<<	<<<	50	0.0
380	Reference*	04p16.3 04-001.856999	1411	10751	0.99	0.07	=	=	45	0.1
193	Reference*	02q31.1 02-132.037609	1795	11786	1.8	0.1	=	=	61	-0.1
289	Reference*	06q15 06-000.812897	1768	12131	1.03	0.08	=	=	44	0.0
454	Reference*	06q24.13 06-133.596999	805	4974	0.89	0.09	=	=	51	0.0
193	Reference*	12p21.1 12-011.850441	2009	13388	1.07	0.07	=	=	69	0.0
319	Reference*	12p12.1 12-025.152177	1461	10425	1.03	0.06	=	=	64	-0.1
372	Reference*	14q24.1 14-067.285554	915	8628	1.02	0.05	=	=	44	0.0
243	Reference*	21q22.13 21-037.819598	1859	11688	1.03	0.06	=	=	47	0.0

Median value all probe values: 1459 10383 0.85 0.06 53 0.0

CM721



Sample report: BR1 P087 conf 2018.11.13 CM721  
 Sample type: Sample | Project: MLPA 21-11-18 CONFIRM BR1 | Experiment: CONFIRM P087 | Dye: 6-FAM | Performed by: Admin  
 Machine: ABI-3130XL | Report date: 29/11/2018 | Run date: 20/11/2018 | Software Version: v.140721.1958 | Normal range: 0.7 - 1.3

Authorization	
Date	

MLPA probe mix: P087-BRCA1  
 Lot number: C1-0916  
 Shred date: 06/04/2017 14:18:12  
 Control fragments: CF-003-[brown] QDX2 [A2-0  
 Analysis method: Block SDC: On  
 Used metric: Peak height

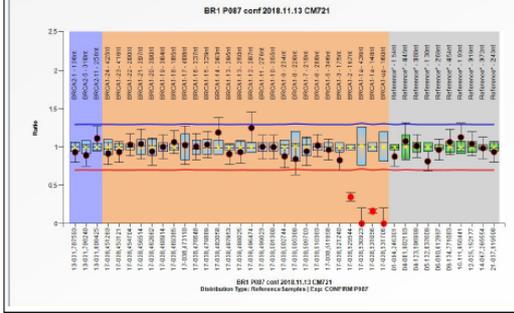
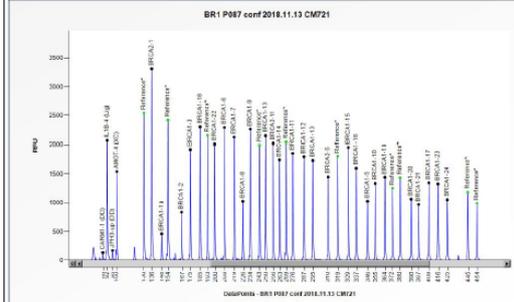
Nr of last probes: 37/39  
 Nr of FAM probes: 17/170  
 DNA concentration: OK  
 DNA denaturation: Bad  
 Expected gender: Female  
 Residual primer %: OK 11%

FRS: OK 100%  
 FRMS: Bad 35%  
 FSLP: OK -3%  
 RSQ: OK  
 RPQ: OK  
 CAS: Warning 50%

Reference samples: BR1 P087 conf 2018.11.13 ALAN | BR1 P087 conf 2018.11.13 CM16 | BR1 P087 conf 2018.11.13 CM  
 017 | BR1 P087 conf 2018.11.13 CM123

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio	Stdev	[REF]	[Sam]	Width	d[nt]
136	BRCA2-1	13q13.1	13-031.787593	3311	24642	0.94	0.07	=	=	59	-0.1
310	BRCA2-5	13q13.1	13-031.798240	1451	11394	0.9	0.07	=	=	50	0.0
256	BRCA2-11	13q13.1	13-031.809425	2025	15266	1.12	0.08	=	=	55	0.1
425	BRCA1-24	17q21.31	17-035.451283	1051	9154	0.95	0.07	=	=	55	-0.1
416	BRCA1-23	17q21.31	17-035.453121	1329	12448	0.94	0.07	=	=	65	0.0
200	BRCA1-22	17q21.31	17-035.454704	2012	14946	1.03	0.07	=	=	54	0.1
397	BRCA1-21	17q21.31	17-035.456514	970	8135	1.04	0.1	=	=	55	-0.1
350	BRCA1-20	17q21.31	17-035.462962	1052	8990	0.95	0.09	=	=	59	0.0
354	BRCA1-19	17q21.31	17-035.468914	1447	11646	1	0.08	=	=	58	0.0
185	BRCA1-18	17q21.31	17-035.469356	2304	17097	1.07	0.08	=	=	58	0.0
408	BRCA1-17	17q21.31	17-035.475110	1347	11561	1.03	0.13	=	=	50	0.0
337	BRCA1-16	17q21.31	17-035.478648	1602	13021	1.01	0.09	=	=	73	0.0
329	BRCA1-15	17q21.31	17-035.479889	1959	15812	1.04	0.09	=	=	70	0.0
263	BRCA1-14	17q21.31	17-035.482055	1145	14031	1.19	0.1	=	=	83	0.1
205	BRCA1-13	17q21.31	17-035.487953	1737	13843	0.97	0.07	=	=	64	0.0
250	BRCA1-12	17q21.31	17-035.488025	2151	16331	0.94	0.07	=	=	62	0.1
297	BRCA1-11	17q21.31	17-035.490474	1799	14155	1.26	0.1	=	=	31	0.0
276	BRCA1-10	17q21.31	17-035.490923	1558	14194	1.07	0.08	=	=	64	0.1
355	BRCA1-9	17q21.31	17-035.501380	1336	10762	1	0.08	=	=	75	0.0
234	BRCA1-8	17q21.31	17-035.502744	2294	17018	0.88	0.08	=	=	59	0.1
220	BRCA1-7	17q21.31	17-035.506358	1027	7583	0.85	0.1	=	=	50	0.1
219	BRCA1-6	17q21.31	17-035.507003	2125	15668	0.95	0.09	=	=	42	0.1
208	BRCA1-5	17q21.31	17-035.510383	2292	16655	1.02	0.07	=	=	41	0.1
345	BRCA1-4	17q21.31	17-035.511858	1038	8219	0.97	0.07	=	=	55	0.0
175	BRCA1-3	17q21.31	17-035.521240	1622	14363	0.83	0.07	=	=	51	0.0
167	BRCA1-2	17q21.31	17-035.529544	836	6480	0.35	0.03	<<c*	<<c*	57	0.0
436	BRCA1-1a	17q21.31	17-035.530623	0	0	0	0	<<c**	<<c**	0	0.0
149	BRCA1-1a	17q21.31	17-035.531056	464	3497	0.16	0.01	<<c*	<<c*	36	0.0
160	BRCA1-up	17q21.31	17-035.531706	0	0	0	0	<<c**	<<c**	0	0.0
154	Reference*	01222.1	01-094.246301	2421	16000	0.88	0.06	=	=	66	0.1
445	Reference*	04616.3	04-001.801163	1154	10335	1.08	0.12	=	=	73	-0.1
380	Reference*	04927.4	04-123.596999	1436	11770	1.02	0.07	=	=	62	-0.1
130	Reference*	05031.1	05-132.037009	2543	18471	0.82	0.06	=	=	40	0.1
269	Reference*	06115	06-069.812691	2443	15509	0.97	0.07	=	=	47	0.0
193	Reference*	06334.13	06-134.771083	993	8904	1.07	0.08	=	=	73	-0.1
193	Reference*	10625.1	10-111.850441	2167	15742	1.13	0.09	=	=	58	0.0
318	Reference*	12612.1	12-025.152177	1807	14447	1.05	0.08	=	=	72	0.0
372	Reference*	14524.1	14-067.265554	1252	10558	0.99	0.07	=	=	68	0.0
243	Reference*	21222.13	21-037.919598	1997	15496	0.94	0.07	=	=	70	0.0

