



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

CAROLINE STAHNKE RICHAU

**Prevalência de mutações somáticas e germinativas em
BRCA1, *BRCA2* e *TP53* em pacientes com câncer de ovário**

Orientador (es): Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira

Prof(a). Dra. Anna Cláudia Evangelista dos Santos

RIO DE JANEIRO

2021



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

CAROLINE STAHNKE RICHAU

**Prevalência de mutações somáticas e germinativas em
BRCA1, *BRCA2* e *TP53* em pacientes com câncer de ovário**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientador (es): Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira

Prof(a). Dra. Anna Cláudia Evangelista dos Santos

RIO DE JANEIRO

2021



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**Prevalência de mutações somáticas e germinativas em *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* em
pacientes com câncer de ovário**

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caroline Stahnke Richau

O câncer de ovário é uma das neoplasias ginecológicas com os mais altos índices de mortalidade. Os carcinomas de origem epitelial representam cerca de 90% dos casos, sendo o subtipo seroso de alto grau (HGSOC) o mais frequente. A presença de variantes, germinativas ou somáticas, com perda de função em *BRCA1* e/ou *BRCA2* são indicativas para estratégias de tratamento específicas para essas pacientes, como a utilização de inibidores de PARP. Outros genes supressores tumorais apresentam altos índices de variantes somáticas de perda de função em HGSOC, como o gene *TP53*, que possui mutações somáticas em 96% dos casos. O presente trabalho visou identificar as variantes genéticas germinativas e somáticas nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* em pacientes com câncer de ovário epitelial, além de descrever as características histopatológicas dos casos. As amostras utilizadas (sangue e tumor) foram do Banco Nacional de Tumores do INCA, os procedimentos metodológicos seguiram as etapas de (i) revisão histopatológica; (ii) isolamento do material genético (DNA); (iii) amplificação das regiões alvo; (iv) preparo das bibliotecas e sequenciamento em larga escala; (v) análise por bioinformática; e (vi) descrição e classificação das variantes. Houve a caracterização quanto à patogenicidade para 112 variantes germinativas identificadas nos éxons dos genes de interesse, sendo 45 no gene *BRCA1*, 20 em *BRCA2* e 47 em *TP53*. Dentre as alterações germinativas, a perda de função foi indicada para: 5 casos em *BRCA1*, em que 4 destes apresentaram perda de heterozigosidade no tumor; 4 casos para *BRCA2*; e nenhum para *TP53*. As mutações somáticas totalizaram 70 variantes identificadas, sendo 11 no gene *BRCA1*, 22 em *BRCA2* e 37 em *TP53*. Para essas, mutações com perda de função foram observadas em 6 casos para *BRCA1*, 14 para *BRCA2* e 35 para *TP53*. A maioria dos pacientes foi diagnosticada na faixa etária de 50 a 60 anos, com subtipo histológico HGSOC, em estadiamento avançado da doença e sem histórico familiar. A metodologia NGS permitiu a identificação de variantes com baixas frequências alélicas que são características de casos somáticos. A maior identificação de variantes germinativas com perda de função em *BRCA1/2* e variantes somáticas com perda de função em *TP53* corroborou com os dados de estudos anteriores, indicando a adequação da metodologia aplicada. Este trabalho contribuiu com a ampliação do conhecimento acerca dos eventos genéticos germinativos e somáticos que ocorrem nos casos de câncer epitelial na população brasileira.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**Prevalência de mutações somáticas e germinativas em *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* em
pacientes com câncer de ovário**

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Caroline Stahnke Richau

Ovarian cancer is one of the gynecological neoplasms with the highest mortality rates. Carcinomas of epithelial origin represent about 90% of cases, with the high-grade serous subtype (HGSOC) being the most frequent. The presence of germline or somatic variants with loss of function in *BRCA1* and/or *BRCA2* are indicative for specific treatment strategies for these patients, such as the use of PARP inhibitors. Other tumor suppressor genes have high rates of somatic loss-of-function variants in HGSOC, such as the *TP53* gene, which has somatic mutations in 96% of cases. The present work aimed to identify the germline and somatic genetic variants in the *BRCA1*, *BRCA2* and *TP53* genes in patients with epithelial ovarian cancer, in addition to describing the histopathological characteristics of the cases. The samples (blood and tumor) were from the National Tumor Bank of INCA, the methodological procedures followed the steps of (i) histopathological review; (ii) isolation of genetic material (DNA); (iii) amplification of target regions; (iv) library preparation and high throughput sequencing; (v) bioinformatics analysis; and (vi) description and classification of variants. The pathogenicity was characterized for 112 germline variants identified in the exons of the genes of interest, 45 in the *BRCA1* gene, 20 in *BRCA2* and 47 in *TP53*. Among the germinal alterations, loss of function was indicated for: 5 cases in *BRCA1*, in which 4 of these presented loss of heterozygosity in the tumor; 4 cases for *BRCA2*; and none for *TP53*. Somatic mutations totaled 70 identified variants, 11 in the *BRCA1* gene, 22 in *BRCA2* and 37 in *TP53*. For these, mutations with loss of function were observed in 6 cases for *BRCA1*, 14 for *BRCA2* and 35 for *TP53*. Most patients were diagnosed in the 50 to 60-year age group, with histological subtype HGSOC, in advanced stage of the disease and without a family history. The NGS methodology allowed the identification of variants with low allelic frequencies that are characteristic of somatic cases. The greater identification of germline variants with loss of function in *BRCA1/2* and somatic variants with loss of function in *TP53* corroborated data from previous studies, indicating the adequacy of the applied methodology. This work contributed to the expansion of knowledge about the germinal and somatic genetic events that occur in cases of epithelial cancer in the Brazilian population.

Este trabalho foi realizado na Divisão de Genética da
Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de
Câncer José de Alencar Gomes da Silva, sob
Orientação do Dr. Miguel Ângelo, e contou com apoio
Financeiro da FAPERJ, CNPq e Ministério da Saúde.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as mulheres brasileiras, diagnosticadas com câncer de ovário, que encontrem na pesquisa científica a esperança e a confiança, necessárias para suas lutas diárias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, à minha avó e a minha dinda por todo o apoio ao longo do Mestrado, principalmente, nos momentos mais difíceis que enfrentei nesses anos. Sou grata por terem acreditado em mim e pelo incentivo ao meu crescimento profissional.

Ao meu orientador Dr. Miguel Moreira, eu agradeço por me possibilitar trabalhar na área de câncer hereditário, por me incluir neste novo projeto do laboratório de genética. Agradeço por toda a paciência, pelas conversas e trocas de ideias sobre o trabalho.

À minha coorientadora, Dra. Anna Claudia Evangelista, também agradeço por me incluir na equipe deste projeto e ainda pela ajuda na busca e compreensão das características clínicas das pacientes.

Sou grata a todas as pacientes, as quais aceitaram doar suas peças cirúrgicas, em pró do desenvolvimento das pesquisas científicas.

Agradeço também ao patologista Dr. Fábio Carvalho pelo aceite em colaborar com o projeto e pela revisão histopatológica. Juntamente, agradeço a equipe da Divisão de Patologia do INCA, responsável pela organização das lâminas utilizadas no projeto.

Agradeço a chefe Banco Nacional de Tumor do INCA, Dra. Maria Theresa Accioly, e a aos membros da equipe, Diego e Luciana, por toda a disponibilidade e colaboração no processo de uso das amostras depositadas no BNT e também pelo auxílio com protocolos de extração.

Agradeço a Carol Nascimento, Cíntia, Gabriel, Rayque, Vanessa, Val, Sara, a todos do Laboratório de Genética Tumoral, pela ajuda com procedimentos metodológicos, pela troca de ideias, por tudo que me incentivou ampliar meu conhecimento. Agradeço à Carol Furtado, ao Daniel Matos e a Thalita Scandolaro que me ajudaram muito na parte do sequenciamento em larga escala.

Agradeço às minhas amigas Camila Nacif, Marcione Oliveira e Renata Jardim pela amizade que construímos no laboratório, por todo incentivo, por todas as conversas, conselhos, risadas, pelos momentos de confraternização. Sou grata por toda a preocupação comigo e por torcerem por mim.

Agradeço secretaria, aos auxiliares institucionais e de limpeza do laboratório, Abner, Andrea e Jéssica por toda a diversão e pelas conversas durante meus almoços, pelas companhias nos momentos de café na copa.

À equipe do Laboratório de Bioinformática e biologia computacional, Elvismary Armas, Mariana Boroni, Nicole Scherer que me auxiliou no desenvolvimento e na execução das análises para a obtenção dos resultados finais. Agradeço todas as explicações, reuniões *online* para a discussão sobre os dados.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação do INCA e aos órgãos de fomento Ministério da Saúde, CNPQ e Faperj pelo financiamento deste projeto.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACMG: *American College of Medical Genetics and Genomics*

ASCO: *American Society of Clinical Oncology*

BER: Reparo por Excisão de Bases (do inglês *Base Excision Repair*)

BNT: Banco Nacional de Tumores

BRCA1: *Breast Cancer gene 01*

BRCA2: *Breast Cancer gene 02*

DSB: quebra da dupla fita do DNA (do inglês *Double Strand Break DNA*)

dsDNA: DNA de dupla fita (do inglês *double strand DNA*)

EOC: Câncer de ovário epitelial (do inglês *epithelial ovarian cancer*)

FIGO: Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia

GATK: *Genome Analysis Toolkit*

HBOC: Câncer de Mama e Ovário Hereditário (do inglês *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*)

HGSOC: Câncer de ovário seroso de alto grau (do inglês *High Grade Serous Ovarian Cancer*)

HR: Reparo por Recombinação Homóloga (do inglês *Homologous Recombination*)

HGVS: *Human Genome Variation Society*

INCA: Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva

INDEL: inserção ou deleção de base única

LOH: Perda de Heterozigosidade (do inglês *Loss of Heterozygosity*)

NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*

NER: Reparo por Excisão de Nucleotídeos (do inglês *Nucleotide Excision Repair*)

NGS: Sequenciamento de Nova Geração (do inglês *Next Generation Sequencing*)

NHEJ: Reparo por junção não-homóloga (do inglês *Non-homologous end joining*)

OCCR: Região de Clusterização de Câncer de Ovário (do inglês *Ovarian Cancer Clusterization Region*)

OMS: Organização Mundial da Saúde

PARP: poli (ADP-ribose) polymerase

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês **Polymerase Chain Reaction**)]

RT: Representatividade Tumoral

SNP: Polimorfismo de base única (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*)

SSB: quebra da simples fita do DNA (do inglês *Single Strand Break DNA*)

ssDNA: DNA de simples fita (do inglês *single strand DNA*)

TCGA: *The Cancer Genome Atlas*

TP53: *Tumor protein 53*

VUS: Variante de Significado Incerto (do inglês *Variant of Unknown Significance*)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Subtipos histológicos Adenocarcinoma/Cistoadenocarcinoma do câncer de ovário epitelial: (A) seroso de alto grau ou HGSOC; (B) seroso de baixo grau; (C) Mucinoso; (D) Endometrióide; (E) Células claras.....	3
Figura 1.2: Etapas da via de reparo por recombinação homóloga (HR) aos danos de dupla fita do DNA.....	14
Figura 1.3: Interações proteicas de BRCA1 e BRCA2 no processo de reparo por recombinação homóloga à quebra de dupla fita do DNA.....	16
Figura 1.4: A diferença na resposta celular ao funcionamento ou à inibição de PARP. (A) Reversão do dano à fita simples de DNA. (B) Letalidade sintética pela ação de inibidor de PARP.....	19
Figura 4.1: Junção dos Produtos de PCR dos genes BRCA1, BRCA2 e TP53 para cada amostra de tumor e de sangue.....	27
Figura 4.2: Preparo das amostras para o sequenciamento por larga escala.....	28
Figura 4.3: Fluxograma das etapas das análises para as variantes germinativas e somáticas.....	32
Figura 5.1: Distribuição das médias de cobertura por base das amostras de tumor para o gene <i>BRCA1</i>	37
Figura 5.2: Distribuição das médias de cobertura por base das amostras de sangue para o gene <i>BRCA1</i>	37
Figura 5.3: Distribuição das médias de cobertura por base das amostras de tumor para o gene <i>BRCA2</i>	38
Figura 5.4: Distribuição das médias de cobertura por base das amostras de sangue para o gene <i>BRCA2</i>	38
Figura 5.5: Distribuição das médias de cobertura por base das amostras de tumor para o gene <i>TP53</i>	39
Figura 5.6: Distribuição das médias de cobertura por base das amostras de sangue para o gene <i>TP53</i>	39
Figura 5.7: Distribuição das variantes somáticas para cada gene (<i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> e <i>TP53</i>), conforme a consequência das alterações.....	49
Figura 5.8: (A) Localização das variantes germinativas na sequência codificante de DNA. (A) Provavelmente patogênicas ou patogênicas e VUS para <i>BRCA1</i> . (B)	

VUS e com conflito de patogenicidade para *BRCA2*. Figuras criadas no *site* https://www.cbioportal.org/mutation_mapper.....61

Figura 5.9: (A) Localização das variantes somáticas na sequência codificante de DNA. (A) Patogênicas e VUS para *BRCA1*. (B) Patogênicas e VUS para *BRCA2*. Figuras criadas no *site* https://www.cbioportal.org/mutation_mapper.....63

Figura 5.10: (A) Localização das variantes somáticas provavelmente patogênicas, patogênicas e VUS para *TP53* na sequência codificante de DNA. Figura criada no *site* https://www.cbioportal.org/mutation_mapper.....64

Figura 5.11: Análise integrada das variantes germinativas e somáticas com as características clínico patológicas de cada paciente.....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1: Número de casos incluídos e excluídos para cada subtipo histológico.....	23
Tabela 5.1: Descrição do subtipo histológico, do número de casos incluídos, da mediana de idade ao diagnóstico, da representatividade tumoral, do estadiamento e do histórico familiar das pacientes.....	34
Tabela 5.2: Valores médio, mínimo e máximo da cobertura por amplicon para os genes <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> e <i>TP53</i>	36
Tabela 5.3: Enumeração pela classificação e tipo das variantes germinativas detectadas nos genes <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> e <i>TP53</i>	41
Tabela 5.4: Variantes germinativas identificadas nas regiões codificantes do gene <i>BRCA1</i> como patogênicas, com conflito de patogenicidade ou sem classificação.....	43
Tabela 5.5: Variantes germinativas identificadas nas regiões codificantes do gene <i>BRCA2</i> como patogênicas, VUS ou com conflito de patogenicidade.	45
Tabela 5.6: Enumeração pela classificação e tipo das variantes germinativas detectadas nos genes <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> e <i>TP53</i>	48
Tabela 5.7: Variantes somáticas identificadas nas regiões codificantes do gene <i>BRCA1</i> como patogênicas e sem classificação depositada no ClinVar.....	50
Tabela 5.8: Variantes somáticas identificadas nas regiões codificantes do gene <i>BRCA2</i> como patogênicas e VUS.....	52
Tabela 5.9: Variantes somáticas identificadas nas regiões exônicas e intrônicas do gene <i>TP53</i> como provavelmente patogênicas, patogênicas, VUS, com conflitos de patogenicidade.....	55
Tabela 5.10: Proporção alélica nas variantes com LOH identificadas nas amostras de sangue e tumor.....	59