Median value all probe values: 1748 14031 0.99 0.08 58 0.02



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A frequência de grandes rearranjos nos genes *BRCA1* e *BRCA2* encontrados nesta amostra de pacientes da região nordeste foi de 2,4%. Os rearranjos identificados foram: deleção exon 16-17 (c.4675+467\_5075-990del), deleção exon 1-2 e duplicação exon do 5 em *BRCA1*. Duplicação do exon 21, em *BRCA2*.
- A mutação del exon 16-17 e del exon 1-2, ambas em *BRCA1* já estão descritas na literatura e são classificadas como patogênicas. A duplicação do exon 5 de *BRCA1* e duplicação do exon 21 de *BRCA2* ainda não foram descritas em bancos de dados, portanto análises adicionais por meio de PCR em tempo real podem confirmar a presença destas alterações e em seguida, analisar a localização dos pontos de quebra através de PCR de longo alcance, seguido de sequenciamento genético.
- A mutação del exon 1-2 em *BRCA1* foi mais frequente, o que provavelmente pode estar associado a ancestralidade das pacientes, uma vez que referiram ancestralidade de origem europeia. Estudos tem revelado que essa alteração é mais comum na população do continente europeu. A mutação foi encontrada em 4 pacientes, sendo necessário verificar os pontos de quebra do rearranjo, nas diferentes amostras.
- As sete pacientes identificadas com rearranjos genômicos em *BRCA* tiveram diagnóstico de câncer de mama entre 33 e 60 anos todos do tipo CDI (carcinoma ductal infiltrante) de grau III. Cinco delas tiveram um segundo tumor primário (3 de ovário e 2 de intestino). Seis pacientes apresentaram na história familiar ao menos 1 parente em até segundo grau com câncer de mama antes dos 50 anos, além da presença de outros casos de câncer na família. O perfil tumoral mais frequente entre as pacientes foi o triplo negativo.
- Ser portador de rearranjos genômicos em *BRCA* parece estar associado a um incremento nas características de risco, como: surgimento da doença em idade precoce e ocorrência de um segundo tumor primário. Em nossa amostra a presença de LGRs foi associada ao aumento do risco para segundo tumor primário entre pacientes, mas não ao risco do aparecimento da doença em idade precoce.
- A maioria das pacientes mutadas (71,5%) apresentou probabilidade de ter mutação em *BRCA* calculado pelo preditor de risco BRCAPro entre 11,0% e 99,4%. Muitas vezes, uma estimativa de risco baixa, decorre de uma história familiar para câncer pouco informativa. Ainda assim, pacientes com diagnóstico da doença em idade precoce foram considerados elegíveis.
- Não foi possível resgatar ou não haviam informações clínicas completas de alguns pacientes, uma vez que estes dados não foram fornecidos pelos pacientes ou pelas clínicas de origem.
- A recomendação de testes genéticos abrangentes para triagem de pequenas mutações, bem como de rearranjos genômicos em *BRCA* é de fundamental

importância para proporcionar um melhor desfecho nos prognósticos dos pacientes.

## REFERÊNCIAS

AIELLO, N.M. *et al.* Upholding a role for EMT in pancreatic cancer metastasis. **Nature**, v. 547, p. E7–E8, 2017.

ALLEMANI, C. *et al.* Global surveillance of cancer survival 1995 – 2009 : analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries ( CONCORD-2 ). **The Lancet**, v. 385, n. 9972, p. 977–1010, 2015.

ALSOP K., *et al.* *BRCA* mutation frequency and patterns of treatment response in *BRCA* mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 21, p. 2654-2663, 2012.

ALEMAR, B. *et al.* *BRCA1* and *BRCA2* mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population? **PLoS One** v. 12, p. e0187630, 2017.

ALVARENGA, M. *et al.* Contribuição do patologista cirúrgico para o diagnóstico das síndromes do câncer hereditário e avaliação dos tratamentos cirúrgicos profiláticos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** v. 39, n. 2, p.167-177, 2003.

AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY. ASCO. Institute for Quality. **Guidelines, tools and Resources**. [homepage]; 2017. Disponível em: <https://www.asco.org/practice-guidelines/quality-guidelines/guidelines>. Acesso em: agos. 2018.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures** [homepage]; 2017. Disponível em: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annualcancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures>. Acesso em: set. 2018.

AMERICAN SOCIETY OF BREAST SURGEONS. **Position statement on *BRCA* genetic testing for patients with and without breast cancer**. Disponível em: <https://www.breastsurgeons.org>. Acesso em: jul. 2017.

BAILEY S.M. *et al.* Dysfunctional mam- malian telomeres join with DNA double-strand breaks. **DNA Repair**, v. 3, p. 349-357, 2014.

BATZER A. M.; DEININGER P. L. Alu repeats and human genomic diversity. **Nature Review**, v. 3, n. 5, p. 370-379, 2012.

BENUSIGLIO, P. R. *et al.* CDH1 germline mutations and the hereditary diffuse gastric and lobular breast cancer syndrome: a multicentre study. **Journal of Medical Genetics**, v.50, p.486–489, 2013.

BERRY, D. A. *et al.* Probability of carrying a mutation of breast-ovarian cancer gene BRCA1 based on family history 11. **Journal National Cancer Institute**, v. 89 p. 227-238, 1997.

BIC - **Breast Cancer International Core database**, BIC. Disponível em: <http://research.nhgri.nih.gov/bic>. Acesso em: set. 2018.

BIGLIA, N. *et al.* Ovarian cancer in *BRCA1* and *BRCA2* gene mutation carriers : analysis of prognostic factors and survival. **Ecancer**, v. 10, n. 639, p. 1–7, 2016.

BOLTON, K. L. *et al.* Association between *BRCA1* and *BRCA2* mutations and survival in women with invasive epithelial ovarian cancer. **JAMA**, v. 307, p. 382–390, 2012.

BRAGA, P.; LATORRE, M.; CURADO, M. Câncer na infância: análise comparativa da incidência, mortalidade e sobrevida em Goiânia (Brasil) e outros países. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 1, p. 33–44, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. INCA. **Estimativa 2018**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. INCA. **Estimativa 2014**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ: INCA, 2013.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I. **Global Cancer Statistics 2018 : globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 Countries**. 2018. p. 1–31.

BUFFONE A. *et al.* Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* genomic rearrangements in a cohort of consecutive Italian breast and/or ovarian cancer families. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 106, p. 289–296, 2007.

- BUYS, S. S. *et al.* A Study of Over 35000 Women With Breast Cancer Tested With a 25-Gene Panel of Hereditary Cancer Genes. **Cancer**, v. 23, n. 10, p. 1721–1730, 2017.
- CARRARO, D. M. *et al.* Comprehensive analysis of *BRCA1*, *BRCA2* and TP53 germline mutation and tumor characterization: A portrait of early-onset breast cancer in Brazil. **PLoS One**, v. 8, p. e57581, 2013.
- CHEN, S.; PARMIGIANI, G. Meta-Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* Penetrance. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 11, p. 1329–1333, 2007.
- CHIRIVELLA, G. L. I. *et al.* SEOM clinical guidelines in Hereditary Breast and ovarian cancer. **Clinical and Translational Oncology**, v. 17, p. 956–961, 2015.
- CLINVITAE. Disponível em: <http://clinvitae.invitae.com/>. Acesso em: nov. 2018.
- CZENE, K. *et al.* How to treat male breast cancer. **The Breast**, v.16, n. 10, p.147-154, 2007.
- DANIELS, M. J. *et al.* Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein *BRCA2*. **Science**, v. 306, p. 876-879, 2004.
- DANTAS, É. L. R. *et al.* Genética do câncer hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 3, p. 263-269, 2010.
- DENIZ, M.; HOLZMANN, K.; WIESMÜLLER. Functional analysis – make or break cancer predictability. **Mutation Research**, v. 743-744, p. 132-141, 2013.
- DERCHAN, S.F.M.; DUARTE-FRANCO, E.; SARIAN, L.O. Panorama atual e perspectivas ao diagnóstico precoce do câncer de ovário. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetícia**, v. 31, n. 4, p.159-63, 2009.
- DOSSUS, L.; BENUSIGLIO, P. R. Lobular breast cancer: incidence and genetic and non-genetic risk factors. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 546, 2015.
- DUFLOTH, R. M. *et al.* DNA repair gene polymorphisms and susceptibility to familial breast cancer in a group of patients from Campinas, Brazil. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, n. 4, p. 771–782, 2005.

DUTIL, J. *et al.* The spectrum of *BRCA1* and *BRCA2* alleles in Latin America and the Caribbean: a clinical perspective. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 154, n. 3, p. 441–453, 2015.

EASTON D.F., FORD D., BISHOP D.T. Breast and ovarian cancer incidence in *BRCA1*-mutation carriers. Breast Cancer Consortium. **American Journal of Human Genetics**. v.56, n.1, p.265-271,1995.

EDWARDS, E. *et al.* Identification of a *de novo BRCA1* mutation in a woman with early onset bilateral breast cancer. **Familial Cancer**, v.8, n. 4, p. 479-482, 2009.

ELLISEN, L.W.; HABER, D. A. Hereditary breast cancer. **Annual Review Medicine**, v. 49, p. 425-436, 1998.

EUHUS, D. M.; ROBINSON, L. Genetic predisposition syndromes and their management. **Surgery Clinic North American**, v. 93, p. 341-362, 2013.

ESTEVEZ V.F. *et al.* Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations in families with medium and high risk of breast and ovarian cancer in Brazil. **Brazilian Journal of Medicine and Biological Research**, v. 42, n. 5, p. 453–457, 2009.

EWALD I.P., *et al.* Prevalence of the *BRCA1* founder mutation c.5266dup in Brazilian individuals at-risk for the hereditary breast and ovarian cancer syndrome. **Hereditary Cancer Clinical and Practices**, v. 9, p. 12, 2011.

EWALD, I. P. *et al.* *BRCA1* and *BRCA2* rearrangements in Brazilian individuals with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. **Genetics and Molecular Biology** v. 231, p. 223–231, 2016.

FACHAL, L. *et al.* Large genomic rearrangements of *BRCA1* and *BRCA2* among patients referred for genetic analysis in Galicia (NW Spain): delimitation and mechanism of three novel *BRCA1* rearrangements. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e93306, 2014.

FACINA, T. Estimativa 2015: Incidência de Câncer no Brasil. 2015. 2 f. [Revisão] - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 1 n. 60, p. 63-64, 2015.

FELIX, G. E. S. *et al.* Germline mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population. **Human Genome Variation**, v. 1, p. e14012, 2014.