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Epidemiologia do Câncer de Ovário:.....	1
1.2	Histopatologia do Câncer de Ovário:.....	1
1.3	Biologia Molecular do Câncer de Ovário:.....	4
1.4	Variantes genéticas no Câncer de Ovário:.....	6
1.5	Variantes genéticas germinativas nos genes <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> e <i>TP53</i> :.....	8
1.6	Variantes genéticas somáticas nos genes <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> e <i>TP53</i> :.....	10
1.7	Vias de reparo de danos ao DNA:.....	12
1.8	Vias de reparo aos danos de dupla fita de DNA:.....	13
1.9	Tratamento clínico para o câncer de ovário epitelial:.....	17
2.	JUSTIFICATIVA.....	20
3.	OBJETIVO PRINCIPAL.....	21
3.1	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	21
4.	METODOLOGIA.....	22
4.1	Seleção das amostras.....	22
4.2	Isolamento do material genético:.....	23
4.3	Amplificação das regiões alvo:.....	24
4.4	Preparo das bibliotecas e Sequenciamento de Nova Geração:.....	25
4.5	Análise dos dados obtidos por bioinformática:.....	29
4.6	Classificação e Nomenclatura das variantes:.....	31
5.	RESULTADOS.....	33
5.1	Descrição dos casos incluídos:.....	33
5.2	Sequenciamento de Nova Geração:.....	35
5.3	Variantes genéticas germinativas:.....	40
5.3.1	<u>Variantes genéticas germinativas no gene <i>BRCA1</i></u> :.....	42
5.3.2	<u>Variantes genéticas germinativas no gene <i>BRCA2</i></u> :.....	44

5.3.3	<u>Variantes genéticas germinativas no gene <i>TP53</i>:</u>	46
5.4	Variantes genéticas somáticas:	46
5.4.1	<u>Variantes genéticas somáticas no gene <i>BRCA1</i>:</u>	49
5.4.2	<u>Variantes genéticas somáticas no gene <i>BRCA2</i>:</u>	51
5.4.3	<u>Variantes genéticas somáticas no gene <i>TP53</i>:</u>	54
5.5	Perda de Heterozigosidade:	58
5.6	Variantes germinativas de <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> nas sequências codificantes:	60
5.7	Variantes somáticas de <i>BRCA1</i>, <i>BRCA2</i> e <i>TP53</i> nas sequências codificantes:	62
5.8	Análise integrada das variantes germinativas e somáticas:	65
6.	DISCUSSÃO	68
6.1	<u>Metodologia do sequenciamento em larga escala:</u>	68
6.2	<u>Eventos genéticos em câncer de ovário:</u>	69
6.3	<u>Limitações do estudo:</u>	75
7.	CONCLUSÃO	76
8.	REFERÊNCIAS	78
9.	ANEXOS	94
	Anexo 01:	95
	Anexo 02:	108
	Anexo 03:	110
	Anexo 04:	113
	Anexo 05:	115
	Anexo 06:	116
	Anexo 07:	118
	Anexo 08:	119
	Anexo 09:	121
	Anexo 10:	122
	Anexo 11:	123

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia do Câncer de Ovário:

O câncer de ovário apresenta a nível global uma incidência em torno de 314.000 novos casos por ano e uma taxa de aproximadamente 207.500 óbitos, representando uma das neoplasias ginecológicas com os mais altos índices de mortalidade (SUNG *et al.*, 2021). Devido à alta mortalidade e a um período de sobrevida de 5 anos abaixo de 45%, o câncer de ovário tornou-se o sétimo tipo mais comum de neoplasia e a oitava causa de morte por câncer entre mulheres (FERLAY *et al.*, 2015; WEBB; JORDAN, 2017). A incidência por idade é mais elevada nas regiões norte, central e oriental da Europa e na América do Norte; a Europa ocidental e a Austrália apresentam taxas intermediárias; enquanto as menores taxas estão na Ásia e na África (WEBB; JORDAN, 2017).

No Brasil, este tipo de câncer é o oitavo mais incidente na população geral e foram estimados 6.650 casos novos para cada ano do triênio de 2020- 2022, correspondendo a 6,18 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2020). De acordo com as estimativas do INCA (2020), sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de ovário ocupa a sétima posição de tumores mais frequentes nas Regiões Nordeste e Norte com um risco estimado de 5,67/100 mil e de 3,28/100 mil, respectivamente. Nas Regiões Sudeste (7,01/100 mil) e Centro-Oeste (5,09/100 mil) esta neoplasia ocupa a oitava posição e, na Região Sul (7,06/100 mil) ocupa a nona posição.

Cerca de 3/4 dos cânceres de ovário apresenta-se em estágio avançado no momento do diagnóstico, por conta da localização anatômica desfavorável. Ademais, estratégias de detecção pouco eficazes corroboram para a detecção tardia do câncer, o qual em sua maioria também está associado ao pior prognóstico e à menor sobrevida (TOSS *et al.*, 2015).

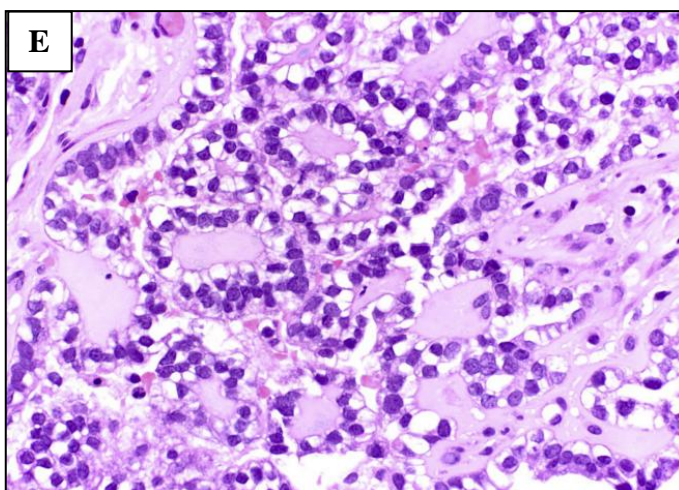
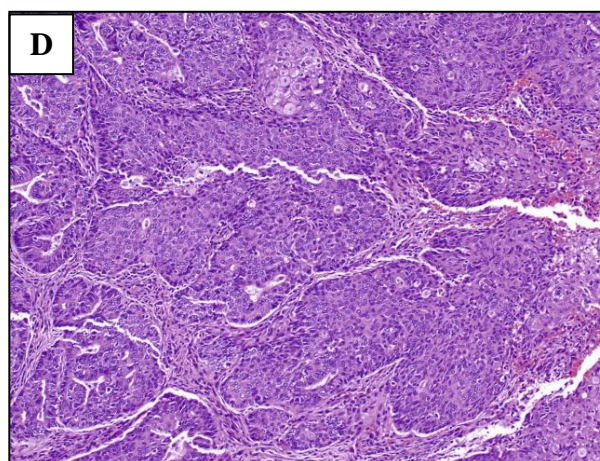
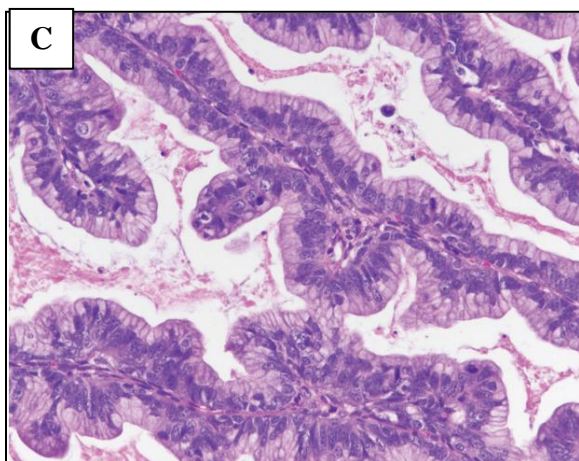
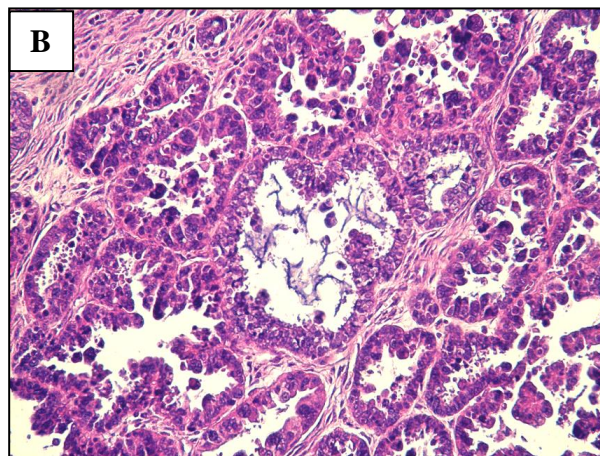
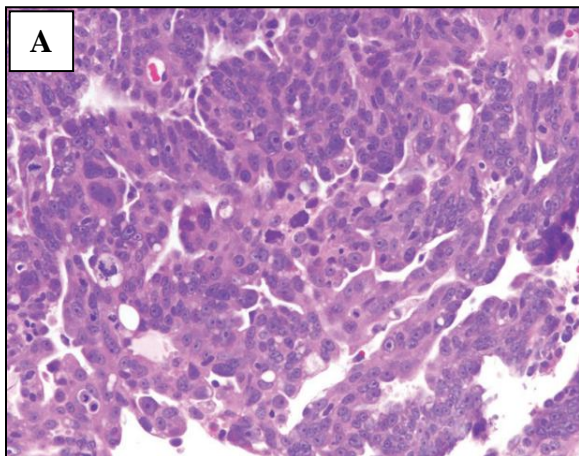
1.2. Histopatologia do Câncer de Ovário:

O câncer de ovário pode se originar do tecido epitelial, das células endócrinas do estroma ou das células germinativas; a classificação da neoplasia segue a origem primária do carcinoma (JELOVAC; ARMSTRONG, 2011). O tipo histológico epitelial representa aproximadamente 90% dos casos e é considerada uma doença heterogênea por abranger os diferentes subtipos: Adenocarcinoma ou Cistadenocarcinoma Seroso; Adenocarcinoma ou Cistadenocarcinoma Mucinoso; Adenocarcinoma ou Cistadenocarcinoma de Células claras; adenocarcinoma Endometriode; adenocarcinoma ou cistadenocarcinoma Seroso papilar; e

Tumor de Brenner maligno; seguindo a classificação da OMS (GADDUCCI *et al.*, 2019; JELOVAC; ARMSTRONG, 2011) (Figura 1.1). A Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO) propôs o estadiamento de I-IV do câncer de ovário com base na histopatologia e no potencial de agressividade e invasão tumoral; sendo a maioria dos casos diagnosticados nos estágios avançados III-IV (PRAT *et al.*, 2015; GARZIERA *et al.*, 2019). Um modelo dualístico foi elaborado para classificar o câncer de ovário epitelial (EOC) em dois grupos, de acordo com as características genético moleculares e clinico-patológicas; resultando na divisão em tipo I de baixo grau e em tipo II de alto grau (KOSSAI *et al.*, 2018; KURMAN; SHIH, 2011). Os carcinomas do tipo I somam cerca de 25% dos casos EOC, sendo diagnosticados em estágios precoces e englobam os subtipos seroso de baixo grau, endometriode, mucinoso e de células claras. O tipo II representa cerca de 75% dos casos, com detecção em estágios avançados e rápida progressão tumoral; tal grupo inclui os subtipos seroso de alto grau, alto grau endometriode, carcinosarcoma e carcinoma indiferenciado (DION *et al.*, 2020).

As neoplasias do tipo I caracterizam-se pela rara presença de mutações no gene *TP53* e por alterações em 70% dos casos nos genes relacionados à via de sinalização MAPK como *BRAF*, *KRAS*, *PTEN*, *CTNGB1*, *PIK3CA* (TESTA *et al.*, 2018). O tipo II apresenta alta instabilidade genômica, com mutações bastante frequentes no gene *TP53* e em demais genes da via de reparo ao DNA por recombinação homóloga (DION *et al.*, 2020). O subtipo epitelial seroso de alto grau (HGSOC) é o mais frequente e com maior taxa de mortalidade, geralmente são diagnosticados como casos bilaterais com potencial acometimento da cavidade peritoneal devido ao alto poder de invasão. Tal subtipo histológico apresenta mutações de origem somática no gene *TP53* em 96% dos casos, seguido do gene *BRCA1* com cerca de 12,5% (sendo 9% mutação de origem germinativa e 3,5% de origem somática), *BRCA2* com 11,5% (sendo 8% mutação de origem germinativa e 3,3% de origem somática) e de outros genes reguladores da estabilidade genômica com mutações germinativas e/ou somáticas (TESTA *et al.*, 2018).

Figura 1.1: Subtipos histológicos Adenocarcinoma/Cistoadenocarcinoma do câncer de ovário epitelial: (A) seroso de alto grau ou HGSO; (B) seroso de baixo grau; (C) Mucinoso; (D) Endometrioide; (E) Células claras.



Fonte das imagens: (A) e (C) HIRST *et al.*, 2018; (B) IONESCU *et al.*, 2017; (D) e (E) FADARE; PARKASH, 2019.

1.3. Biologia Molecular do Câncer de Ovário:

A tumorigênese decorre de eventos genéticos e/ou epigenéticos que causam mutações, translocações ou ampliações suficientes para modificar genes relacionados à proliferação celular e ao controle da morte celular. Tais alterações ativam as transformações de proto-oncogenes em oncogenes, ocasionando o ganho de função dos alelos destes genes e estimulando o crescimento tumoral. Em contrapartida, estas alterações promovem a inativação de ambos os alelos dos genes supressores de tumor, resultando na supressão do processo de controle do ciclo celular (AUNOBLE et al, 2000; THOMPSON; THOMPSON, 2007). Em casos de tumor de ovário, a via de reparo por recombinação homóloga (HR) apresenta os maiores índices de mutação, representando cerca de 50% das alterações em HGSOc. Como consequência às modificações nos genes *BRCA1/2* e *TP53*, ocorre que o acúmulo de mutações germinativas e/ ou somáticas gera instabilidade genômica. Instabilidade decorrente do funcionamento inadequado das vias de reparo ao DNA, dos controles do ciclo celular e apoptose e; dessa forma, aumentam os riscos para o desenvolvimento de câncer de mama e/ou ovário (MAXWELL et al., 2017). Outros genes como *ATM*, *PTEN*, *RAD51C*, *BARD1*, *CHECK2*, *PALB2* também atuam nas vias de reparo ao DNA e; assim, mutações monoalélicas nestes genes propiciam casos hereditários de câncer de mama e/ou ovário (DELL VALLE et al., 2020).

Nos casos hereditários, os eventos de perda de função do alelo selvagem ocorrem na presença de variantes patogênicas que alteram o estado heterozigótico para homozigótico da célula tumoral, o que se caracteriza como perda de heterozigosidade (KECHIN et al., 2018). A perda de heterozigosidade (LOH) pode ser fundamental para o desenvolvimento da carcinogênese por estar relacionada com a teoria dos dois eventos de Knudson; o qual estabeleceu a hipótese da perda da função alélica em duas etapas, sendo diferentes para casos germinativos e somáticos (KECHIN et al., 2018; MAXWELL et al., 2017; RYLAND et al., 2015). Com relação aos casos germinativos, o fenótipo tumoral se desenvolve a partir da mutação herdada (germinativa), que confere uma susceptibilidade genética; associado à perda do segundo alelo funcional por mutação adquirida (somática) em genes supressores de tumor. Dessa forma, o resultado destes dois eventos mutacionais é a perda de função de ambos os alelos e por consequência, o favorecimento da progressão tumoral. Enquanto que para casos somáticos ambos os eventos de perda de função alélica acontecem por mutações adquiridas, ou seja, somáticas (KNUDSON, 1971; 2001).

Contudo, os autores Kinzler e Vogelstein (1997) adicionaram à tumorigênese de forma hereditária e somática, o conceito de *caretakers* e *gatekeepers* aos genes supressores de

tumor. Parte-se da premissa que *gatekeepers*, a exemplo do gene *TP53*, atuam no controle da proliferação celular, da diferenciação e da apoptose. Por conseguinte, mutações em tais genes impactam diretamente no aumento da taxa mutacional e na promoção da neoplasia; corroborando com o modelo de Knudson de apenas dois eventos mutacionais para a carcinogênese. No entanto, os *caretakers* são categorizados como genes de reparo ao DNA e de manutenção da estabilidade genômica, possuem um efeito indireto na contribuição do fenótipo tumoral; sendo assim é necessário um acúmulo de mutações com no mínimo quatro eventos mutacionais. O padrão de herança autossômica dominante associada aos *caretakers* como *BRCA1/2* requer a presença do alelo não funcional do gene *caretaker* herdado do parente afetado (susceptibilidade genética), seguido da mutação do alelo selvagem do gene herdado do parente não afetado e também deve ocorrer a perda de função de ambos os alelos do gene *gatekeeper* (mutações adquiridas).

Pacientes com mutações em *BRCA1/2* apresentam diferentes riscos para o desenvolvimento de câncer de mama ou ovário, reflexo de variações na penetrância para cada gene. A diversidade de mutações impacta na associação entre genótipo e fenótipo e por sua vez, na determinação dos riscos para o desenvolvimento do câncer que oscilam, dependendo da constituição genética do indivíduo, no que diz respeito à ancestralidade e ao histórico familiar; e de fatores ambientais (RAMUS; GAYTHER, 2009). Outro fator que também pode influenciar no risco é o tipo e a localização da mutação, pois mutações presentes em determinadas regiões do gene *BRCA1* ou *BRCA2* podem ampliar ou diminuir significativamente o risco para o câncer de mama ou ovário (RISCH *et al.*, 2001). Estudos apontam para um aumento no risco de câncer de ovário na presença de mutações na região *ovarian cancer cluster region* (OCCR) do éxon 11 (nucleotídeos 3035pb–6629pb) do gene *BRCA2*, assim como para mutações na região 3' do gene *BRCA1* ou na porção central entre os nucleotídeos 2041 a 4190 do mesmo gene (GAYTHER *et al.*, 1995; RAMUS; GAYTHER, 2009; THOMPSON; EASTON, 2002).

Por estar mutado em diversos tipos de câncer, o gene *TP53* apresenta um papel complexo na tumorigênese, o que acarreta na perda ou no ganho de função para a atividade transcricional de p53, dependendo do tipo de mutação e da origem tumoral (BOYARSKIKH *et al.*, 2020). No desenvolvimento do carcinoma de ovário o gene *TP53* sofre alterações deletérias por meio de eventos somáticos; contudo ocorre também a susceptibilidade genética para a Síndrome de Li-Fraumeni aos portadores de mutações germinativas. Tal síndrome apresenta padrão autossômico dominante com alta penetrância e riscos de desenvolvimento de tumor de mama, sarcomas, tumor cerebral e adrenocortical, que excedem em 90% para mulheres (PIETRAGALLA *et al.*, 2020).

Em suma, os fatores genéticos para iniciação tumoral dependem da inativação bialélica dos genes supressores tumorais. O mecanismo celular necessário para a promoção da carcinogênese requer o estado recessivo a nível celular, seja por eventos germinativos e somáticos ou apenas por eventos somáticos. As diferenças na população em geral entre os riscos de desenvolvimento e a proporção de casos relacionados com condições hereditárias explicam-se pela presença da susceptibilidade genética. Uma predisposição em que, invariavelmente, há a necessidade da herdabilidade de uma mutação genética de algum dos progenitores; favorecendo a tumorigênese em idade precoce e maior frequência de casos bilaterais (SHULMAN, 2010).

1.4. Variantes genéticas no Câncer de Ovário:

Estudos associados ao sequenciamento genômico completo possibilitam a investigação de variantes genéticas comuns como os polimorfismos de base única (SNPs), os quais se estima que contabilizem cerca de 10 milhões ao longo do genoma humano (GARCÍA-CLOSAS et al., 2011). A detecção de SNPs indica regiões genômicas de susceptibilidade genética para o desenvolvimento tumoral, sendo que para o caso do câncer de ovário são selecionados oncogenes, genes supressores tumorais, genes relacionados às vias de reparo como também aos hormônios estrogênio e progesterona (BOLTON *et al.*, 2012). Outro tipo de polimorfismo refere-se às inserções ou deleções (INDELS) que podem variar de 1 a 10.000 pares de bases no genoma humano e também estão associados à predisposição para doenças genéticas (MULLANEY et al., 2010).

Os SNPs são considerados mutações de ponto ou de base única, em que ocorre a modificação de um alelo em um gene por meio de substituição, deleção ou inserção; resultando em um alelo alternativo. Tais modificações podem ser (i) substituições sinônimas, em que ocorre alteração no códon sem o comprometimento da sequência de aminoácidos; ou (ii) não-sinônimas, em que a alteração causa a codificação de um aminoácido diferente (GRIFFITHS *et al.*, 2009). Dentre as mutações não-sinônimas há a do tipo *missense* que modifica uma base na trinca de um códon e; conseqüentemente, ocorre a substituição por outro aminoácido que distingue da sequência original da proteína. Outro tipo é a mutação *nonsense*, que resulta na troca de um códon codificante para um aminoácido por um códon de parada e, assim, causa uma interrupção prematura na leitura da sequência. Existe também a mutação *frameshift* resultante da inserção ou deleção de poucas bases capazes de alterar a sequência aberta de leitura que permite a tradução da proteína (THOMPSON; THOMPSON, 2007).

A aplicação de painéis gênicos em testes genéticos possibilita, por meio do sequenciamento em larga escala, a identificação de variantes genéticas de predisposição à tumorigênese. Detecção que não é restrita apenas aos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, pois se aplica também aos demais associados à via de reparo por recombinação homóloga com baixa a elevada penetrância (COUCH *et al.*, 2017; FOOTE *et al.*, 2017; WALSH *et al.*, 2011). As mutações detectadas nas regiões codificantes são categorizadas de acordo às suas consequências em: (1) patogênica, (2) provavelmente patogênica, (3) significado clínico incerto, (4) provavelmente benigna, (5) benigna; de acordo com recomendações da *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) (PLON *et al.*, 2008; RICHARDS *et al.*, 2015).

Variantes sinônimas ou silenciosas são categorizadas como benignas, por não causarem nenhum impacto estrutural ou funcional à proteína. Variantes *nonsense* ou *frameshift*, na maior parte dos casos, são categorizadas como patogênicas, pois são responsáveis por gerar proteínas truncadas, devido à terminação prematura da sequência de leitura; ou por produzir proteínas não canônicas, que carecem de domínios funcionais (LYRA JR *et al.*, 2021). Modificações patogênicas ocorrem tanto em regiões codificantes do gene quanto em regiões regulatórias, em que substituições ou Indels podem reduzir ou inativar a produção proteica. Desta forma, é possível afetar os níveis de expressão gênica como também de alterar o processo de *splicing* por meio da inativação de sítio doador ou acceptor (SZABO; WORLEY; MONTEIRO, 2004). No banco de dados ClinVar estão depositadas 9.324 variantes germinativas para o gene *BRCA1*, sendo 3.417 patogênicas e 3.098 VUS; para o gene *BRCA2* há um total de 13.548 variantes patogênicas, dentre estas 3.964 são patogênicas e 5.511 consideradas VUS (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>).

Existem variantes de significado incerto (VUS), que não são classificadas como patogênica ou benigna por não apresentarem uma definição quanto ao efeito da variante. Tais variantes oscilam dentre os critérios de classificação, sendo geralmente variantes *missense*, inserções, deleções *inframe* ou variantes intrônicas fora dos sítios canônicos de *splicing* (LYRA JR *et al.*, 2021). Os dados conflitantes para a classificação de uma VUS impactam na estimativa do risco de câncer e no manejo clínico do paciente, pois a probabilidade de tais variantes serem reclassificadas como patogênicas varia entre 5% a 94,9% (FANALE *et al.*, 2021). Como forma de determinar a relevância clínica de uma VUS, ensaios funcionais são desenvolvidos para analisar a influência na função proteica, ou no mecanismo de *splicing*. Esses ensaios, juntamente com informações epidemiológicas, do histórico familiar, coocorrência com mutação deletéria e características da patologia tumoral, tentam prever o efeito da variante (CARVALHO *et al.*, 2007; RODRIGUEZ-BALADA *et al.*, 2016).

1.5. Variantes genéticas germinativas nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*:

Estudos epidemiológicos apontam riscos mais elevados para câncer de mama e/ou ovário em indivíduos aparentados em comparação à população em geral, indicando a propensão para múltiplos casos, geralmente em idade precoce (EASTON *et al.*, 1993). Investigações sobre segregação familiar constataram que a genética influencia nos padrões de ocorrência de câncer, indicando um possível modo de transmissão hereditário e de susceptibilidade genética (NEWMAN *et al.*, 1997). Verificou-se que alterações em um gene localizado no cromossomo 17q, causaria a predisposição hereditária ao câncer de mama e/ou ovário com padrão alélico autossômico dominante em famílias com altos índices de casos (NAROD *et al.*, 1991; NEWMAN *et al.*, 1997). As técnicas de mapeamento gênico e clonagem do cromossomo 17q21 associaram a susceptibilidade genética ao gene *BRCA1* (EASTON *et al.*, 1993; MIKI *et al.*, 1994; SOLOMON; BAKER, 1991), posteriormente um segundo gene, localizado no cromossomo 13q também foi reconhecido por aumentar os riscos de câncer de mama; sendo denominado *BRCA2* (WOOSTER *et al.*, 1995).

A presença de mutações germinativas nos genes *BRCA1* e/ou *BRCA2* confere um maior risco acumulativo para o desenvolvimento de câncer de mama e/ou ovário, comparado com a população em geral, a qual apresenta, respectivamente, risco entre 10 a 15% e 1 a 2%, respectivamente (ANTONIOU *et al.*, 2003; EASTON *et al.*, 1995). Variantes germinativas patogênicas nos genes *BRCA1/2* estão presentes em cerca de 11 a 18% dos casos de câncer de ovário (HAUNSCHILD; TEWARI, 2021). Estima-se que, ao longo da vida, portadores dessas mutações apresentam entre 60 a 85% de chances em desenvolver câncer de mama e 15 a 40% para câncer de ovário (WOOSTER; WEBER, 2003); sendo que o risco de câncer de ovário para portadores de mutações em *BRCA1* varia 39 a 40% e para *BRCA2* entre 11 a 18% (MYLAVARAPU *et al.*, 2018).

A predisposição hereditária com maior destaque, causada por mutações germinativas em genes de susceptibilidade, é denominada como Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário (HBOC); sendo cerca de 60% dos casos relacionados aos genes de alta penetrância *BRCA1/2*. Esta síndrome caracteriza-se por histórico familiar de câncer de mama e/ou ovário e idade de manifestação precoce (KOBAYASHI *et al.*, 2013). A HBOC ocorre em todas as etnias e estima-se que a prevalência de variantes patogênicas em *BRCA1/2* varie de 1 em 400 a 1 em 800, dependendo da ascendência étnica (PETRUCELLI *et al.*, 2010). Algumas etnias como os judeus Ashkenazi apresentam mutações fundadoras 185delAG no gene *BRCA1* com a frequência de 1% na população e uma segunda mutação fundadora 5382insC 0.1% a 0.13% das mulheres Ashkenazi; enquanto para o gene *BRCA2* a mutação 6174delT é

encontrada em cerca de 1% a 1.52% (FERLA *et al.*, 2007; KEDAR-BARNES; ROZEN, 2004). Tais mutações fundadoras apresentam uma prevalência conjunta de 2 a 3% na população Ashkenazi, o que aumenta mais a proporção de casos hereditários (REBBECK *et al.*, 2018).

Tal síndrome autossômica dominante aumenta a predisposição para o surgimento não apenas de tumores de mama e ovário, como também de outros tipos tumorais como câncer de próstata, pâncreas, estômago e melanoma (EWALD *et al.*, 2016). A identificação clínica do probando para HBOC ocorre por meio de alguns critérios como os estabelecidos pela *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) e *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN, os quais incluem dados como: (a) dois ou mais casos de câncer de mama e/ou ovário em idade precoce (pré-menopáusicos); (b) múltiplos casos na família; (c) câncer de mama bilateral e (d) padrão de transmissão vertical (INCA, 2009).

Mutações genéticas germinativas em heterozigose no gene *TP53* estão relacionadas à Síndrome de Li-Fraumeni, a qual aumenta os índices de risco ao desenvolvimento de variados tipos de câncer (SCHNEIDER *et al.*, 1999). Estima-se que mais de 50% das famílias com fenótipo de Li-Fraumeni apresentam mutações hereditárias em *TP53*; sendo assim, susceptíveis a sarcomas, tumores de mama, do sistema nervoso central, adrenocorticais e leucemias (LI; LI, 2018; NICHOLS *et al.*, 2001). Embora menos frequentes, esta síndrome também contribui para linfomas, câncer de pulmão, câncer gástrico, de pâncreas, de próstata e tumores ginecológicos como o câncer de ovário seroso de alto grau (BIRCH *et al.*, 2001; BOYARSKIKH *et al.*, 2020; FELIX *et al.*, 2014). Mais de 1500 variantes germinativas no gene *TP53* já foram depositadas no banco de dados IARC *TP53* (<http://www-p53.iarc.fr/Germline.html>). Na população brasileira predomina a variante R337H nas regiões sul e sudeste que, por apresentar altas frequências, está relacionada com a propensão ao desenvolvimento de câncer de mama e ovário hereditários, principalmente em probandos *BRCA* negativos (ACHATZ *et al.*, 2007; CIPRIANO *et al.*, 2019; CURY *et al.*, 2014). Garritano *et al* (2010) analisou haplótipos brasileiros relacionados com a segregação desta variante R337H, e concluiu que a frequente ocorrência da mesma suporta a hipótese de um efeito fundador originário da população portuguesa.