FELIX, G. E. S.; ZHENG, Y.; OLOPADE, O. I. Mutations in context : implications of BRCA testing in diverse populations. **Familial Cancer**, p. 1-13, 2017.

FERNANDES, G. C. *et al.* Prevalence of *BRCA1/BRCA2* mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. **Oncotarget**, v.,49, p.,80465–81, 2016.

FLÓRIA-SANTOS, M. *et al.* Self-reported cancer family history is a useful tool for identification of individuals at risk of hereditary cancer predisposition syndrome at primary care centers in middle-income settings : a longitudinal study. **Genetics and Molecular Biology**, v. 183, p. 178–183, 2016.

FRIEBEL, T. M.; DOMCHEK, S. M.; REBBECK, T. R. Modifiers of Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: systematic review and meta-analysis. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 6, 2014.

FRIEDENSON, B. *BRCA1* and *BRCA2* Pathways and the risk of cancers other than breast or ovarian. **Medscape General Medicine**, v.7, n. 2, p. 60, 2005.

GARCIA, C.F.; GAIESKY, V.L.S.V. Evolução Cromossômica em eucariotos - Rearranjos Cromossômicos e elementos de Transposição, In: CARARETO, C. M. A.; VITORELLO, C. B. M. (Orgs.). **Elementos de transposição: Diversidade, evolução, aplicações e impactos nos genomas dos seres vivos.** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Genética, FIOCRUZ, 2015. p.141-168.

GARIBAY, R. *et al.* Characterization of four novel *BRCA2* large genomic rearrangements in Spanish breast/ovarian cancer families: review of the literature, and reevaluation of the genetic mechanisms involved in their origin. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 133, n. 1, p. 273–283, 2012.

GU, W.; ZHANG, F.; LUPSKI, J. R. Mechanisms for human genomic rearrangements. **PathoGenetics**, v.1, p.4, 2008.

GUTIÉRREZ-ENRÍQUEZ S, *et al.* Screening for large rearrangements of the *BRCA2* gene in Spanish families with breast/ovarian cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 103, p. 103-107, 2007.

HAMILTON, R. Being young, female, and *BRCA* positive. **American Journal of Nursing**, v. 112, p. 26–31, 2012

HANAHAN, D.; WEINBERG R.A. Hallmarks of cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5. p. 646-674, 2011.

HANSEN T.O. *et al.* Large *BRCA1* and *BRCA2* genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. **Breast Cancer Research and Treatment**, n. 115, p. 315–323, 2009.

HATMAN, A. R. FORD, J. M. *BRCA1* induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. **Nature Genetics**, v. 32, p. 180-184, 2002.

HOFF, P. M. G.(Ed.). **Tratado de Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2013. 2829p.

HUEN, M. S.; SY, S.M.;CHEN, J. *BRCA1* and its toolbox for the maintenance of genome integrity. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.11, n. 2, p. 138-148, 2010.

HULKA B.S.; MOORMAN P.G. Breast cancer: hormones and other risk factors. 2001. **Maturitas**, v.38, n.1, p.103-113, 2001.

HUNN, J.; RODRIGUEZ, G.C. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 55, n.1, p. 3-23, 2012.

HUO D.; OLOPADE, O. I. *et al.* Prediction of *BRCA* mutations using the BRCAPRO model in clinic-based African American, hispanic, and other minority families in the United States. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1184–1190, 2009.

ILIAKIS, G. *et al.* Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. **Cytogenetic and Genome Research**, v.104, p.14–20, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Brasil 500 anos de povoamento**. Centro de Documentação e Disseminação de Informações IBGE: Rio de Janeiro.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Magnitude do câncer no Brasil: incidência, mortalidade e tendência. **Informativo Vigilância do Câncer**, n. 3, p. 1-28, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CANCER: **INCA**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: set. 2018.

JACKSON, S. A. *et al.* Characteristics of Individuals With Breast Cancer Rearrangements in BRCA1 and BRCA2. **Cancer**, p. 1557–1564, 2014.

JARA, L. *et al.* Mutations in BRCA1 , BRCA2 and other breast and ovarian cancer susceptibility genes in Central and South American populations. **Biological Research**, v. 50, n. 35, p. 1-18, 2017.

JAMES, P. A. *et al.* Large genomic rearrangements in the familial breast and ovarian cancer gene *BRCA1* are associated with an increased frequency of high risk features. **Familial cancer**, v. 14, n. 2, p. 287-295, 2015.

JUDKINS, T. *et al.* Clinical significance of large rearrangements in *BRCA1* and *BRCA2*. **Cancer**, v. 118, n. 21, p. 5210–5216, 2012.

KANG, P. *et al.* Large *BRCA1* and *BRCA2* genomic rearrangements in Malaysian high risk breast ovarian cancer families. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.124, p. 579–584, 2010.

KASPAREK, T.; HUMPHREY, T. DNA double-strand break repair pathways, chromosomal rearrangements and cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, n. 8, p. 886–897, 2011.

KATAOKA, A. *et al.* Young adult breast cancer patients have a poor prognosis independent of prognostic clinicopathological factors : a study from the Japanese Breast Cancer Registry. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 159, p. 1-10, 2016.

KING, M.C.; MARKS, J. H.; MANDELL, J.B. New York breast cancer study group. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. **Science**, v. 302, p. 643–646, 2003.

KUJAWA, K. A.; LISOWSKA, K. M. Rak jajnika – od biologii do kliniki Ovarian cancer – from biology to clinic. **Postepy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 69, p. 1275–1290, 2015.

LAHIRI, D.K.; NURNBERG Jr, J.I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n.19, p. 5444, 1991.

LANDER, E.S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.

LANITIS, S. *et al.* Diagnosis and management of male breast cancer. **World Journal Surgery**. v. 32, p. 2471-2476, 2008.

LEE, J. A.; CARVALHO, C. M.; LUPSKI, J. R. A DNA replication mechanism for generating nonrecurrent rearrangements associated with genomic disorders. **Cell**, v. 131, p. 1235–1247, 2007.

LEVY-LAHAD, E.; FRIEDMAN, E. Cancer risks among *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. **British Journal of Cancer**, v. 96, p. 11–15, 2007.

LICHTENSTEIN, A. V. Cancer : Bad Luck or Punishment ? **Biochemistry**, v. 82, n. 1, p. 75–80, 2017.

LU K.H. *et al.* Sociedade Americana de declaração especialista em oncologia clínica: Obtenção e utilização de uma história familiar de câncer para os prestadores de oncologia. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, p. 833-840, 2014.

MACHADO, P. M. *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. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 15, p. 2027–2034, 2007.

MADEIRA M.E, *et al.* Quality of family history of cancer and referral for counseling and genetic 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**, v. 32, p. 824-829, 2014.

MAISTRO, S. *et al.* Germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* in epithelial ovarian cancer patients in Brazil. **BMC Cancer**, v.,16, n.,934, 2016.

MCVEY, M.; LEE, S.E. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. **Trends in Genetics**. v. 24, n. 11, p. 529–38, 2008.

MEDINA, R.D.F.; CARARETO, C.M.A. Instabilidade genética e doenças humanas In: CARARETO, C. M. A.; VITORELLO, C. B. M. (Orgs.). **Elementos de transposição: Diversidade, evolução, aplicações e impactos nos genomas dos seres vivos..** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Genética, FIOCRUZ, 2015. p.141-168.

MEIJERS-HEIJBOER, H. *et al.* The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. **American Journal of Human Genetics**, v. 72 p. 1308-1314, 2009.

MIKI, Y. *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. **Science**, v. 266, p. 66-71, 1994.

MOREIRA, M. A. *et al.* Portuguese c.156\_157insAlu *BRCA2* founder mutation: Gastrointestinal and tongue neoplasias may be part of the phenotype. **Familial Cancer**, v. 11, p. 657-660, 2012.

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

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK. **Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian** (Version 2.2019) 2018.

Disponível em:

[https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/genetics\\_screening.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_screening.pdf).

Acesso em: out. 2018.

NORQUIST, B. M. *et al.* Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma. **JAMA Oncology**, v. 6460, p. 1–9, 2015.

OLIVEIRA, E. S. *et al.* Screening of the *BRCA1* gene in Brazilian patients with breast and/or ovarian cancer via high-resolution melting reaction analysis. **Familial Cancer**, v. 15, p. 173–181, 2016.

PAIVA, C. J.K.; CESSE, E.A.P. Aspectos Relacionados ao Atraso no Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama em uma Unidade Hospitalar de Pernambuco. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 61, n. 1, p. 23-30, 2015.

PAL, T. *et al.* *BRCA1* and *BRCA2* mutations in a study of African American breast cancer patients. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 11, p. 1794–9, 2004.

PAL, T. *et al.* *BRCA* sequencing and large rearrangement testing in young Black women with breast cancer. **Journal of Community Genetics**, v. 5, n. 2, p. 157–165, 2013.

PALMERO, E. I. *et al.* The germline mutational landscape of *BRCA1* and *BRCA2* in Brazil. **Scientific Reports (Nature)**, v. 8, n. 9188, p. 1–10, 2018.

PALMERO, E. I. Hereditariedade e câncer de mama. **Revista Onco**, n.19, v.4, p. 38–41, 2013.