O avanço das tecnologias de sequenciamento em larga escala como o de Nova Geração (NGS) possibilitou a aplicação de testes genéticos com melhor custo-efetivo, principalmente para pacientes com indícios de variantes germinativas nos genes *BRCA1/BRCA2* e demais genes relacionados à susceptibilidade para a forma hereditária (GONZÁLEZ-SANTIAGO *et al.*, 2020). O histórico familiar e/ou pessoal de um paciente configura um critério clínico indicativo ao teste genético, por sugerir que tal indivíduo apresente um potencial risco para a

presença de variante germinativa patogênica (NEFF *et al.*, 2017). Oferecer testes genéticos aos parentes de indivíduos com variante patogênica torna-se importante para a detecção de portadores de síndromes de predisposição hereditária ao câncer. Os portadores identificados são, em sua maioria, parentes de primeiro a terceiro grau, os quais podem se beneficiar dos programas de Aconselhamento Genético (BERLINER *et al.*, 2013). Trata-se de programas que visam o conhecimento sobre a ocorrência ou a possibilidade do desenvolvimento tumoral em uma família. Questões estas que auxiliam no diagnóstico precoce, na prevenção, no planejamento de medidas de vigilância aplicáveis às diferentes situações de alto risco para câncer; associando aspectos psicossociais e afetivos para a orientação do paciente e o manejo clínico do mesmo (INCA, 2009).

1.6. Variantes genéticas somáticas nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*:

Além das variantes germinativas, também ocorrem alterações somáticas nos genes de reparo ao DNA. As mutações somáticas são menos investigadas em comparação às germinativas, contudo, há no panorama científico alguns estudos que integram variantes germinativas e somáticas; detectando alterações nos genes HR como *BRCA1/BRCA2* e das demais vias de reparo ao DNA a partir de material genético coletado de amostras de tumor e de sangue (MOSCHETTA *et al.*, 2016).

A investigação realizada pela instituição *The Cancer Genome Atlas Research Network* (2011) relatou 3% de mutações para os genes *BRCA1/2* em uma coorte de 316 pacientes com câncer de ovário epitelial seroso de alto grau a níveis III ou IV. Hennessy *et al.* (2010) detectou 39% de variantes somáticas em um grupo de 28 pacientes com mutações germinativas em *BRCA1/2*, uma taxa de inesperada para coortes de pacientes não selecionados. Em uma coorte de 390 carcinomas de ovário, Pennington *et al.* (2014) identificou 9% de variantes somáticas em ao menos um ou mais dos 13 genes HR investigados, dentro do grupo de pacientes (31%) que obteve variante germinativa e/ou somática. Kanchi *et al.* (2014) reinvestigou amostras analisadas pelo TCGA e de novos casos incluídos para a identificação de variantes patogênicas; o que resultou na descrição de novas variantes em novos genes e em outros como *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* já relacionados com o câncer de ovário. Apesar das mutações nos genes envolvidos nas vias de reparo ao DNA, o gene *TP53* é o mais prevalente em mutações nos carcinomas HGSOV, correspondendo a cerca de 91% dos casos (PATCH *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2019).

Cada coorte analisada apresenta variações no percentual de variantes somáticas identificadas devido à influência de alguns fatores como seleção dos pacientes, tipo

histológico, métodos de investigação aplicados no estudo. Porém, é possível afirmar que mutações somáticas em *BRCA1/2* ocorrem em aproximadamente 5 a 7% dos casos de câncer de ovário; sendo assim, estima-se que de cada 4 a 5 pacientes com mutação germinativa, 1 pode ser portador de variante somática em *BRCA1/2* (MOSCHETTA *et al.*, 2016).

O subtipo histológico mais avaliado é o seroso de alto grau por ser o mais frequente, o que torna mais escasso o conhecimento sobre alterações em outros subtipos histológicos epiteliais. A fim de elucidar um pouco o perfil mutacional dos outros subtipos, Sugino *et al.*, (2019) analisou na população japonesa variantes em subtipos epiteliais além de HGSOE, tais como carcinomas de células claras, endometrioides, mucinoso; o que resultou em 12% dos casos HGSOE e 5% para células claras ou endometrioides com variantes somáticas em *BRCA1/2*. Com relação ao gene *TP53*, Li *et al.* (2019) registrou mutações somáticas neste gene em 4 de 5 casos endometrioides, 8 de 10 tumores mistos e 2 de 5 em células claras. Zhao *et al.* (2017) avaliou, na população chinesa, variantes somáticas e germinativas nos genes HR em uma coorte de 50 pacientes com EOC; com relação ao cenário somático foram detectados 5 casos (10%) com apenas variantes somáticas nos genes *BRCA1/2*, *RAD50* e *RAD54B*. Para a população chinesa, também houve a investigação de Zhang *et al.* (2021) que analisou um total de 65 casos de câncer de ovário, em que 49 apresentavam o ovário como sítio primário, 10 eram lesões metastáticas e 6 de origem desconhecida. Tal análise resultou em 595 alterações somáticas clinicamente relevantes em 317 genes; sendo o gene *TP53* o mais mutado em 86.15% (56/65) dos casos.

Nos bancos de dados científicos, além dos estudos já citados, encontram-se investigações, em diferentes populações, que integram a análise de variantes germinativas e somáticas nos genes HR em casos de câncer de ovário do tipo epitelial. Descrição de variantes para a população britânica (CUNNINGHAM *et al.*, 2014); para a população húngara (ENYEDI *et al.*, 2016); para a população italiana (MAFFICINI *et al.*, 2016) e para a população norte-americana (HUANG *et al.*, 2019; JORGE *et al.*, 2020). Contudo, estudos carecem de investigações sobre variantes somáticas exclusivamente em câncer de ovário para a população brasileira. Uma vez que as análises no cenário brasileiro abordam sobre variantes germinativas em EOC (MAISTRO *et al.*, 2016), sobre as alterações germinativas em HBOC (ALEMAR *et al.*, 2017; CARVALHO *et al.*, 2020; MAKSIMENKO *et al.*, 2018; PALMERO *et al.*, 2016;2018; SILVA *et al.*, 2014) ou sobre rearranjos genômicos (EWALD *et al.*, 2016).

Tais estudos científicos têm como objetivo conhecer as mutações somáticas nos genes envolvidos na via de reparo ao DNA, o que auxilia na compreensão dos eventos deletérios que culminaram no surgimento e na evolução clonal do tumor (JONSSON *et al.*, 2019). Além de possibilitar o entendimento sobre a heterogeneidade tumoral, as alterações genéticas

presentes nas células tumorais, sejam SNPs ou variações em número de cópias; podem ser consideradas biomarcadores terapêuticos (BASHASHATI *et al.*, 2013). Investiga-se ainda que mutações nos genes HR, principalmente nos genes *BRCA1/2* em casos HGSOV, podem favorecer o desenvolvimento de terapias-alvo personalizadas e ajudar na decisão clínica adequada a cada tipo tumoral (JONSSON *et al.*, 2019).

1.7. Vias de reparo de danos ao DNA:

O material genético dos organismos é susceptível a danos espontâneos ou induzidos, que ocorrem devido à ação de agentes endógenos resultantes de reações do metabolismo como a hidrólise e oxidação; como também de agentes externos químicos e/ou físicos oriundos do meio ambiente, a exemplo da exposição às radiações ionizantes ou aos raios ultravioletas (CHATTERJEE; WALKER, 2017; SNUSTAD; PETER, 2012). Tais lesões ao DNA são removidas por mecanismos de reparo que estão presentes nas células, como forma de evitar a geração de modificações na molécula do DNA e, por conseguinte, uma instabilidade genética (ALBERTS *et al.*, 2015). A proteção e a manutenção da integridade genômica acontece através de vias existentes em organismos eucariotos, nos quais as vias de reparo por excisão de bases (BER) e por excisão de nucleotídeos (NER) reparam quebras em fitas simples de DNA (SSBs); enquanto as quebras em fita dupla (DSBs) são reparadas pelas vias de reparo por junção não-homóloga (NHEJ) e pela recombinação homóloga (HR) (CHATTERJEE; WALKER, 2017; LOMBARD, 2005).

A regulação da ativação de cada via depende das fases do ciclo celular para que a progressão do ciclo celular seja possível e impeça o acúmulo de mutações, que não só induzem a apoptose e/ou a senescência celular, como também propiciam o desenvolvimento da carcinogênese e de outras doenças metabólicas (CHATTERJEE; WALKER, 2017; SHIMIZU *et al.* 2014;). A via de reparo BER ocorre, basicamente, com a atividade das enzimas DNA glicosilases que são responsáveis por reconhecer a base danificada na sequência de DNA, seguido da clivagem deste sítio e da remoção da base pelas enzimas AP endonucleases e, por fim, a inserção da correta base (ALBERTS *et al.*, 2015; WALLACE *et al.* 2012). A segunda via para quebra de fita simples, a via de reparo NER, acontece para a correção de distorções na dupla hélice do DNA e na estrutura do genoma. Esta via é capaz de reparar uma variedade de lesões em diversas estruturas com o auxílio de NER fatores como GGR, DDB2 e XPC, que são ubiquitinados para conduzir uma cascata de sinalização que reverta a lesão ao DNA (SPIVAK *et al.*, 2015).

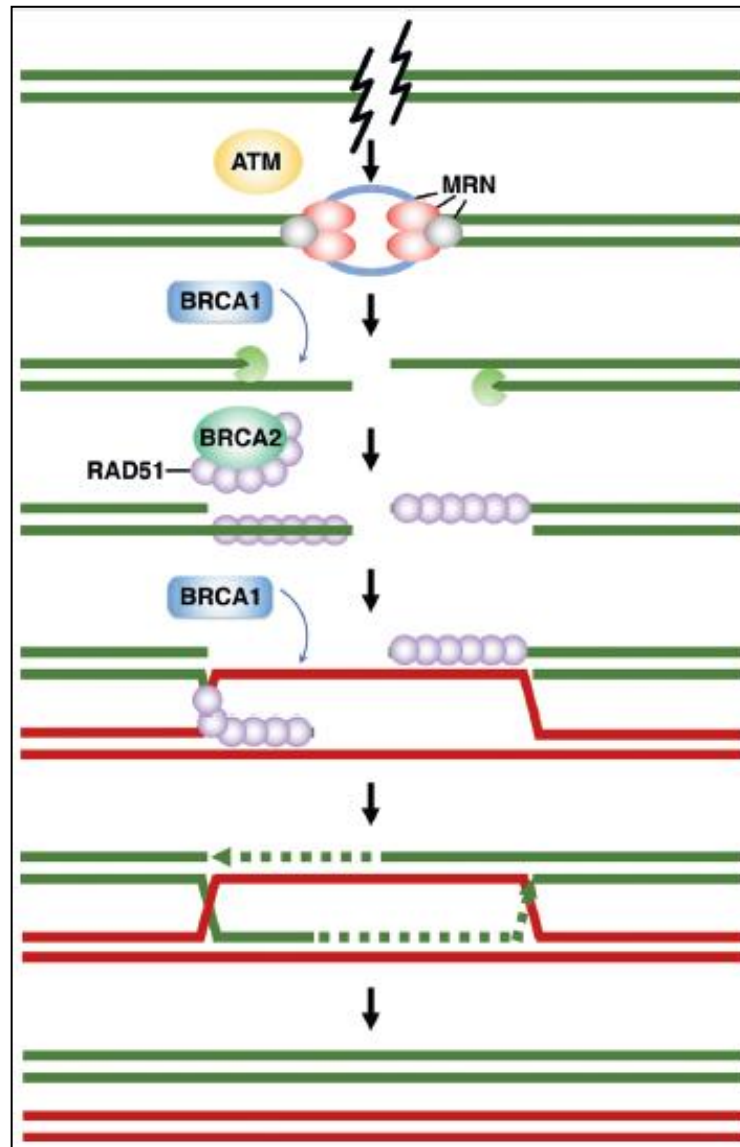
1.8. Vias de reparo aos danos de dupla fita de DNA:

Quebras à dupla fita de DNA (DSBs) são resultado de radiação e agentes químicos; além de, na maioria das vezes, de forquilhas de replicação de DNA que estejam danificadas ou com a atividade comprometida, independente de agentes externos (ALBERTS *et al.*, 2015). Tais danos são reparados através da via de reparo NHEJ ou da via HR, o que é crucial para evitar deleções ou translocações cromossômicas; estas vias de reparo são ativadas em diferentes fases do ciclo celular. NHEJ é responsável por reparar as DSBs nas fases G1/S/G2, enquanto a via HR é funcional nas fases S/G2; mas as células humanas, durante a fase G2, determinam o uso de cada via a partir de fatores como estrutura da cromatina, complexidade da extremidade do DNA e *status* transcricional; utilizando a via NHEJ para reparar cerca de 70% dos danos e os demais resíduos de 30% pela via HR (SHIBATA, 2017). A via de recombinação homóloga se restringe às fases do ciclo celular posteriores à replicação do DNA, por utilizar a cromátide irmã intacta como fita molde para a reversão do dano, o que resulta em uma integridade da informação genética e assim, corresponde a menor taxa de erro no reparo de DSBs. Mecanismo distinto da via NHEJ, na qual ocorre a ligação direta entre as extremidades danificadas; o que pode ocasionar a perda ou o ganho de nucleotídeos e gerar translocações (ALBERTS *et al.*, 2015; SYMINGTON, 2016).

O reparo ao dano de DNA segue uma série de mecanismos, com vias que interagem entre si e o recrutamento de proteínas que podem ser agrupadas em três classes funcionais, responsáveis por ordenar as etapas que traduzem os sinais desde a lesão genética até a reversão. Inicia-se pelas proteínas que reconhecem o dano e ativam uma sinalização de resposta ao dano, em seguida há os fatores que amplificam o sinal até os efetores que agem nas vias subsequentes (BEKKER; MAILAND, 2010). Em eucariotos, na região restrita ao local do dano, forma-se uma forquilha de reparo denominada IRIF, onde há a concentração das proteínas recrutadas para o reparo de DSBs através dos diversos mecanismos intrínsecos; tal forquilha funciona como uma plataforma de afinidade com as proteínas participantes da dinâmica de reparo (DALEY, SUNG, 2014). Um evento principal para a formação da IRIF é a modificação na conformação da cromatina, que acontece a partir do recrutamento da proteína ATM, responsável pela fosforilação da variante de histona H2AX, a qual recruta o mediador de checkpoint de dano ao DNA (MDC1); que, por sua vez, recruta mais ATM para a amplificação do sinal de quebra de dupla-fita (DENSHAM; MORRIS, 2019). A proteína ATM atua em conjunto ao complexo MRN no processo de identificação das extremidades livres de DNA, que é crucial para o início do reparo por HR (NIELSEN *et al.*, 2016). O complexo MRN age nas etapas iniciais de ressecção, ou seja, na transformação de cada

extremidade de dupla-fita de DNA (dsDNA) em fita simples de DNA (ssDNA). Cada lado das extremidades ssDNA é ligado, em seguida, à proteínas RPA a fim de evitar a formação de estruturas secundárias. No entanto, tal interação proteica configura-se como uma barreira cinética à proteína RAD51, o que resulta na substituição de RPA por RAD51 (DALEY; SUNG, 2014; HEYER, 2010). A formação do conjunto ssDNA-RAD51 resulta em nucleofilamentos que deslocam a extremidade 3' do DNA para formar uma sinapse com a sequência homóloga da cromátide-irmã. Tal ligação cria uma estrutura D-loop contendo um DNA heteroduplex, que servirá como molde para a síntese por polimerases da nova fita (DENSHAM, MORRIS, 2019; PRAKASH *et al.*, 2015). A figura 1.2 ilustra as principais etapas do reparo por recombinação homóloga da quebra de dupla dita do DNA.

Figura 1.2: Etapas da via de reparo por recombinação homóloga (HR) aos danos de dupla fita do DNA.



Fonte da imagem: BYRUM *et al.* 2019

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* desempenham importantes funções na via HR, participando de múltiplas etapas desta via em pró da integridade genômica, da manutenção de forquilhas de replicação e da supressão tumoral (JIANG; GREENBER, 2015; LI; GREENBERG, 2012). O gene *BRCA1* assemelha-se ao papel de coordenador e mediador de várias respostas a DSBs, pois interage com cerca de treze diferentes proteínas que estão envolvidas com reparo ao DNA; enquanto que *BRCA2* tem características de um efetor dentro de HR (LI; GREENBERG, 2012) (Figura 1.3). O gene *TP53* não está intrinsecamente ligado ao reparo de danos ao DNA, no entanto, atua como fator de transcrição em diversas vias metabólicas. *TP53* representa um componente-chave para resposta celular ao stress causado por danos genotóxicos, ativação oncogênica, perda de contato entre células ou diminuição nutritiva ou hipóxia (HORN; VOUSDEN, 2007). Por estar relacionado às atividades mitocondriais, *TP53* pode estimular a produção de agentes antioxidantes a fim de abaixar níveis de espécies reativas de oxigênio ou também induzir a parada no ciclo celular com o intuito de propiciar processos de reparo ao DNA. Tal gene possui um papel central para a homeostase celular, já que regula funções metabólicas como a apoptose, a senescência celular e o ciclo celular; podendo, assim agir em contrapartida às alterações que estimulam o desenvolvimento tumoral (BERKERS *et al.*, 2011).

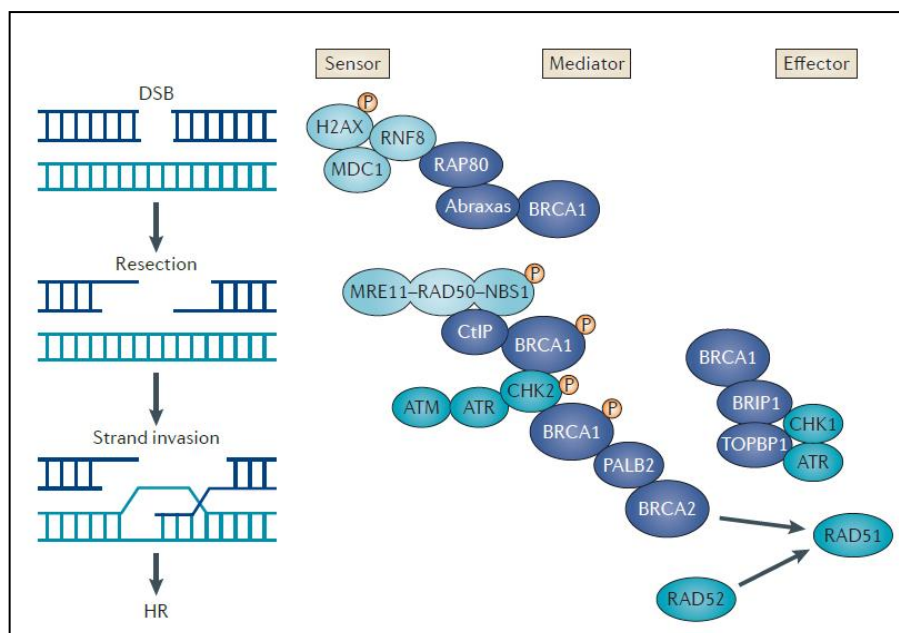
BRCA1 codifica uma proteína de 1863 aminoácidos com o domínio RING *finger* na região N-terminal, na região central localiza-se o éxon 11 correspondente a 60% da estrutura proteica, seguido do domínio *coiled coil* e, na região C-terminal, de repetições *in tandem* denominadas BRCTs (PRAKASH *et al.*, 2015). O domínio RING forma um heterodímero com *BARD1*, permitindo a estabilidade *in vivo* de *BRCA1*; em continuidade com a atividade da E3 ubiquitina ligase necessária para a ubiquitinação de H2AX e o posterior recrutamento de *53BP1* (LI; GREENBERG, 2012; NEPOMUCENO, 2016). A região do éxon 11 apresenta sítios de ligação ao fator de transcrição cMyc, às proteínas RAD50, RAD51 e à proteína Rb; assim como apresenta porções de serina que são fosforiladas por *ATM* em casos de dano ao DNA (CLARK *et al.*, 2012). O domínio *coiled coil* interage com a proteína PALB2 que funciona como mediadora do direcionamento de *BRCA2* às cromatinas e DSBs; a interação *BRCA1-BRCA2-PALB2* auxilia na dinâmica de *RAD51* após a ressecção 5'-3' das dsDNA em ssDNA. As regiões repetitivas BRCT reconhecem resíduos fosforilados das proteínas de ligação Abraxas, além de interagirem com *BACH1/BRIP1* e CtIP na porção C-terminal helicase 1 com a finalidade de localização de *BRCA1* às DSBs (LI; GREENBERG, 2012; PRAKASH *et al.*, 2015).

O gene *BRCA2* em mamíferos codifica uma proteína com 3418 aminoácidos, contendo múltiplos domínios que compreendem oito regiões repetitivas BRC entre as posições 1003 a

2083, seguido do domínio BRCA2-Helicoidal e de três domínios de ligação ao DNA (DBDs) divididos em OB1, OB2 e OB3 dentro da região C-terminal da proteína (YANG *et al.*, 2002). A região N-terminal de *BRCA2* interage com o domínio WD40 da proteína PALB2, a fim de formar o complexo BRCA1-BRCA2-PALB2 tão importante para a colocalização destas proteínas nos focos nucleares onde existem DSBs (PRAKASH *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2009). Todas as regiões BRC possuem afinidade de ligação com *RAD51*, regulando a formação dos filamentos desta proteína nas estruturas ssDNAs (PRAKASH *et al.*, 2015 ;YANG *et al.*, 2002). Os domínios OBs de *BRCA2* interagem com DSS1, uma proteína conservada, cujas funções permanecem em investigação, no entanto sabe-se que é necessária para a manutenção de HR e sugere-se que BRCA2-DSS1 coopera na substituição de RPA por RAD51 em ssDNA (LI *et al.*, 2006).

O gene *TP53* está localizado no braço curto do cromossomo 17, composto por 11 éxons, sendo o primeiro não codificante. A proteína p53 consiste em 393 aminoácidos e quatro domínios funcionais; sendo um domínio de ativação transcricional na região N-terminal, uma parte central de p53 que é sequência específica para ligação ao DNA, um domínio regulatório e uma porção C-terminal que contém um domínio para oligomerização (MAY; MAY, 1999).

Figura 1.3: Interações proteicas de BRCA1 e BRCA2 no processo de reparo por recombinação homóloga à quebra de dupla fita do DNA.



Fonte da imagem: ROY *et al.*, 2012

1.9 Tratamento clínico para o câncer de ovário epitelial:

Os tumores de ovário epiteliais, geralmente 75% dos casos, são diagnosticados nos estágios avançados III a IV, dentro da classificação International Federation of Gynecology (FIGO). A detecção tardia em situações invasivas da cavidade peritoneal e abdominal reflete em um pior prognóstico e em sobrevida livre de doença (entre 2 a 5 anos) abaixo de 30% (DION *et al.*, 2020). A identificação do *status* mutacional do gene *BRCA*, ou seja, se o paciente apresenta mutação germinativa ou somática, é de suma importância para a decisão clínica do tratamento; pois tumores com alterações em tal gene apresentam características histopatológicas e moleculares distintas dos demais tipos epiteliais de tumores de ovário (PAN *et al.*, 2017).

Indivíduos com variantes patogênicas germinativas em *BRCA1/BRCA2* tendem a um melhor prognóstico e a maiores taxas de sobrevida em comparação aos pacientes não portadores de variantes germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2* (ALSOP *et al.*, 2012; BOLTON *et al.*, 2012). O contexto de melhor prognóstico para mutações germinativas em *BRCA1/BRCA2* é consequência de um maior grau histológico da doença em comparação aos casos somáticos e de bons resultados ao tratamento à base de platina. Os efeitos deletérios nos genes *BRCA1/BRCA2* impedem o reparo dos danos às fitas de DNA causados pela platina e induzem a apoptose celular (MYLAVARAPU *et al.*, 2018). No entanto, os dados sobre sobrevida de mulheres com câncer de ovário com e sem mutação germinativa em *BRCA1/2* têm resultados conflitantes; pois, enquanto alguns não demonstram diferença de prognóstico entre pacientes com a mutação e sem a mutação (BRUNET *et al.* 1997; BULLER *et al.*, 2002; RUBIN *et al.*, 1996), outros indicam maior sobrevida em pacientes com mutação patogênica (BYRD *et al.*, 2008; CANNISTRA, 1997; KIM *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2011). Além disso, há relatos de maior sobrevida das mulheres com câncer de ovário e portadoras de mutação em *BRCA2* quando comparadas a portadoras de mutação em *BRCA1* (PAL *et al.* 2007; PENNINGTON *et al.* 2014). Ainda permanece em investigação se as mutações restritas ao nível somático conferem aos pacientes melhores respostas terapêuticas a base de platinas e melhor prognóstico (KOCZKOWSKA *et al.* 2016.; TOSS *et al.* 2013).

O tratamento convencional para o tipo epitelial seroso de alto grau consiste na intervenção cirúrgica, através do procedimento de salpingo-oophorectomia bilateral para a remoção ou citorredução da massa tumoral. Em associação ao procedimento cirúrgico, aplica-se como tratamento adjuvante a radioterapia ou a quimioterapia a base de platina; visto que, existe uma sensibilidade ao uso de agentes quimioterápicos como a cisplatina e a carboplatina (CHANDRA *et al.*, 2019; JAYSON *et al.*, 2014; GADDUCCI *et al.*, 2019; VENCKEN *et al.*,

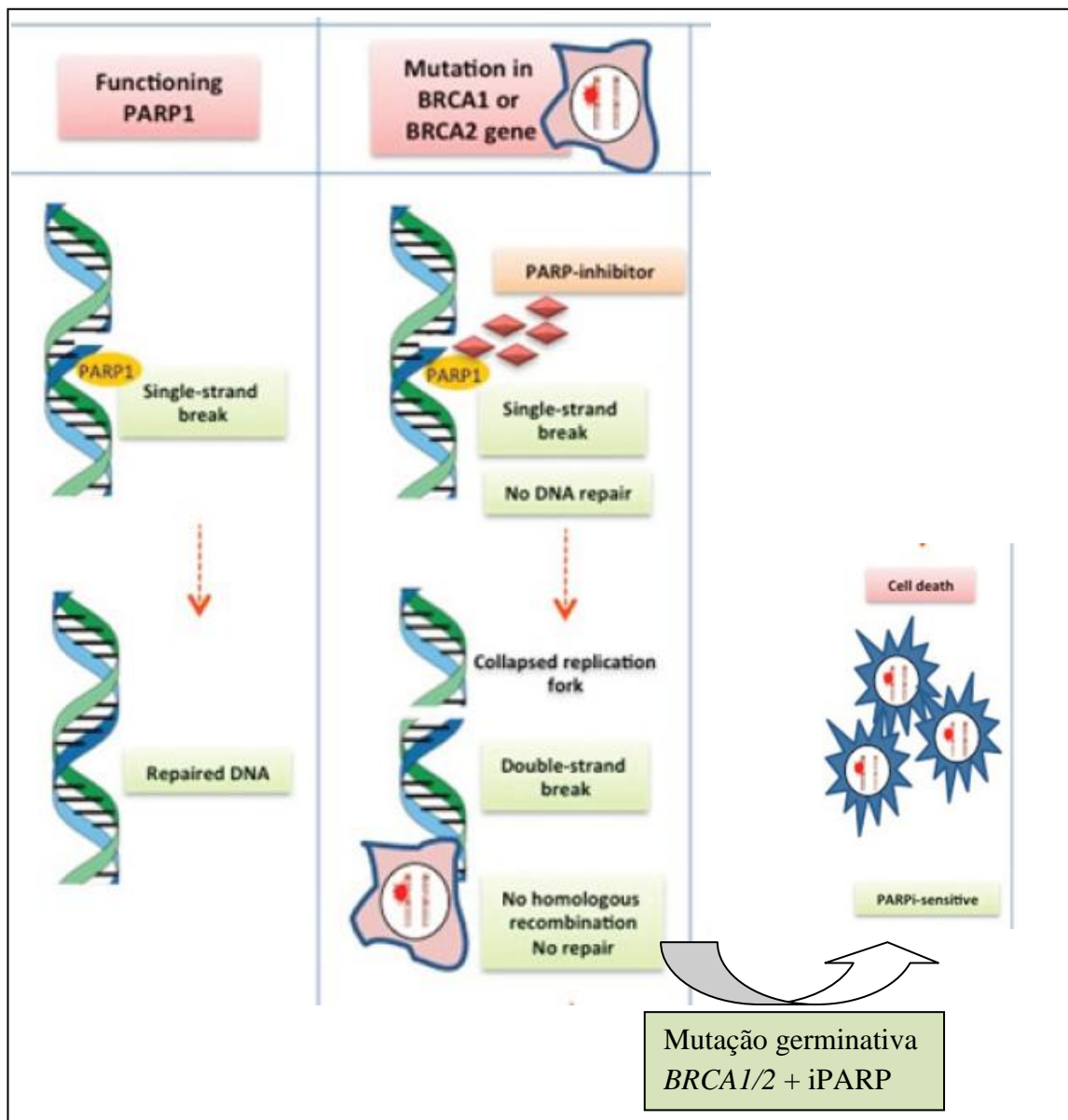
2011). A resposta inicial ao tratamento é positiva em aproximadamente 80% dos casos, no entanto ao menos 70% das pacientes apresentarão recorrência da doença em ao menos dois anos do tratamento completo e com uma estimativa de sobrevida livre de doença de 18 meses (DION *et al.*, 2020). Há pacientes sensíveis à platina e outras resistentes ao mesmo quimioterápico, em que se considera resistente à platina os casos recorrentes em menos de seis meses e os sensíveis com recorrência após seis ou doze meses de tratamento (DION *et al.*, 2020; NAUMANN; COLLEMAN, 2011). A recorrência da doença configura um ruim prognóstico, por submeter o paciente a uma série de ciclos quimioterápicos, os quais facilitam a ocorrência de clones tumorais resistentes aos fármacos (PAPA *et al.*, 2016) .