PARMIGIANI, G.; BERRY, D.; AGUILAR, O. Determining carrier probabilities for breast cancer-susceptibility genes *BRCA1* and *BRCA2*. **American Journal of Human Genetics**, v. 62, p. 145–158, 1998.

PAYNE, S.R.; NEWMAN, B.; KING, M. C. Complex germline rearrangement of *BRCA1* associated with breast and ovarian cancer. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 29, p. 58-62, 2000.

PEIXOTO, A, *et al.* International distribution and age estimation of the Portuguese *BRCA2* c.156\_157insAlu founder mutation. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 127, p. 671–679, 2011.

PEIXOTO, A, *et al.* The c.156\_157insAlu *BRCA2* rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious *BRCA* mutations in northern/central Portugal. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.114, p. 31–38, 2009.

PEIXOTO, A. *et al.* *BRCA1* and *BRCA2* germline mutational spectrum and evidence for genetic anticipation in Portuguese breast/ovarian cancer families. **Familial Cancer**, v. 5 p. 379–387, 2006.

PETRIJ-BOSCH, A. *et al.* *BRCA1* genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. **Nature Genetics**, v. 17 p. 341-345, 1997.

PETRUCCELLI, N. ; DALY, M.B. ; PAL, T. *BRCA1* and *BRCA2* associated hereditary breast and ovarian cancer. In: PAGON, R.A. *et al.*(Ed.). **GeneReviews®**. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018.  
PETRUCCELLI, N.; DALY, M. B.; FELDMAN, G. L. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. **Genetics in Medicine**, v. 12, n. 5, p. 245–259, 2010.

PREISLER-ADAMS S. *et al.* Gross rearrangements in *BRCA1* but not *BRCA2* play a notable role in predisposition to breast and ovarian cancer in high-risk families of German origin. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 168, p. 44-49, 2016.

PRUTHI S, GOSTOUT B.S., LINDOR N.M. Identification and management of women with *BRCA* mutations or hereditary predisposition for breast and ovarian cancer. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 85, p. 1111–1120, 2010.

REID, B. M.; PERMUTH, J. B.; SELLERS, T. A. Epidemiology of ovarian cancer : a review. Pathologic classification of Ovarian Cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, p. 9–32, 2017.

RIAHI A., CHABOUNI-BOUHAMED H., KHARRAT M. Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* large genomic rearrangements in Tunisian high risk breast/ovarian cancer families: Implications for genetic testing **Cancer Genetics**, v. 210, p. 22-27, 2017.

RISTOW, C. M.; YAMAMOTO, C. T.; FÁVARO, M. Fatores de risco e patogênese das neoplasias malignas epiteliais de ovário: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 2, p. 185–195, 2016.

ROBSON, M. E. *et al.* American Society of Clinical Oncology Policy Statement update: Genetic and genomic testing for cancer susceptibility. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 5, p. 893–901, 2010.

ROSENTHAL, E. T. *et al.* Clinical testing with a panel of 25 genes associated with increased cancer risk results in a significant increase in clinically significant findings across a broad range of cancer histories. **Cancer Genetics**, v. 218-219, p. 58–68, 2017.

ROVELET-LECRUX, A. *et al.* APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. **Nature Genetics**, v. 38, p. 24–26, 2006.

SABATIER, R. *et al.* Ovarian cancer patients at high risk of *BRCA* mutation: the constitutional genetic characterization does not change prognosis. **Familial Cancer**, v. 15, n. 4, p. 497-506, 2016.

SANKARANARAYANAN, K.; WASSOM, J. S. Ionizing radiation and genetic risks: XIV. Potential research directions in the post-genome era based on knowledge of repair of radiation-induced DNA double-strand breaks in mammalian somatic cells and the origin of deletions associated with human genomic. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 578, p. 333–370, 2005.

SARA, G. E *et al.* Screening for large rearrangements of the *BRCA2* gene in Spanish families with breast/ovarian cancer. **Breast Cancer and Treatment**, v. 103, p. 103-107, 2007.

SEBAT J., *et al.* et al. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. **Science** v.8, p.305-325, 2004.

SHANNON, K. M. *et al.* Which individuals undergoing BRCAAnalysis need BART testing? **Cancer Genetics**, v. 204, n. 8, p. 416–422, 2011.

SHARIFAH, N. A.; NURIAMAH, M.I.; LEE, H.C. Identification of novel large genomic rearrangements at the *BRCA1* locus i Malasyan women with breast cancer. **Cancer Epidemiology**, v. 34, n. 4 p. 442-447. 2010.

SHAW, C. J.; LUPSKI, J. R. Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders : the genomic basis of disease. **Human Molecular Genetics**, v. 13, n. 1, p. 57–64, 2004.

SIEGEL R.L.; MILLER K.D.; JEMAL A. Cancer statistics. **Cancer Journal Clinical**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015.

SILVA, F. C. *et al.* Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. **BMC Medical Genetics**, v.15, n. 55, 2014.

SIMON-SANCHEZ, J. *et al.* Genomewide SNP assay reveals mutations underlying Parkinson disease. **Human Mutations**, v. 29, p. 315–322, 2008.

SLUITER, M.; VAN RENSBURG, E. V. Large genomic rearrangements of the *BRCA1* and *BRCA2* genes: review of the literature and report of a novel *BRCA1* mutation. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 125, p. 325–349, 2011.

SMITH, H. Clinical management of ovarian cancer [book review]. **New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 2, p. 152-153, 2008.

SMITH, E. C. An Overview of Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 57, n. 6, p. 577–584, 2013.

SOUZA, M. M. *et al.* Taxa de mortalidade por neoplasia maligna de mama em mulheres residentes da região carbonífera catarinense no período de 1980 a 2009. **Ciências e Saúde Coletiva**, v. 21, n. 4 p. 384-390, 2013.

STANKIEWICZ, P. *et al.* Genomic disorders: genome architecture results in susceptibility to DNA rearrangements causing common human traits. **Cold Spring Harbour Symposium Quantitative Biology**, v. 68, p. 445-454, 2003.

STANKIEWICZ, P.; LUPSKI, J. R. Genome architecture, rearrangements and genomic disorders. **Trends in Genetics**, v.18, n. 2, p. 74–82, 2005.

STRACHAN, T.; READ, A. **Genética Molecular Humana**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 808 p.

SUN, C. *et al.* The role of *BRCA* status on the prognosis of patients with epithelial ovarian cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e95285, 2014.

THOMASSEN, M. *et al.* Low frequency of large genomic rearrangements of *BRCA1* and *BRCA2* in western Denmark. **Cancer Genetics and Cytogenetics** v.168 p. 168-171, 2006.

TICHA I. *et al.* Screening for genomic rearrangements in *BRCA1* and *BRCA2* genes in Czech high-risk breast/ovarian cancer patients: high proportion of population specific alterations in *BRCA1* gene. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 124, p. 337–347, 2010.

TORRE, L. A. *et al.* **Global Cancer Statistics**, 2012, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

TUNG, N. *et al.* Estrogen receptor positive breast cancers in *BRCA1* mutation carriers: clinical risk factors and pathologic features. **Breast Cancer Reserch**, v. 12, n. 1, R12, 2010.

TURNER, N.; TUTT, A.; ASHWORTH A. Hallmarks of BRCAness in sporadic cancers. **Nature Reviews, Cancer**, v. 4, n. 10, p. 814-819, 2004.

U.S. CANCER STATISTICS WORKING GROUP. United States Cancer Statistics: **Incidence and Mortality Web-based Report. Atlanta: U.S.** Department of Health and Human Services. Centers for Disease Control and Prevention and National Cancer Institute. 2016.

VAN ASPEREN, C. J. *et al.* Netherlands Collaborative Group on Hereditary Breast Cancer (HEBON) Cancer risks in *BRCA2* families: estimates for sites other than breast and ovary. **Journal of Medical Genetics**, v. 42, p. 711–719, 2005.

VARANI, A. M. *et al.* Elementos de transposição: Classificação e Mecanismos de Mobilização. In: CARARETO, C. M. A.; VITORELLO, C. B. M. (Orgs.). **Elementos de transposição: Diversidade, evolução, aplicações e impactos nos genomas dos seres vivos**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Genética, FIOCRUZ, 2015.

VIEIRA E.M. *et al.* História reprodutiva e sexual de mulheres tratadas de câncer de mama. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 35, n. 2, p. 78-83, 2013.

VIEIRA, G. H. **Análise molecular de pacientes com síndrome de Smith-Magenis Gustavo Henrique Vieira**. 122 f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2012.