Casos de resistência à platina e de recidiva da doença levaram a utilização de novas drogas, como os inibidores de PARP (iPARP) para promover uma seletiva citotoxicidade apenas às células tumorais (FONG *et al.*, 2009; JIANG *et al.*, 2019). A poli-ADP ribose polimerase (PARP) atua em diversas vias de reparo ao DNA, no entanto a função mais elucidada refere-se à via por excisão de bases (BER), em que auxilia na formação de complexos de reparo ao DNA e facilita o recrutamento de promotores do reparo de ssDNA (KONECNY; KRISTELEIT, 2016). A aplicação de inibidores PARP como terapia alvo em pacientes com mutações germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2* explora o conceito de letalidade sintética; uma vez que apenas a inibição de PARP não configura grande impacto celular; mas em combinação com a deficiência na via HR causada pelas mutações em *BRCA1/BRCA2*; induzem um efeito conjunto que resulta na morte celular (FARMER *et al.*, 2005) (Figura 1.4). Atinge-se a letalidade sintética pela ação dos inibidores PARP, que impedem o reparo de ssDNA por meio da via de reparo BER, o que resulta no acúmulo de danos e a consequentes quebras dsDNA. Tais tipos de dano ao DNA são reparados pela via HR, que envolve os genes *BRCA1* e *BRCA2*, no entanto mutações deletérias nestes genes impossibilitam a reversão do dano, ocasionando a instabilidade genômica e provocando a apoptose (INCORVAIA *et al.*, 2017; LEDERMANN *et al.*, 2016; STOPPA-LYONNET, 2016).

Na prática clínica, diversos inibidores de PARP vêm sendo testados em pacientes com mutações germinativas em *BRCA1/BRCA2* na forma de monoterápicos ou como terapia de manutenção após o tratamento neoadjuvante (NEFF *et al.*, 2017). Estudos de fase II ou III, a exemplo de SOLO1 nos Estados Unidos, têm analisado o uso em potencial do inibidor de PARP, denominado Olaparibe, na terapia de manutenção para casos de recidiva com sensibilidade à platina, que apresentam mutação germinativa em *BRCA1/2* e foram submetidos a três ou mais linhas de quimioterapia (GEORGE *et al.*, 2017). Algumas análises já demonstraram melhora na sobrevida livre de doença após administração de Olaparibe em comparação ao placebo (KIM *et al.*, 2015; LEDERMANN *et al.*, 2012; 2014; MOORE *et al.*,

2018). Outro iPARP aplicado nos estudos ARIEL2 é o rucuparibe, em que seu efeito é investigado entre casos HGSOC com *BRCA* selvagem e casos com mutações germinativas ou somáticas, todos com características platina- sensível e recidiva da doença (SWISHER *et al.*, 2017). Um terceiro tipo de iPARP analisado quanto ao potencial de ação aos casos de recidiva é o niraparibe, o qual é testado no estudo NOVA também para casos de recidiva entre pacientes com e sem mutações em *BRCA1/2* (MIRZA *et al.*, 2016).

Figura 1.4: A diferença na resposta celular ao funcionamento ou à inibição de PARP. (A) Reversão do dano à fita simples de DNA. (B) Letalidade sintética pela ação de inibidor de PARP.



Fonte da imagem: Adaptado de INCORVAIA *et al.*, 2017.

2. JUSTIFICATIVA

As alterações genéticas de origem germinativa em câncer de ovário epitelial são bastante investigadas por testes genéticos e painéis gênicos relacionados a vias de reparo aos danos de DNA como a via HR. Com o uso de tais investigações, é possível o entendimento sobre a frequência de variantes germinativas em genes como *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* assim como os riscos e a susceptibilidade genética para o desenvolvimento da tumorigênese. Apesar da elucidação dos eventos germinativos, as modificações que ocorrem no tumor, denominadas como mutações somáticas, representam um desafio para a pesquisa científica.

Análises acerca de mutações somáticas são mais complexas em relação a mutações germinativas, por conta da heterogeneidade tumoral de EOC, definidas como os diferentes clones de células tumorais. Tal diversidade clonal presente no tumor dificulta a ampla compreensão das modificações genéticas intra-tumorais, visto que, a análise se limitará a um momento no tempo e espaço da evolução clonal (FREY *et al.*, 2017).

Identificar as mutações germinativas e somáticas nos genes HR é de suma importância para questões clínicas, principalmente com relação às terapias-alvo como a ação de inibidores de PARP. No que se refere aos casos somáticos, conhecer a prevalência das mutações nos genes *BRCA1/2* auxilia no esclarecimento sobre a sensibilidade à platina e aos iPARP (STOVER *et al.*, 2020). Dessa forma, a presença ou ausência de alterações somáticas em genes associados à HR indica pacientes que podem se beneficiar com o uso de iPARP no tratamento clínico. Devido a esta associação entre o perfil genético do paciente e o manejo clínico deve-se investir em análises integradas dos eventos germinativos e somáticos.

No atual cenário científico sobre câncer de ovário, há maior elucidação dos eventos genéticos que desencadeiam a carcinogênese no tipo epitelial HGSOC; em contraponto, existem insuficientes análises compreensivas sobre os demais subtipos EOC como o carcinoma de células claras, carcinoma mucinoso e carcinoma endometriode (PAPP *et al.*, 2018). Incluir nas análises genéticas os demais subtipos epiteliais de câncer de ovário é importante para desenvolver o conhecimento acerca da heterogeneidade entre os tumores, como também para a compreensão das alterações genéticas destes demais subtipos histológicos.

Outra questão a ser considerada é a falta de informações sobre variantes somáticas em casos de câncer de ovário na população brasileira para genes associados à HR, uma vez que os estudos científicos estão voltados às análises dos casos germinativos de câncer de ovário. De forma que, torna-se essencial averiguar os tipos de mutações somáticas, os impactos funcionais, a frequência de cada mutação e também a proporção de casos somáticos em

relação aos germinativos. Tais informações podem fornecer um panorama mais adequado às características somáticas das neoplasias de ovário que ocorrem na população brasileira.

3. OBJETIVO PRINCIPAL

Verificar a presença de variantes de perda de função de origem somática em *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* em amostras de tumores de ovário de origem epitelial.

3.1. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Descrever a proporção de tumores de ovário que estão associados à presença de variantes de perda de função em *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* com respeito à origem somática ou germinativa;
- Descrever as características clínico patológicas das mulheres com carcinoma de ovário de origem epitelial associados à presença de variantes de perda de função de origem germinativa e/ou somática em *BRCA1* ou *BRCA2* ou *TP53*;
- Comparar as características clínico patológicas entre mulheres diagnosticadas com carcinoma de ovário de origem epitelial, que apresentem variantes de perda de função de origem germinativa ou somática em *BRCA1* ou *BRCA2* ou *TP53* com aquelas que não possuem essas variantes.
- Avaliar a associação entre a presença de variantes de perda de função com resposta ao tratamento realizado na instituição (sobrevida livre de doença e a sobrevida global).

4. METODOLOGIA

4.1. Seleção das amostras

As amostras utilizadas foram de pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e consentiram com o uso em pesquisa científica. Se no consentimento, estas pacientes tenham solicitado o contato caso as amostras fossem utilizadas em projetos específicos de pesquisa, foram contactadas pelo Aconselhamento Genético do INCA. Aquelas cujo contato não foi possível, como nos casos de óbito, foram dispensadas do TCLE. O presente estudo obteve aprovação pelo CEP do INCA e pela CONEP (CAAE 78305417.3.0000.5274) (Anexo 01).

As amostras utilizadas no estudo foram coletadas pelo Banco Nacional de Tumores (BNT), o qual possui amostras de câncer de ovário de origem epitelial de 108 pacientes, matriculados no INCA, durante o período de 2007 a 2017. Dentre as amostras depositadas foram selecionadas apenas as que apresentaram sangue e tumor, totalizando um número inicial de 94 pareadas. Segundo a primeira classificação histológica disponibilizada pelo BNT, havia 59 casos para o subtipo HGSOC; 13 como adenocarcinoma endometriode; 12 como adenocarcinoma /cistoadenocarcinoma mucinoso; e 09 como adenocarcinoma /cistoadenocarcinoma de células claras (Anexo 02).

Houve a revisão histopatológica de todos os 94 casos selecionados a fim de determinar quais seriam as amostras incluídas e as excluídas do estudo. Os materiais utilizados para a revisão histopatológica das amostras pareadas (sangue/tumor) foram as lâminas- espelho do BNT e as lâminas de hematoxilina-eosina (HE) da Divisão de Patologia do INCA (Dipat). Nesta revisão histopatológica cada amostra foi examinada seguindo os critérios de inclusão quanto à confirmação histopatológica dos subtipos de tumor epitelial de ovário e à representatividade tumoral igual ou superior a 60%. Tal revisão resultou na inclusão de 57 casos e, por conseguinte, na exclusão de 37 casos que não se encaixaram nos critérios de inclusão (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Número de casos incluídos e excluídos para cada subtipo histológico.

Subtipo histológico	Casos revisados	Casos incluídos	Casos excluídos
HGSOC	56	34	22
A/ C mucinoso	12	08	04
Adenocarcinoma endometrióide	13	03	10
A/ C de células claras	09	08	1
A/ C seroso de baixo grau	02	02	0
Tumor misto (HGSOC e A/ C mucinoso)	01	01	0
Tumor misto (HGSOC e A/C de células claras)	01	01	0
Total	94	57	37

4.2. Isolamento do material genético

O tecido tumoral depositado no BNT advém de uma porção da peça cirúrgica da paciente, tal porção foi dividida em 3 partes: partes laterais que são destinadas à congelação do material fresco em criotubos a -80°C e a parte central que é utilizada para o preparo da lâmina espelho e do cassete de parafina. Enquanto que o sangue foi coletado e armazenado em EDTA também em criotubos a -80°C nas formas derivadas de *buffycoat*, leucócitos totais e plasma.

Na extração de DNA do tecido tumoral foi utilizado apenas um fragmento das porções do material fresco congelado, tal fragmento foi dissecado com o auxílio de um estilete em uma placa de petri para a seleção de fragmentos com 20mg a 1,2g de peso, sem a aplicação da técnica de microdissecção. O isolamento do DNA do tecido tumoral foi realizado com o uso do *QIAamp® DNA Mini Kit*, seguindo as instruções do fabricante, para volumes finais de 200 μl de eluição.

Para a extração de sangue foram utilizadas as formas derivadas de *buffycoat* e leucócitos totais, respeitando o tipo de material armazenado para cada paciente. O isolamento genético foi executado de maneira distinta para cada derivado, contudo houve duas alíquotas cada qual com 50 μl de eluição do material extraído. O *Buffycoat* foi isolado a partir de um volume inicial de 200 μl para cada alíquota com o uso do *QIAamp® DNA Mini Kit*, seguindo as instruções do fabricante. Para a extração dos leucócitos totais (cerca de 5 milhões de células), houve a separação do *pellet* para cada duplicata e o uso do *kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System*, seguindo as instruções do fabricante Promega.

Todo o material extraído, tanto o tumor quanto o sangue, foi quantificado no espectrofotômetro *Nanodrop*TM 2000 para mensurar a quantidade de DNA (ng/ µl) e verificar o grau de pureza a partir das razões 260/280 e 230/280. Com a etapa de extração concluída, seguiu-se para a amplificação das regiões alvo do material genético isolado. Além da quantificação, houve a aferição da integridade do DNA extraído a partir da eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

4.3. Amplificação das regiões alvo

As regiões alvo amplificadas do material extraído de tumor e de sangue corresponderam a todas as regiões codificantes dos genes de interesse *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*. As sequências nucleotídicas de cada gene foram obtidas pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em reações de PCR convencional, PCR *multiplex* e PCR de longo alcance (LR-PCR). Os *primers* para os genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* amplificam todos éxons e pelo menos 10 a 20pb flanqueando cada éxon; tendo como base o genoma de referência GRCh37/hg19, disponível no banco de dados do *NCBI*. *Primers* para o gene *BRCA1* foram obtidos a partir de dados da *Breast Cancer Information Core* (<https://research.nhgri.nih.gov/bic/>), mas sendo originalmente descritos no artigo Miki et al. (1994); enquanto *primers* para amplificação de longos fragmentos (Long Range PCR) foram obtidos de Herman et al. (2012). Para os genes *BRCA2* e *TP53* os *primers* foram obtidos, respectivamente, a partir de dados do *TP53 Database* (<https://p53.iarc.fr/>) e *Breast Cancer Information Core*.

Para o gene *BRCA1*, a amplificação de todos os 24 éxons e parte das regiões intrônicas (ao menos 10pb) adjacentes a cada éxon ocorreu em um conjunto de seis reações de PCR *multiplex* denominados Ma a Mf, além de três reações de PCR convencional e um conjunto de PCR de Longo Alcance (LR-PCR). Para o gene *BRCA2*, a amplificação de todos os 27 éxons e parte das regiões intrônicas adjacentes a cada éxon (ao menos 10pb), aconteceu em um conjunto de cinco reações de PCR *multiplex* denominados M1 a M5 e duas reações de PCR convencional, que compõe o conjunto M6. Para o gene *TP53*, a amplificação de todos os 11 éxons ocorreu por meio de 03 reações de PCR convencional para éxons combinados. As reações de PCR *multiplex* otimizaram as amplificações, pois cada reação utilizou um conjunto de *primers* capaz de amplificar de dois a sete éxons e regiões adjacentes em uma única reação. Os conjuntos de *primers* e as condições das PCRs foram testados e padronizados pela equipe de Aconselhamento Genético do Programa de Genética do INCA – RJ. A enzima utilizada para as PCRs *multiplex* foi a *Platinum*TM *Taq DNA Polymerase* da empresa Thermo-Fisher Corporation, enquanto para as reações de PCR convencional e LR-PCR foi utilizada a

enzima *GoTaq® G2 Hot Start DNA polymerase* da empresa Promega. O controle positivo usado para cada reação de PCR foi DNA da linhagem celular de câncer de mama (MCF7).

Após cada amplificação realizada, ocorreu a confirmação do tamanho dos amplicons através da eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Todos os produtos amplificados foram purificados com o kit *PureLink™ PCR Purification* (Invitrogen™, Thermo-Fisher Corporation) para, em seguida, serem submetidos à etapa de preparo das bibliotecas. Informações detalhadas sobre os *primers* utilizados, composições dos *primers* e os conjuntos de PCR *multiplex* da metodologia de PCR estão descritas nos anexos (Anexo 04 e 05).

4.4. Preparo das bibliotecas e Sequenciamento de Nova Geração:

Antes do preparo das bibliotecas de tumor e sangue, cada purificado correspondente aos amplicons dos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* foi quantificado no espectrofotômetro *Nanodrop™ 2000*. Após a quantificação, houve o cálculo da normalização para os amplicons de cada gene, necessário para a representação equimolar de cada amplicon. Em tal normalização foi determinado o volume pipetado de cada amplicon de cada gene para a junção em uma única mistura com os amplicons dos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* correspondentes a cada amostra (Figura 4.1). O mesmo procedimento foi realizado tanto nas amostras de tumor como de sangue.

Em seguida, as misturas de amplicons de sangue e de tumor foram quantificados no equipamento *Qubit® 3.0 Fluorometer* (Life Technologies) com o uso do *Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kits*, conforme as indicações do fabricante, para posterior diluição do mix a 0,2 ng/μl. Utilizou-se 2,5μl de DNA das amostras diluídas para o preparo das bibliotecas tanto de tumor quanto de sangue, usando para este fim o kit *Nextera XT DNA Library* (Illumina, San Diego, Estados Unidos), seguindo a série de etapas: tagmentação dos produtos de PCR, amplificação das bibliotecas e purificação com uso de *beads* magnéticas. No preparo da biblioteca é incorporado um par de *index* a cada amostra, de modo que houve diferentes combinações de que possibilitaram a identificação de cada uma das amostras ao fim do sequenciamento.

As bibliotecas foram quantificadas no equipamento *Qubit® 3.0 Fluorometer* (Life Technologies), seguindo o mesmo procedimento já descrito, tal quantificação foi necessária para calcular a molaridade de cada biblioteca. Além da quantificação, houve a eletroforese em gel de agarose a 1% para a visualização do tamanho das bibliotecas, em que para as amostras de tumor obteve-se uma mediana de 300pb e para as amostras de sangue houve uma mediana

de 250pb. A quantificação e o tamanho das bibliotecas foram informações inseridas no cálculo da molaridade, necessária para definir o volume usado de cada biblioteca na mistura equimolar do *mix* final de tumor e no *mix* final de sangue. Tanto o *mix* final de tumor quanto o de sangue foram quantificados no equipamento *Qubit® 3.0 Fluorometer* (Life Technologies), a fim de calcular a molaridade destes *mixes*. Foi feita a diluição do *mix* de sangue e tumor, para a concentração final de 13,6 nM. Por fim, foi feita a junção final de todos os *mixes* de modo que as bibliotecas de tumor e sangue estavam na proporção de 3:1, respectivamente, visando aumentar a cobertura das amostras de tumor no sequenciamento em larga escala. Essa junção final das bibliotecas de tumor e sangue foi diluída de 13,6 nM para 4 nM em um volume de 30 µl, na qual foi adicionado 1 µl de PhiX Control da Illumina a 1 nM. Para a etapa de sequenciamento foram utilizados 5 µl da alíquota de 30 µl a 4 nM. A figura 4.2 resume todas as etapas de preparo para o sequenciamento por larga escala (NGS).

O sequenciamento de Nova Geração (NGS) ocorreu na plataforma MiSeq (Illumina, San Diego, Estados Unidos), com o uso do *MiSeq® v2 Reagent Kit* de 300 ciclos e aplicando a metodologia de *paired-end* com leituras 150 X 150 nucleotídeos. No equipamento MiSeq ocorreram as etapas de clusterização na *flow cell* para a amplificação em pontes dos fragmentos alvo; seguido do sequenciamento por síntese (<https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/beginners.html>).

Figura 4.1: Junção dos Produtos de PCR dos genes BRCA1, BRCA2 e TP53 para cada amostra de tumor e de sangue.

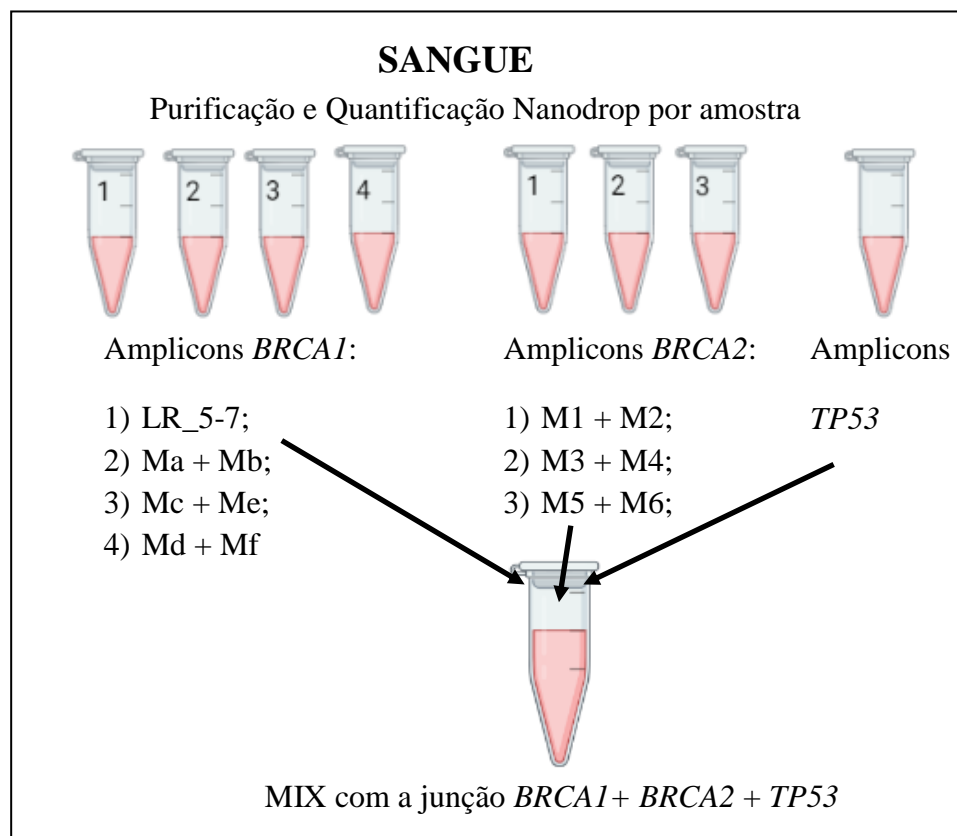
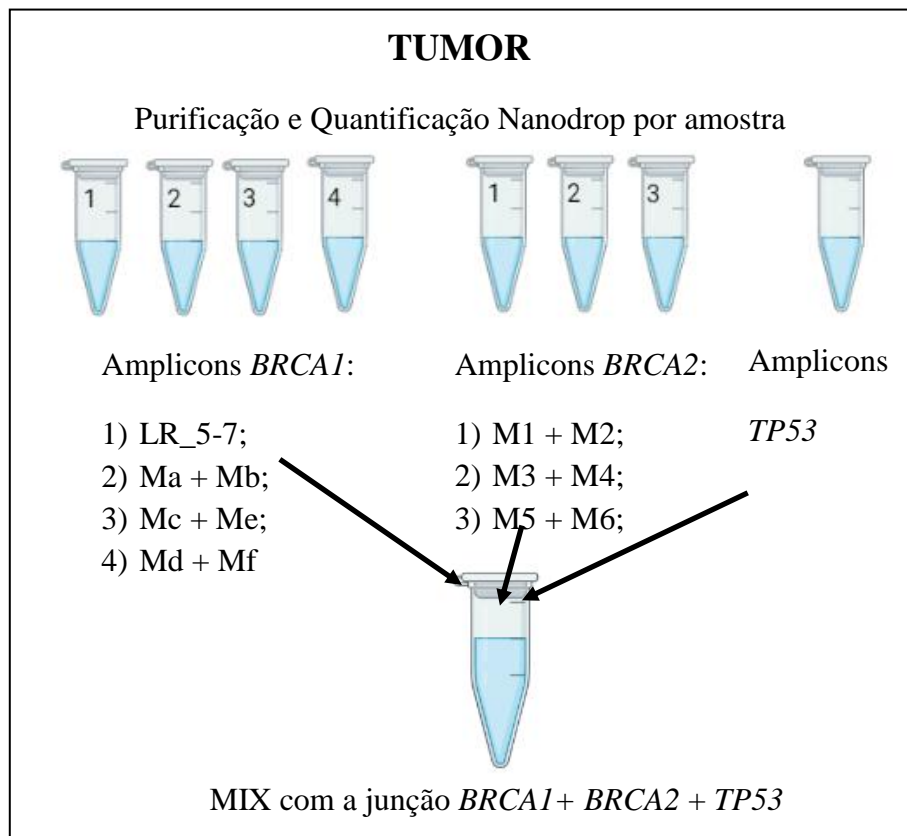
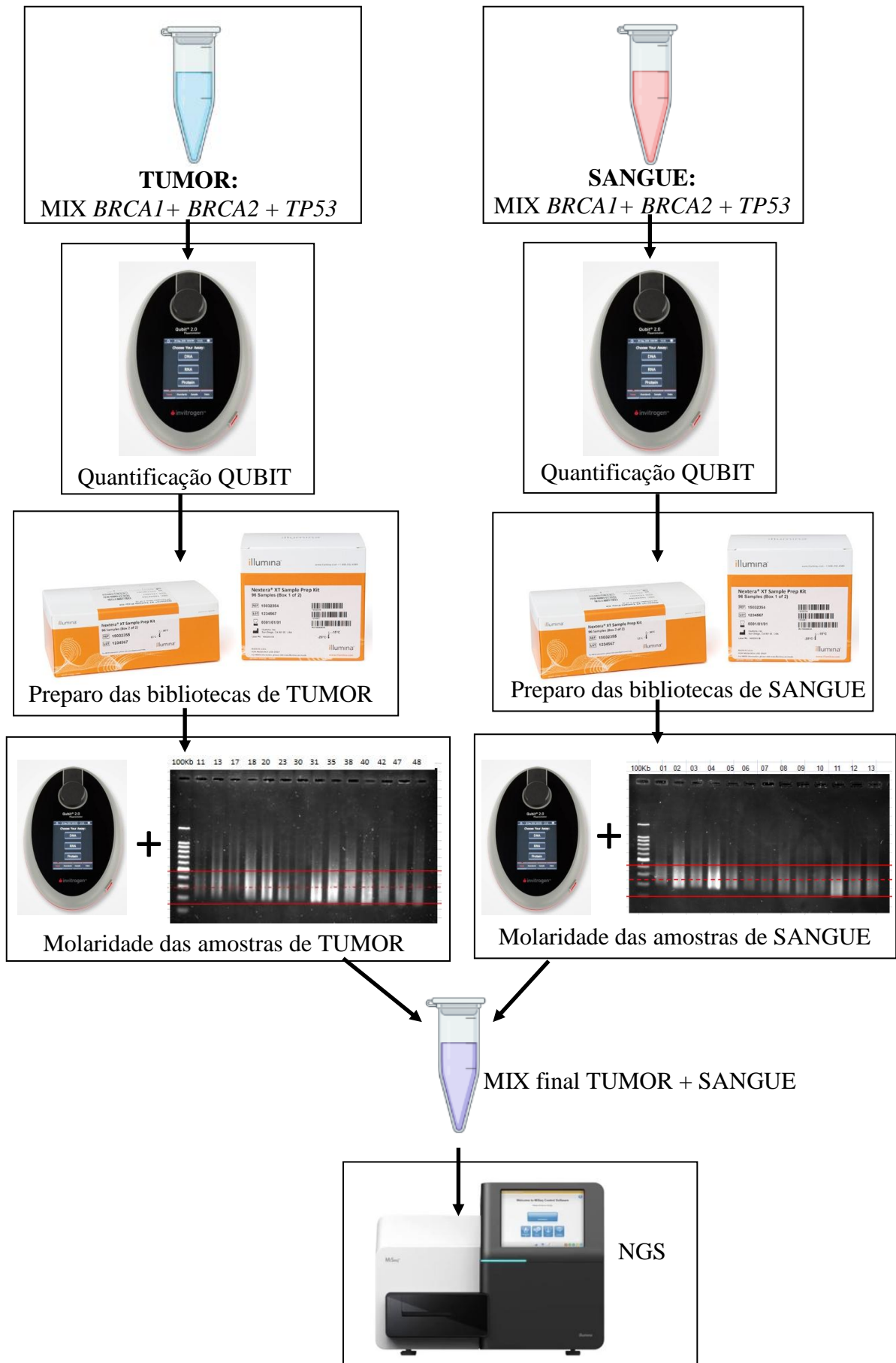


Figura 4.2: Preparo das amostras para o sequenciamento por larga escala.



4.5. Análise dos dados obtidos por bioinformática:

Os dados gerados pelo NGS foram convertidos do formato BCL para o formato FASTQ pelo programa CASAVA (Illumina). A análise dos dados ocorreu de acordo com a sequência de pré-processamento dos dados; cálculo de cobertura; chamada e anotação das variantes. Cada etapa de análise foi estabelecida em *scripts*, desenvolvidos e adaptados pelo Laboratório de Bioinformática e Biologia Computacional do INCA. Inicialmente, houve o pré-processamento dos dados para o mapeamento das leituras (*reads*) e a verificação da qualidade das leituras. As *reads* foram mapeadas, por meio do programa BWA, de acordo com a sequência de referência na versão GRCh38/hg38 UCSC dos genes *BRCA1* (NC_000017.11); *BRCA2* (NC_000013.11) e *TP53* (NC_000017.11). A qualidade de leituras (*reads*) foi avaliada por meio do *software Prinseq*, de maneira que amostras com *score* $Q < 30$ foram excluídas da análise. A recalibração das bases foi realizada com o auxílio do Genome Analysis Toolkit (GATK).

Após o pré-processamento dos dados, verificou-se a cobertura por amplicon e por base para todas as regiões alvo sequenciadas. Nesta etapa foram utilizados o genoma de referência GRCh38/hg38 UCSC e a tabela BED com as coordenadas dos *primers* e dos amplicons para análise nos programas *bedtools* e GATK_JAR.

A terceira etapa da análise de dados consistiu na chamada de variantes germinativas e somáticas para os genes *BRCA1*; *BRCA2* e *TP53*. Nesta chamada de variantes foram extraídas as variantes de ponto e pequenas inserções e deleções, localizadas tanto nas amostras de sangue quanto nas amostras de tumor. O processo em questão foi dividido em duas subetapas: (1) chamada de variantes germinativas com o uso das amostras de sangue; (2) chamada de variantes somáticas com o uso das amostras pareadas (tumor e sangue). Cada subetapa aplicou um *script* específico ao tipo de chamada de variante, sendo estes *scripts* adaptados ao painel gênico customizado para os amplicons dos genes *BRCA1*; *BRCA2* e *TP53*.