- VIEIRA, R. A. da C ; FORMENTON, A.; BERTOLINI, S.R. Breast cancer screening in Brazil. Barriers related to the health system. **Revista da Associação Médica brasileira**, São Paulo, v. 63, n. 5, p. 466-474, 2017.
- VIEIRA, S. C. *et al.* **Oncologia Básica**. Teresina: Fundação Quixote, 2012. 304 p.
- WALSH, T. *et al.* Spectrum of mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2*, and *TP53* in families at high risk of breast cancer. **JAMA**, v. 295, p.1379–1388, 2006.
- WALSH, T. *et al.* Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.107, n. 28, p. 12629–12633. 2010.
- WANG, Y. *et al.* BASC, a super complex of *brca1*-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. **Genes & Development**. v. 14, p. 927-939, 2000.
- WATERS, W. F. Globalization, socioeconomic restructuring, and community health. **Journal of Community Health**, v. 26, n. 2, p. 79-92, 2011.
- WATSON, J. Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancer. **Open Biology**, v. 3, p. 120-144, 2013.
- WETERINGS E.; CHEN D. J. The endless tale of non-homologous end-joining. **Cell Research**, v. 18, p. 114-124, 2008.
- WHO. World Health Organization. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 12, n. 5, p. 366-370, 2010.
- WICKER, T. S. *et al.* A unified classification system for eukaryotic transposable elements. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 12, p. 973-982, 2007.
- WONG A. K. *et al.* *rad51* interacts with the evolutionarily conserved *brc* motifs in the human breast cancer gene *BRCA2*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 272, p. 31491-31494, 1997.

WOODWARD, A. M. *et al.* Large genomic rearrangements of both *BRCA2* and *BRCA1* are a feature of the inherited breast/ ovarian cancer phenotype in selected families. **Journal of Medical Genetics**, v. 42, n. 3, 2005.

WOOSTER, R. *et al.* Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. **Science**, v.,265, p.,2088-2090, 1995.

YANG, L. *et al.* Diverse mechanisms of somatic structural variations in human cancer genomes. **Cell**, v. 153, n. 4, p. 919–929, 2013.

YUAN, J.; CHEN, J. MRE11-RAD50-NBS1 complex dictates DNA repair independent of H2AX. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 2, p. 1097–1104, 2010.

ZHANG C.Z. LEIBOWITZ M.L. PELLMAN D. Chromothripsis and beyond: rapid genome evolution from complex chromosomal rearrangements. **Genes & Development**, v. 27, n. 23, p. 2513-2530, 2013.

ZHANG, J. *et al.* Searching for large genomic rearrangements of the *BRCA1* gene in a Nigerian population. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 124, p. 573–577, 2011.

ZHANG, S. *et al.* Frequencies of *BRCA1* and *BRCA2* mutations among 1.342 unselected patients with invasive ovarian cancer. **Gynecology and Oncology**, v. 121, n. 2, p. 353-357, 2011.

ZHONG, Q. *et al.* Effects of *BRCA1*- And *BRCA2*-related mutations on ovarian and breast cancer survival: A meta-analysis. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 1, p. 211–220, 2015.

## ANEXO A – Parecer consubstanciado da CONEP

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



**PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DA ANCESTRALIDADE E DE GENES DE SUSCEPTIBILIDADE EM PORTADORES DE CÂNCER DE MAMA E DE PRÓSTATA NO ESTADO DA BAHIA

**Pesquisador:** IVANA LUCIA DE OLIVEIRA NASCIMENTO

**Área Temática:** Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

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

**Versão:** 4

**CAAE:** 37352114.5.0000.5032

**Instituição Proponente:** Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio  
American Cancer Society  
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO  
Secretaria da Saúde do Estado da Bahia - SESAB  
Universidade Federal da Bahia - UFBA

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.382.884

**Apresentação do Projeto:**

**INTRODUÇÃO**

O câncer de mama e de próstata são neoplasias malignas complexas com alta prevalência no mundo ocidental, estão ligadas à produção de hormônios sexuais, têm sido associadas à obesidade e parecem ter uma pior evolução em determinados grupos étnicos, principalmente em afrodescendentes. O câncer de próstata é um dos cânceres mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total de câncer. As taxas de incidência deste tipo de câncer são cerca de seis vezes maiores nos países desenvolvidos comparados aos países em desenvolvimento. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. No Brasil, esses dois tipos de câncer são os de maior incidência na

**Endereço:** SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.750-521  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

## APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido



Coordenadora e Oncologista Responsável pelo projeto:  
 Dra. Ivana Lucia de Oliveira Nascimento – CREMEB: 10845  
 Endereço: Av. Reitor Miguel Calmon, s/n - Vale do Canela  
 Salvador, BA, CEP: 40.110-100  
 Tel: (71) 3235-9682 ramal 234/235

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### **ANÁLISE DA ANCESTRALIDADE E DE GENES DE SUSCEPTIBILIDADE EM PORTADORES DE CÂNCER DE MAMA E DE PRÓSTATA NO ESTADO DA BAHIA**

Caro participante:

Gostaríamos de convidar você a participar voluntariamente de um estudo que identificará a contribuição ancestral (antepassados) dos índios, dos africanos e europeus na formação da nossa população e a relação desta contribuição com o desenvolvimento dos câncer de mama e câncer de próstata.

Para isso faremos testes para verificação de possíveis alterações (mudanças) do seu DNA e RNA (material genético). Primeiro será analisado um painel genes (regiões do DNA) de susceptibilidade (risco) ao câncer de mama e próstata, depois se necessário (se o primeiro teste for negativo) será analisado todo o genoma (toda a molécula do DNA) na busca de outras regiões associadas ao risco de câncer de mama e câncer próstata. Este estudo é de extrema importância porque o número de casos de câncer de mama e próstata estão aumentando em nossa população, além de que melhor compreensão destas doenças pode vir a contribuir com melhor estratégia de tratamento e, portanto, sobrevida através de um diagnóstico diferenciado.

Você é livre para aceitar participar ou não, como também tem tempo para refletir e/ou consultar, seus familiares ou seu médicos que possam ajudá-los na tomada de decisão. Qualquer dúvida que você tenha o entrevistador, como também toda a equipe está disposta para esclarecimentos

Caso você concorde será feito uma entrevista seguida da coleta dos seguintes materiais biológicos: sangue por punção na veia do braço (8 mL), equivalente a 4 colheres de sopa, que será coletado por um profissional de saúde treinado. Os riscos associados à coleta do sangue venoso são mínimos como desconforto no local da coleta, dor ou talvez uma pequena mancha roxa no braço. Para a

Entrevistador: \_\_\_\_\_

Participante: \_\_\_\_\_

coleta do tecido tumoral você concederá a equipe da pesquisa acesso a amostras tumorais fixadas em parafina (pedacinho do tumor que foi retirado na cirurgia).

Você também pode ficar apreensivo, ansioso em relação aos resultados da pesquisa, pois trará informação sobre sua susceptibilidade genética (risco herdado) no desenvolvimento de câncer de mama e câncer de próstata., o que terá impacto sobre sua família também. Mas, esse desconforto também pode ser amenizado pois a equipe de pesquisa conta com uma psicóloga treinada, além da médica geneticista da equipe que está disponível para você e sua família. Ressaltamos também que em casos de qualquer dano decorrentes da pesquisa, físico, morais ou psicológicos será garantido indenização e assistência integral e imediata, pelo tempo que for necessário, de forma gratuita.

Durante a entrevista com o médica geneticista, serão coletados dados pessoais e clínicos, ou você pode conceder à equipe responsável, acesso ao seu prontuário para informações complementares, o qual contém dados clínicos importantes descritos pelo seu médico. Como também acesso a amostra do tumor.

Todos os materiais colhidos para essa pesquisa serão armazenados em caráter de biorepositório e analisadas no Setor de Oncogenética do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia e no Laboratório de Dra Olopade no Centro Médico da Universidade de Chicago. E caso ocorram novas pesquisas, entraremos em contato com você para obtenção do seu consentimento como também submeteremos os novos protocolos de estudo aos Comitês de Ética em Pesquisa conforme requerido resoluções nº 466/2012 e nº 441/2011 do Conselho Nacional de Saúde.

Em nenhum momento do desenvolvimento da pesquisa seu nome será revelado, o que garante seu anonimato e preserva a sua identidade e previne a estigmatização e discriminação. Também não será cobrado nada de você. Como sua participação é voluntária, ou seja, você pode recusar-se a participar ou ainda retirar seu consentimento em qualquer fase do estudo, sem penalização alguma.

Aceitando participar do estudo você ficará com uma via deste termo assinada por você e o entrevistador. E como benefício iremos convidar você, caso queira, para ter acesso aos seus resultados dos testes realizados nessa pesquisa através de uma consulta com uma médica geneticista colaboradora da pesquisa, que explicará os resultados a você sobre sua ancestralidade genética (grau de mistura) e susceptibilidade (risco) genética ao câncer de mama ou câncer de próstata. E, em caso de dúvida(s), desistências, e outros esclarecimento(s), você pode entrar em contato conosco pelo telefone 0xx71 3235 9682 ramal 235; ou [ivanasci@gmail.com](mailto:ivanasci@gmail.com).

**Este projeto científico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituto Mantenedor de Ensino Superior da Bahia – IMES e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CAAE 37352114.5.0000.5032 em xx/xx/xxxx).**

**Coordenação: Dra. Ivana Lucia do Nascimento (CRM 10845)**

Equipe colaboradora: Kiyoko Abe Sandes, Maria Betânia Pereira Toralles, Maura Alice Santos Romeo, Rodrigo Santa Cruz Guindalini, Olufunmilayo Olopade, Taisa Manuela Bonfim Machado, Thais Ferreira Bomfim, Gabriela do Espírito Santo Felix, Polyanna Carôzo de Oliveira e Roberto Meyer

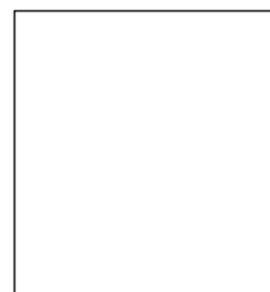
Entrevistador: \_\_\_\_\_

Participante: \_\_\_\_\_

**Instituições participantes: (A) Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia localizado na Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brasil, CEP 40.110-000. (B) Center for Clinical Cancer Genetics, University of Chicago, 5841 S. Maryland Avenue, MC 2115 Chicago, Illinois 60637-1470 Chicago-Illinois, USA, 60637.**

Eu, \_\_\_\_\_,  
 CPF/RG \_\_\_\_\_, declaro  
 que o entrevistador \_\_\_\_\_  
 explicou-me os objetivos, riscos e benefícios da pesquisa “Análise da ancestralidade e de genes de susceptibilidade em portadores de câncer de mama e próstata no estado da Bahia”, como também a forma de participação. E, após ler e compreender o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** concordo em participar como voluntário do presente estudo.

\_\_\_\_\_  
 Indivíduo participante da pesquisa



Impressão digital

\_\_\_\_\_  
 Membro da equipe que apresentou o TCLE (entrevistador)

\_\_\_\_\_  
**Dra. Ivana Lucia do Nascimento CRM 10845**  
 Pesquisador responsável

Salvador-BA, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Entrevistador: \_\_\_\_\_

Participante: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B – Questionário clínico epidemiológico e da ancestralidade dos pacientes

ANÁLISE DA ANCESTRALIDADE E DE GENES DE SUSCEPTIBILIDADE EM  
PORTADORES DE CÂNCER DE MAMA E DE PRÓSTATA NO ESTADO DA  
BAHIA

## Questionário 1

1.	<b>Data da entrevista:</b>	<b>Entrevistador(a):</b>
2.	<b>Nome do paciente:</b> <b>Nome do Pai:</b> _____ <b>Nome da Mãe:</b> _____ <b>Filiação Biológica:</b> ( ) 1. Sim ( ) 2. Não ( ) 3. Não sabe informar	
3.	<b>Data de Nascimento:</b> <b>Sexo:</b> ( ) 1. Feminino ( ) 2. Masculino	
4.	<b>Cidade de residência:</b>	<b>De nascimento:</b>
<b>AUTODENOMINAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO PACIENTE</b>		
5.	<b>Raça/Cor (Auto-denominação):</b> ( ) 1. Negro ( ) 2. Pardo ( ) 3. Branco ( ) 4. Indígena ( ) 0. Outros	
6.	<b>Cabelo (Textura):</b> ( ) 1. Crespo ( ) 2. Ondulado ( ) 3. Liso	
7.	<b>Nariz:</b> ( ) 1. Achatado ( ) 2. Médio ( ) 3. Fino	
8.	<b>Lábios (Forma):</b> ( ) 1. Grossa ( ) 2. Média ( ) 3. Fina	
9.	<b>Pele (Cor):</b> ( ) 1. Preta ( ) 2. Marrom ( ) 3. Branca	
10.	<b>Raça/Cor (Análise fenotípica):</b> ( ) 1. Negro ( ) 2. Mulato Escuro ( ) 3. Mulato Médio ( ) 4. Mulato Claro ( ) 5. Branco ( ) 0. Outros	

## ANCESTRALIDADE REFERIDA DOS PAIS E AVÓS DO PACIENTE

11.	<b>Materna: Ashkenazi?</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Africana <input type="checkbox"/> Espanhola <input type="checkbox"/> Francesa <input type="checkbox"/> Índigena <input type="checkbox"/> Italiana <input type="checkbox"/> Judia <input type="checkbox"/> Portuguesa <input type="checkbox"/> Outra Qual? _____	
	<b>Paterna: Ashkenazi?</b> <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Africana <input type="checkbox"/> Espanhola <input type="checkbox"/> Francesa <input type="checkbox"/> Índigena <input type="checkbox"/> Italiana <input type="checkbox"/> Judia <input type="checkbox"/> Portuguesa <input type="checkbox"/> Outra Qual? _____	
12.	<b>Pai:</b> ( ) 1. Negro ( ) 2. Mulato ( ) 3. Branco ( ) 4. Índio ( ) 5. Outro ( ) 0. Não sabe informar <b>Local de nascimento:</b>	
13.	<b>Mãe:</b> ( ) 1. Negro ( ) 2. Mulato ( ) 3. Branco ( ) 4. Índio ( ) 5. Outro ( ) 0. Não sabe informar <b>Local de nascimento:</b>	
14.	<b>Avó Materna:</b> ( ) 1. Negro ( ) 2. Mulato ( ) 3. Branco ( ) 4. Índio ( ) 5. Outro ( ) 0. Não sabe informar <b>Local de nascimento:</b>	
15.	<b>Avô Materno:</b> ( ) 1. Negro ( ) 2. Mulato ( ) 3. Branco ( ) 4. Índio ( ) 5. Outro ( ) 0. Não sabe informar <b>Local de nascimento:</b>	
16.	<b>Avó Paterna:</b> ( ) 1. Negro ( ) 2. Mulato ( ) 3. Branco ( ) 4. Índio ( ) 5. Outro ( ) 0. Não sabe informar <b>Local de nascimento:</b>	
17.	<b>Avô Paterno:</b> ( ) 1. Negro ( ) 2. Mulato ( ) 3. Branco ( ) 4. Índio ( ) 5. Outro ( ) 0. Não sabe informar <b>Local de nascimento:</b>	

## DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS – CÂNCER DE MAMA

18.	<b>Estadiamento:</b> ( )1. <b>I</b> ( )2. <b>II</b> ( )3. <b>III</b> ( )4. <b>IV</b> <b>T: N: M:</b> ( ) ( )0. Não tem dados
19.	<b>Tipo histológico:</b> ( )1. Carcinoma ductal infiltrante ( )2. Carcinoma ductal “in situ” ( )3. Microinvasão: <b>Sim</b> ( ) <b>Não</b> ( ) ( )4. Outros: <b>Grau histológico:</b> ( )1. Bem diferenciado ( )2. Moderadamente diferenciado ( )3. Pouco diferenciado ( )4. Indiferenciado ( )5. Não avaliado.
20.	<b>Imunoistoquímica</b> ( )1. Sim; Onde foi realizada? ( )2. Não <b>RE:</b> ( )1 :0 ( )2.+ ( )3 ++ ( )4. +++ ( )5 +++++ <b>RP:</b> ( )1 :0 ( )2. + ( )3. ++ ( )4. +++ ( )5. +++++ <b>HER-2 :</b> ( )1:0 ( )2:+ ( )3:++ ( )4:+++ <b>TP53:</b> ( )1. Neg ( )2. Pos ( )0. Não tem dados <b>KI-67:</b> ( )1. Neg. ( )2. Pos ( )0. Não tem dados
21.	<b>Data do diagnóstico histopatológico –</b> <b>Onde foi realizado-</b>
22.	<b>Tratamento:</b> <b>1. Cirurgia:</b> ( )1. Sim ( )2. Não • <b>Tipo:</b> ( )1. Quadrantectomia ( )2. Mastectomia <b>2. Esvaziamento axilar:</b> ( )1. Sim ( )2. Não • <b>Linfonodo sentinela:</b> ( )1. Sim ( )2. Não <b>3. Radioterapia:</b> ( )1. Sim ( )2. Não <b>4. Quimioterapia:</b> ( )1. Sim ( )2. Não • <b>Protocolo:</b> ( )1. CMF ( )2. FAC ( )3. AC ( )4. AC- T ( )5. AC-D ( )6. Outro <b>5. Hormonioterapia:</b> ( )1. Sim ( )2. Não • <b>Protocolo:</b> ( )1. Tamoxifeno ( )2. Inibidor de aromatase ( )3. Qual?
23.	<b>Recidiva:</b> ( )1. Sim ( )2. Não <b>Data:</b>
24.	<b>Tipo de recidiva:</b> ( )1. Ossea ( )2. Visceral ( )3. Loco-regional
25.	<b>Peso ao diagnóstico:</b> <b>Altura:</b>

## ANEXO B – Sondas de triagem referentes a SALSA MLPA kit P002.

TAMANHO (NT)	SONDA SALSA MLPA	POSICÃO NO CROMOSSOMO REFERÊNCIA <i>BRCA1</i>
130	Reference probe 00797-L21056 5q31	5q31
136	Reference probe 17174-L20399 15q21	15q21
142	<b>BRCA1</b> probe 18139-L22623	<b>Exon 11 (10)</b>
149	<b>BRCA1</b> probe 20021-L27332	<b>Exon 24 (23)</b>
154	<b>BRCA1</b> probe 00763-L22990	<b>Exon 1a</b>
160	<b>BRCA1</b> probe 20022-L27333	<b>Exon 16 (15)</b>
166	<b>BRCA1</b> probe 02808-L25084	<b>Upstream</b>
172	Reference probe 00808-L00326	18q21
178	<b>BRCA1</b> probe 00765-L22993	<b>Exon 2</b>
184	<b>BRCA1</b> probe 20023-L23035	<b>Exon 23 (22)</b>
190	<b>BRCA1</b> probe 00767-L22995	<b>Exon 5 (4)</b>
196	<b>BRCA1</b> probe 18144-L22627	<b>Exon 16 (15)</b>
202	<b>BRCA1</b> probe 18290-L23057	<b>Exon 13 (12)</b>
208	Reference probe 14684-L03223	3q26
214	<b>BRCA1</b> probe 20024-L23321	<b>Exon 19 (18)</b>
220	<b>BRCA1</b> probe 00769-L22997	<b>Exon 7 (6)</b>
226	<b>BRCA1</b> probe 20025-L27334	<b>Exon 21 (20)</b>
233	<b>BRCA1</b> probe 18136-L23325	<b>Exon 11 (10)</b>
238	<b>BRCA1</b> probe 01005-L23000	<b>Exon 9 (8)</b>
244	Reference probe 16307-L22396	13q14
251	<b>BRCA1</b> probe 00772-L23001	<b>Exon 10 (9)</b>
256	<b>BRCA1</b> probe 20026-L27335	<b>Exon 18 (17)</b>
263	<b>BRCA1</b> probe 18039-L00345	<b>Exon 11 (10)</b>
269	<b>BRCA1</b> probe 20027-L27336	<b>Exon 14 (13)</b>
275	Reference probe 15112-L27337	1p33
281	<b>BRCA1</b> probe 00774-L23003	<b>Exon 11 (10)</b>
289	<b>BRCA1</b> probe 20028-L27338	<b>Exon 1b</b>
296	<b>BRCA1</b> probe 18135-L27339	<b>Exon 11 (10)</b>
301	<b>BRCA1</b> probe 02603-L27340	<b>Exon 13 (12)</b>
310	<b>BRCA1</b> probe 20029-L23320	<b>Exon 24 (23)</b>
316	Reference probe 07300-L21099	6q16
324	<b>BRCA1</b> probe 18142-L23024	<b>Upstream</b>
332	<b>BRCA1</b> probe 00778-L23026	<b>Exon 15 (14)</b>
340	<b>BRCA1</b> probe 20030-L27341	<b>Exon 11 (10)</b>
347	<b>BRCA1</b> probe 00783-L23319	<b>Exon 20 (19)</b>
358	<b>BRCA1</b> probe 20034-L27629	<b>Exon 8 (7)</b>
366	<b>BRCA1</b> probe 00785-L23318	<b>Exon 22 (21)</b>
374	<b>BRCA1</b> probe 20035-L22994	<b>Exon 3</b>
382	<b>BRCA1</b> probe 20036-L27344	<b>Exon 11 (10)</b>
393	<b>BRCA1</b> probe 18140-L04795	<b>Exon 24 (23)</b>
403	Reference probe 13480-L14942	1q42
412	<b>BRCA1</b> probe 18169-L23037	<b>Exon 13 (12)</b>
421	Reference probe 09038-L23039	2q37

## ANEXO B – Sondas de triagem referentes a SALSA MLPA kit P090

TAMANHO (NT)	SONDA SALSA MLPA	POSIÇÃO NO CROMOSSOMO REFERÊNCIA <i>BRCA2</i>
130	Reference probe 00797-L00463	5q31
137	<b>BRCA2 probe</b> 02283-L12281	<b>Exon 1</b>
148	<b>BRCA2 probe</b> 02285-L13497	<b>Exon 1</b>
154	<b>BRCA2 probe</b> 09297-L08066	<b>Exon 14</b>
160	<b>FRY probe</b> 02143-L09586	20 kb upstream <i>BRCA2</i>
166	<b>BRCA2 probe</b> 02486-L01985	<b>Exon 2</b>
172	<b>BRCA2 probe</b> 08898-L09587	<b>Exon 3</b>
178	<b>BRCA2 probe</b> 01599-L10642	<b>Exon 3</b>
184	Reference probe 01217-L00694	4q35
191	<b>BRCA2 probe</b> 09812-L10643	<b>Exon 23</b>
197	<b>BRCA2 probe</b> 01600-L04671	<b>Exon 4</b>
202	<b>BRCA2 probe</b> 08265-L08128	<b>Exon 7</b>
211	Reference probe 02333-L01826	12q23
220	<b>BRCA2 probe</b> 01602-L01184	<b>Exon 8</b>
229	<b>BRCA2 probe</b> 01603-L01185	<b>Exon 9</b>
238	Reference probe 00517-L00097	2q13
247	<b>BRCA2 probe</b> 01604-L01186	<b>Exon 10</b>
256	<b>BRCA2 probe</b> 02279-L01770	<b>Exon 11</b>
265	Reference probe 02318-L01809	19p13
274	<b>BRCA2 probe</b> 01606-L01188	<b>Exon 11</b>
283	<b>BRCA2 probe</b> 01607-L01189	<b>Exon 12</b>
292	Reference probe 03018-L02458	12q13
301	<b>BRCA2 probe</b> 02280-L01771	<b>Exon 13</b>
309	<b>BRCA2 probe</b> 09809-L10257	<b>Exon 5</b>
319	<b>BRCA2 probe</b> 09296-L11090	<b>Exon 27</b>
326	<b>BRCA2 probe</b> 01610-L01192	<b>Exon 15</b>
337	<b>BRCA2 probe</b> 01611-L01193	<b>Exon 16</b>
346	<b>BRCA2 probe</b> 04585-L03983	<b>Exon 6</b>
355	<b>BRCA2 probe</b> 02281-L01772	<b>Exon 17</b>
364	<b>BRCA2 probe</b> 01613-L01195	<b>Exon 18</b>
373	Reference probe 02667-L04984	11q22
382	<b>BRCA2 probe</b> 01614-L01196	<b>Exon 19</b>
391	<b>BRCA2 probe</b> 08266-L08129	<b>Exon 20</b>
400	Reference probe 00801-L00639	13q14
409	<b>BRCA2 probe</b> 02069-L01970	<b>Exon 21</b>
418	<b>BRCA2 probe</b> 01617-L01199	<b>Exon 22</b>
427	Reference probe 06942-L06522	11q12
436	<b>BRCA2 probe</b> 08267-L08130	<b>Exon 24</b>
445	<b>BRCA2 probe</b> 08268-L08131	<b>Exon 25</b>
454	<b>N4BP2L1 (=CG018) probe</b> 02144-L01619	8 kb downstream <i>BRCA2</i>
463	<b>BRCA2 probe</b> 11984-L15346	<b>Exon 26</b>
476	<b>BRCA2 probe</b> 09293-L15678	<b>Exon 27</b>
486	Reference probe 05028-L15679	2q32

## ANEXO B – Sondas de triagem referentes a SALSA MLPA kit P045

TAMANHO (NT)	SONDA SALSA MLPA	POSIÇÃO NO CROMOSSOMO	
		REFERÊNCIA	BRCA2 CHECK2
130	Reference probe 00797-L00463	5q31	
136	<b>BRCA2 probe</b> 02283-L26707		<b>Exon 1</b>
142	<b>BRCA2 probe</b> 18385-L23778		<b>Exon 11</b>
149	<b>BRCA2 probe</b> 20546-L28140		<b>Exon 19</b>
154	<b>BRCA2 probe</b> 02285-L23744		<b>Exon 1</b>
160	<b>BRCA2 probe</b> 09297-L28129		<b>Exon 14</b>
166	<b>BRCA2 probe</b> 20603-L28261		<b>Exon 11</b>
172	<b>BRCA2 probe</b> 02486-L23747		<b>Exon 2</b>
178	Reference probe 04532-L0392	2q24	
184	<b>BRCA2 probe</b> 20625-L28317		<b>Exon 22</b>
190	<b>BRCA2 probe</b> 18387-L2425		<b>Exon 11</b>
196	<b>BRCA2 probe</b> 09812-L23750		<b>Exon 23</b>
202	<b>BRCA2 probe</b> 01600-L23751		<b>Exon 4</b>
208	<b>BRCA2 probe</b> 08265-L23752		<b>Exon 7</b>
214	Reference probe 11996-L12824	6q25	
220	<b>BRCA2 probe</b> 18388-L23375		<b>Exon 10</b>
226	<b>BRCA2 probe</b> 20626-L28778		<b>Exon 25</b>
232	<b>BRCA2 probe</b> 01603-L13850		<b>Exon 9</b>
238	<b>BRCA2 probe</b> 18503-SP0658-L28779		<b>Exon 3/ c.156_157insAlu</b>
244	<b>BRCA2 probe</b> 20548-L28142		<b>Upstream</b>
250	<b>BRCA2 probe</b> 01604-L23754		<b>Exon 10</b>
257	Reference probe 02469-L28780	15q21	
265	<b>BRCA2 probe</b> 20549-L28781		<b>Exon 11</b>
271	<b>CHEK2 probe</b> 20724-L29194		<b>Exon 1</b>
275	<b>BRCA2 probe</b> 18389-L24255		<b>Exon 27</b>
283	<b>BRCA2 probe</b> 01606-L23757		<b>Exon 11</b>
291	<b>BRCA2 probe</b> 20676-L28319		<b>Exon 18</b>
295	<b>BRCA2 probe</b> 20541-L28782		<b>Exon 27</b>
304	Reference probe 11441-L28327	1q41	
313	<b>BRCA2 probe</b> 02280-L28326		<b>Exon 13</b>
321	<b>BRCA2 probe</b> 09809-L28325		<b>Exon 5</b>
328	<b>BRCA2 probe</b> 19699-L28324		<b>Exon 27</b>
337	<b>BRCA2 probe</b> 20628-L28320		<b>Exon 12</b>
346	<b>BRCA2 probe</b> 01611-L23763		<b>Exon 16</b>
355	<b>BRCA2 probe</b> 04585-L23764		<b>Exon 6</b>
364	<b>BRCA2 probe</b> 02281-L23765		<b>Exon 17</b>
373	<b>BRCA2 probe</b> 20629-L28321		<b>Exon 21</b>
382	Reference probe 13329-L1475	18q21	
391	<b>BRCA2 probe</b> 20543-L28130		<b>Exon 10</b>
400	<b>BRCA2 probe</b> 08266-L23768		<b>Exon 20</b>
409	<b>CHEK2 probe</b> 02579-L23769		<b>Exon 9</b>
418	<b>BRCA2 probe</b> 20630-L28322		<b>Exon 15</b>
426	<b>BRCA2 probe</b> 20631-L25993		<b>Exon 3</b>
436	Reference probe 07975-L0775	17q21	
445	<b>BRCA2 probe</b> 08267-L23772		<b>Exon 24</b>
454	<b>BRCA2 probe</b> 20632-L28323		<b>Exon 8</b>
462	<b>N4BP2L1 probe</b> 18948-L01619		<b>Downstream</b>
472	<b>BRCA2 probe</b> 11984-L23775		<b>Exon 26</b>
481	<b>BRCA2 probe</b> 20550-L28144		<b>Exon 11</b>
490	<b>CHEK2 probe</b> 01772-L01336		<b>1100delC</b>
500	Reference probe 14882-L21656	14q11	

## ANEXO B – Sondas confirmatórias referentes a SALSA MLPA kit P087

TAMANHO (NT)	SONDA SALSA MLPA	POSIÇÃO NO CROMOSSOMO	
		REFERÊNCIA	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i>
130	Reference probe 00797-L21056 5q31	5q31	
136	<b>BRCA2 probe</b> 02283-L01774		<b>Exon 1</b>
148	<b>BRCA1 probe</b> 02807-L01268		<b>Exon 1a</b>
154	Reference probe 17136-L20328	1p22	
160	<b>BRCA1 probe</b> 02808-L25904		<b>Upstream</b>
167	<b>BRCA1 probe</b> 02810-L02239		<b>Exon 2</b>
175	<b>BRCA1 probe</b> 02811-L02240		<b>Exon 3</b>
185	<b>BRCA1 probe</b> 03398-L02254		<b>Exon 18</b>
193	Reference probe 03217-L02642	10q25	
200	<b>BRCA1 probe</b> 11457-L12189		<b>Exon 22</b>
208	<b>BRCA1 probe</b> 02813-L02242		<b>Exon 6</b>
219	<b>BRCA1 probe</b> 02814-L02243		<b>Exon 7</b>
226	<b>BRCA1 probe</b> 02815-L02244		<b>Exon 8</b>
234	<b>BRCA1 probe</b> 02816-L02245		<b>Exon 9</b>
243	Reference probe 19134-L25333	21q22	
250	<b>BRCA1 probe</b> 03411-L25905		<b>Exon 13</b>
256	<b>BRCA2 probe</b> 02279-L01770		<b>Exon 11</b>
263	<b>BRCA1 probe</b> 11802-L12190		<b>Exon 14</b>
269	Reference probe 15957-L18109	6q15	
276	<b>BRCA1 probe</b> 02818-L02247		<b>Exon 11</b>
287	<b>BRCA1 probe</b> 02819-L02248		<b>Exon 12</b>
295	<b>BRCA1 probe</b> 03890-L03337		<b>Exon 13</b>
310	<b>BRCA2 probe</b> 09809-L10644		<b>Exon 5</b>
319	Reference probe 00495-L03128	12p12	
329	<b>BRCA1 probe</b> 02821-L02250		<b>Exon 15</b>
337	<b>BRCA1 probe</b> 02822-L02251		<b>Exon 16</b>
346	<b>BRCA1 probe</b> 03395-L12877		<b>Exon 5</b>
355	<b>BRCA1 probe</b> 03822-L03285		<b>Exon 10</b>
364	<b>BRCA1 probe</b> 02826-L02255		<b>Exon 19</b>
372	Reference probe 08893-L23475	14q24	
380	Reference probe 00655-L03268	4q27	
390	<b>BRCA1 probe</b> 02827-L02256		<b>Exon 20</b>
397	<b>BRCA1 probe</b> 02828-L02257		<b>Exon 21</b>
408	<b>BRCA1 probe</b> 03397-L13116		<b>Exon 17</b>
416	<b>BRCA1 probe</b> 02830-L02259		<b>Exon 23</b>
425	<b>BRCA1 probe</b> 04578-L04795		<b>Exon 24</b>
436	<b>BRCA1 probe</b> 02100-L02537		<b>Exon 1a</b>
445	Reference probe 06058-L05513	4p16	
454	Reference probe 02355-L01415	9q34	

## ANEXO B – Sondas confirmatórias referentes a SALSA MLPA kit P077

TAMANHO (NT)	SONDA SALSA MLPA	POSIÇÃO NO CROMOSSOMO REFERÊNCIA	BRCA2
124	124 Reference probe 15370-L13762	7q11	
130	130 Reference probe 00797-L13645	5q31	
136	136 <b>BRCA2 probe</b> 12289-L20891		<b>Exon 11</b>
142	142 Reference probe 09938-L20890	8q13	
148	148 <b>BRCA2 probe</b> 01596-L20889		<b>Exon 1</b>
154	154 <b>BRCA2 probe</b> 12290-L13283		<b>Exon 6</b>
160	160 <b>BRCA2 probe</b> 19614-L26252		<b>Exon 11</b>
166	166 <b>BRCA2 probe</b> 12292-L14535		<b>Exon 27</b>
172	172 Reference probe 04114-L03474	9q34	
178	178 <b>BRCA2 probe</b> 12294-L13287		<b>Exon 4</b>
184	184 <b>BRCA2 probe</b> 12295-L13288		<b>Exon 26</b>
191	191 <b>BRCA2 probe</b> 09811-L10259		<b>Exon 23</b>
196	196 <b>BRCA2 probe</b> 12296-L13289		<b>Exon 11</b>
202	202 <b>BRCA2 probe</b> 12297-L13290		<b>Intron 7</b>
208	208 Reference probe 03225-L14390	5q35	
214	214 <b>BRCA2 probe</b> 12299-L13292		<b>Intron 12</b>
221	221 <b>BRCA2 probe</b> 12300-L13293		<b>Exon 16</b>
228	228 <b>BRCA2 probe</b> 12301-L14436		<b>Exon 9</b>
232	232 <b>BRCA2 probe</b> 12302-L13295		<b>Exon 19</b>
238	238 <b>BRCA2 probe</b> 12303-L13296		<b>Exon 17</b>
244	244 <b>BRCA2 probe</b> 12304-L13297		<b>Intron 3</b>
250	250 Reference probe 02658-L02125	11q22	
256	256 <b>BRCA2 probe</b> 12305-L14344		<b>Exon 3</b>
265	265 <b>BRCA2 probe</b> 12306-L13299		<b>Exon 7</b>
274	274 <b>BRCA2 probe</b> 12307-L13300		<b>Exon 18</b>
283	283 <b>BRCA2 probe</b> 12308-L13301		<b>Exon 25</b>
292	292 <b>BRCA2 probe</b> 08343-L08275		<b>Upstream</b>
301	301 <b>BRCA2 probe</b> 12309-L13302		<b>Exon 21</b>
310	310 <b>BRCA2 probe</b> 12310-L13303		<b>Exon 27</b>
319	319 Reference probe 10677-L11259	6p12	
328	328 <b>BRCA2 probe</b> 12312-L13305		<b>Exon 13</b>
337	337 <b>BRCA2 probe</b> 12313-L13306		<b>Exon 5</b>
346	346 <b>BRCA2 probe</b> 12314-L13307		<b>Intron 13</b>
355	355 <b>BRCA2 probe</b> 12315-L13308		<b>Exon 10</b>
364	364 <b>BRCA2 probe</b> 12316-L13309		<b>Exon 16</b>
373	373 Reference probe 11001-L11672	4q22	
382	382 <b>BRCA2 probe</b> 12318-L13311		<b>Intron 21</b>
391	391 <b>BRCA2 probe</b> 12319-L13312		<b>Exon 8</b>
400	400 <b>BRCA2 probe</b> 12320-L13313		<b>Exon 12</b>
409	409 <b>BRCA2 probe</b> 12321-L13314		<b>Exon 20</b>
418	418 <b>BRCA2 probe</b> 12322-L13315		<b>Exon 15</b>
427	427 <b>BRCA2 probe</b> 12323-L13316		<b>Exon 2</b>
436	436 <b>BRCA2 probe</b> 01618-L14536		<b>Exon 24</b>
445	445 Reference probe 09612-L09907	20p12	
454	454 <b>BRCA2 probe</b> 12324-L13317		<b>Exon 14</b>
463	463 <b>BRCA2 probe</b> 12325-L13318		<b>Exon 18</b>
472	472 <b>BRCA2 probe</b> 12326-L13319		<b>Exon 8</b>
481	481 Reference probe 09772-L10187	15q21	