A chamada de variantes germinativas utilizou o método *HaplotypeCaller*, disponível no *site* de ferramenta de bioinformática GATK4 (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>). Os parâmetros *hard-filtering* foram aplicados na análise para verificar a qualidade da variante, ou seja, confirmar se a variante encontrada era real e não falso positivo; além de eliminar artefatos de sequenciamento. Foram aplicados os seis parâmetros disponíveis no método *HaplotypeCaller*, eram estes: *QualByDepth* (QD) que objetivou normalizar a qualidade entre as variantes, analisando a cobertura obtida para cada posição; *FisherStrand* (FS) o qual verificou de forma probabilística o *strand bias* da análise, o que significa analisar se a leitura do alelo alternativo, quando comparado com o alelo referência, é mais frequente na fita

forward ou *reverse* do DNA; *StrandOddsRatio* (SOR) que foi um parâmetro também para a análise de *strand bias*, contudo eliminou os sítios de variantes encontradas no final dos éxons, por conta de nessas posições ser comum ocorrer a leitura em apenas uma direção da fita de DNA; *RMSMappingQuality* (MQ) que forneceu uma estimativa da qualidade de mapeamento especificamente para uma posição; *MappingQualityRankSumTest* (MQRankSum) comparou a qualidade de mapeamento das *reads* que suportavam o alelo alternativo com as que suportavam o alelo referência; *ReadPosRankSumTest* que verificou se as posições dos alelos alternativos e dos alelos referência eram diferentes entre as *reads* (<https://software.broadinstitute.org/gatk/documentation/article?id=11069>).

A ferramenta GATK4 também disponibiliza o *pipeline* correspondente ao método *Mutect2*, o qual foi desenvolvido para a chamada de variantes somáticas (<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us/articles/4405443657499-Mutect2>). *Mutect2* verificou, a partir das amostras pareadas, as variantes verdadeiramente somáticas por ter eliminado eventos germinativos, artefatos e contaminação do tumor por tecido normal. Para executar a análise, o método *Mutect2* operou em algumas etapas como: (1) remoção de dados de sequências com baixa qualidade; (2) filtragem para eliminar falsos positivos resultantes de erros de sequenciamento; (3) detecção e designação de variantes como somáticas ou germinativas em amostras de tumor a partir da classificação Bayesiana (CIBULKIS *et al.*, 2013). A alta sensibilidade assim como a especificidade do método *Mutect2* permitiu a identificação de baixas frequências alélicas, em alguns casos frequências dos alelos alternativos inferiores a 10%. Esta sensibilidade é uma característica que torna tal programa útil para estudos de subclones tumorais (CIBULKIS *et al.*, 2013).

Para a segunda subetapa da chamada de variantes somáticas foram utilizadas as amostras de sangue e tumor e foi aplicado o método *Mutect2*, também disponível no *site* de ferramenta de bioinformática GATK4. Há parâmetros convencionais denominados *FilterMutectCalls* que descrevem sobre os *hardfilters* recomendados para a análise de variantes somáticas (BENJAMIN *et al.*, 2019; 2021). Desse modo, tais filtros foram utilizados para a chamada de variantes somáticas, pois investigam sobre a qualidade de leitura em cada base, sobre a cobertura de alelos alternativos, entre outras questões necessárias à análise bem sucedida.

A chamada e filtragem de variantes germinativas pelo método *HaplotypeCaller* e das variantes somáticas pelo método *Mutect2* resultou em dois arquivos *Variant Call Format* (VCFs) por paciente com as variantes que foram aprovadas pelos filtros aplicados em cada análise. Os arquivos gerados concederam informações acerca de cada variante detectada para cada paciente; no caso dos VCFs resultantes da análise germinativa sobre variantes

encontradas nas amostras de sangue e nos VCFs resultantes da análise somática sobre variantes encontradas nas amostras de tumor. O arquivo VCF dispõe sobre os seguintes dados: (1) o cromossomo em que a variante se localiza (CROM); (2) a posição da variante na sequência de referência (POS); (3) a identificação dbSNP da variante (ID); (4) a base ou as bases nitrogenadas de referência (REF); (5) a base ou as bases nitrogenadas alteradas na variante; (6) *score* da qualidade na chamada da variante (QUAL); (7) resultado do processo de filtragem da variante (FILTER); (8) informações adicionais (INFO) (SAMTOOLS, 2015).

Após a conclusão da chamada de variantes e a criação dos arquivos VCFs, houve o refinamento destes dados por um *script* de análise de variantes desenvolvido na plataforma *RStudio* (versão 4.0.5). Tal análise garantiu a remoção de e também de variantes germinativas com profundidade de leitura da posição da variante que fossem inferiores a 30 *reads* (DP<30x), com a frequência do alelo alternativo <0,2 (para SNVs) ou <0,25 (para INDELS). Enquanto que para as variantes somáticas houve a remoção de variantes com DP<50x e com contagem mínima do alelo alternativo inferior a 10 vezes (minALTcount <10x), além das variantes somáticas intrônicas que não estivessem presentes em sítios canônicos de *splicing* (posição $\pm 1,2$ pb).

Juntamente ao refinamento dos dados, aconteceu a anotação destas variantes, a qual examinou informações disponíveis no banco de dados *Ensembl* (<https://www.ensembl.org/index.html>) sobre cada variante. Tal processo teve como objetivo determinar o efeito das variantes e para isso criou dois arquivos VEP, um destinado às variantes germinativas e o outro destinado às variantes somáticas. As informações foram referentes ao gene e ao transcrito, à coordenada genômica, à consequência e ao impacto da variante, ao HGVS_c, ao HGVS_p, à posição no cDNA, à classificação no banco de dados ClinVar, à banco de dados populacionais como gnomAD e à publicações no Pubmed. A figura 4.3 apresenta as principais etapas para as análises das variantes germinativas e somáticas.

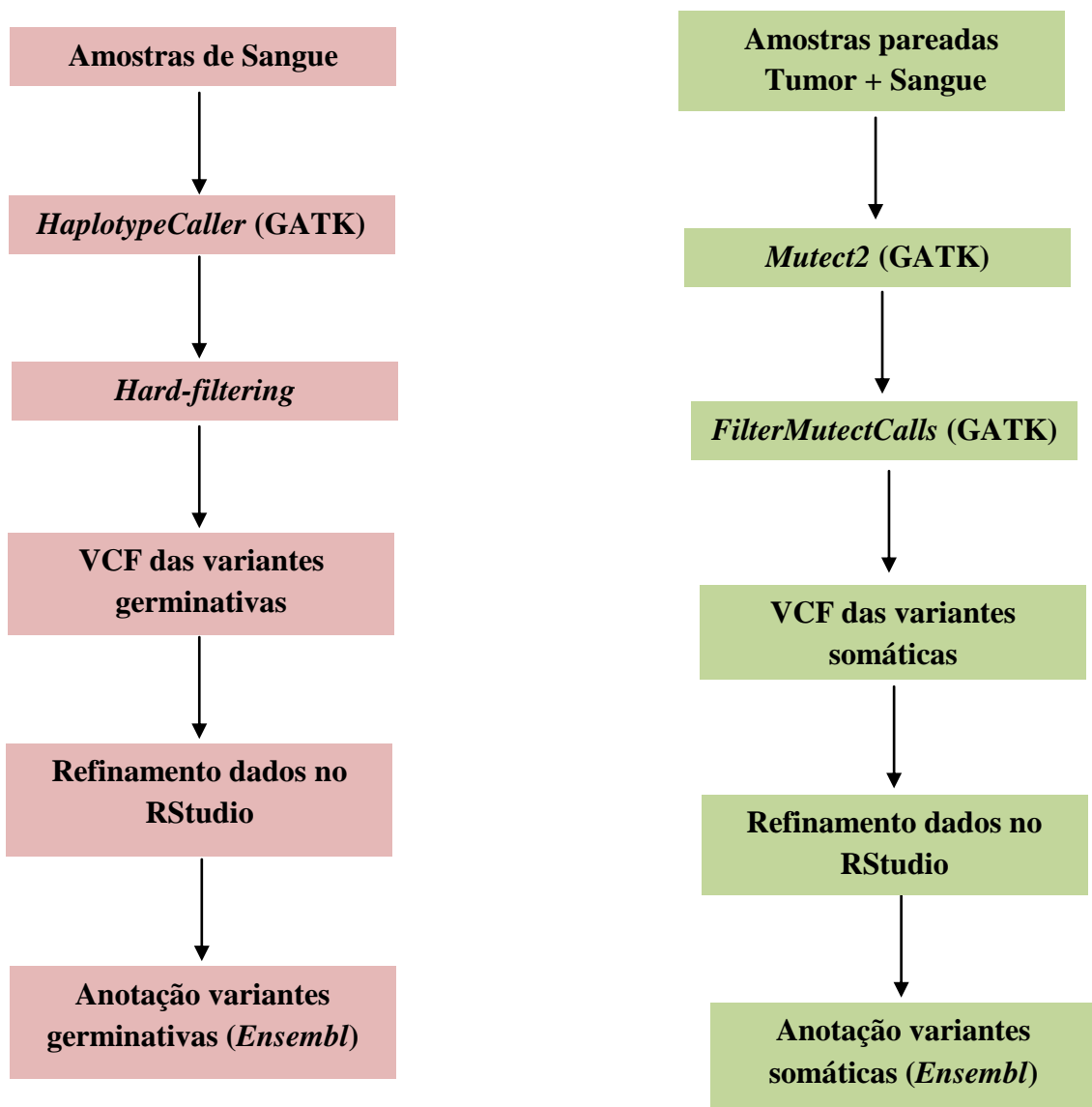
4.6. Classificação e Nomenclatura das variantes:

As variantes anotadas foram classificadas, de acordo com as recomendações do *ClinVar* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) e da *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG), nas categorias: (1) patogênica, (2) provavelmente patogênica, (3) significado clínico incerto, (4) provavelmente benigna, (5) benigna. As variantes não descritas no banco de dados dbSNP do NCBI seguiram as recomendações da *Human Genome Variation Society* (HGVS) (<https://www.hgvs.org/>), tendo como base as sequências

referências NM_007294.4 para o gene *BRCA1*; NM_000059.4 para o gene *BRCA2*; NM_000546.6 para o gene *TP53*.

Houve a consulta ao banco de dados *ClinVar* para verificar informações já disponíveis sobre as variantes germinativas e/ou somáticas identificadas e também ao COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), um banco de dados exclusivo para variantes somáticas em câncer. A ferramenta de busca *Varsome* (<https://varsome.com/>) também foi utilizada para consultar sobre as novas variantes identificadas, pois reúne informações de variados bancos de dados externos, além de consultar bancos de dados sobre frequências populacionais e reportar a patogenicidade da variante, segundo os critérios da ACMG (KOPANOS *et al.*, 2019).

Figura 4.3: Fluxograma das etapas das análises para as variantes germinativas e somáticas.



5. RESULTADOS

5.1. Descrição dos casos incluídos:

A revisão histopatológica definiu a inclusão de 57 pacientes de câncer de ovário do tipo epitelial ao estudo, no entanto houve a exclusão de 01 caso devido a problemas de amplificação por PCR do material. Dessa forma, o número total correspondeu a 56 casos, sendo 34 (60%) do subtipo Adenocarcinoma/Cistoadenocarcinoma seroso de alto grau (HGSOC); 8 (14%) do subtipo Adenocarcinoma/ Cistoadenocarcinoma mucinoso; 7 (13%) do subtipo Adenocarcinoma/ Cistoadenocarcinoma de células claras; 3 (05%) do subtipo Adenocarcinoma endometriode; 2 (04%) do subtipo Adenocarcinoma/Cistoadenocarcinoma seroso de baixo grau; 1 (02%) tumor misto dos subtipos HGSOC e Adenocarcinoma/ Cistoadenocarcinoma mucinoso; 1 (02%) tumor misto dos subtipos HGSOC e Adenocarcinoma /Cistoadenocarcinoma de células claras. Quanto à representatividade tumoral (RT), o percentual de células tumorais presentes nas amostras de tecido variou de 60% a 100%, em que 4 apresentaram 60% de RT; 6 com 70% de RT; 7 com RT igual a 80%; 7 com 90% de RT; 31 com RT igual a 100%. Um caso de tumor misto apresentou 80% de HGSOC e 10% de células claras.

A mediana de idade ao diagnóstico das pacientes foi de 57 anos, em que para os casos HGSOC também correspondeu aos 57 anos; para os casos de Adenocarcinoma /Cistoadenocarcinoma mucinoso foi de 56 anos; para os casos de Adenocarcinoma /Cistoadenocarcinoma de células claras foi igual a 58; para os casos de Adenocarcinoma endometriode foi de 57 anos; para os casos de Adenocarcinoma/Cistoadenocarcinoma seroso de baixo grau foi de 58 anos. Para o caso do tumor misto dos subtipos HGSOC e Adenocarcinoma /Cistoadenocarcinoma mucinoso o diagnóstico ocorreu aos 31 anos de idade e o caso tumor misto dos subtipos HGSOC e Adenocarcinoma /Cistoadenocarcinoma de células claras foi diagnosticado aos 49 anos de idade.

Com relação ao estadiamento tumoral houve a variação dos estágios I ao IV nos casos incluídos, em que 16 (29%) corresponderam ao estágio I; 3 (05%) ao estágio II; 23 (41%) ao estágio III e 14 (25%) ao estágio IV. O histórico familiar das pacientes, com respeito a tumores associados à HBOC em parentes de primeiro e/ ou segundo grau, indicou a presença de histórico em 13 casos (23%) e a ausência em 43 casos (77%) dos casos. Foi relatado para quatro pacientes o histórico pessoal de câncer anteriormente à data do diagnóstico, tendo uma paciente apresentado Adenocarcinoma sigmoide e as demais tumores malignos de pele. Todas as informações acima citadas estão descritas na tabela 5.1.

Tabela 5.1: Descrição do subtipo histológico, do número de casos incluídos, da mediana de idade ao diagnóstico, da representatividade tumoral, do estadiamento e do histórico familiar das pacientes.

Subtipo histológico	N de casos (%)	Mediana Idade	Representatividade Tumoral (N casos)	Estadiamento (N casos)	Histórico familiar (N casos)
HGSOC	34 (60%)	57	100% (18); 90% (3); 80% (6); 70% (5); 60% (2)	I (3); II (2); III (18); IV (11)	SIM (10); NÃO (24) Parentesco 1º grau: 1 Parentesco 2º grau: 6 Parentesco 1º e 2º graus: 3
Adenocarcinoma/ Cistoadenocarcinoma seroso de baixo grau	2 (04%)	58	100% (1); 90% (1)	I (1); IV (1)	NÃO (2)
Adenocarcinoma/ Cistoadenocarcinoma mucinoso	8 (14%)	56	100% (4); 90% (1); 80% (1); 60% (2)	I (4); II (1); III (3)	SIM (1); NÃO (7) Parentesco 2º grau: 1
Adenocarcinoma/ Cistoadenocarcinoma de células claras	7 (13%)	58	100% (4); 90% (2); 70% (1);	I (5); III (1); IV (1)	SIM (2); NÃO (6) Parentesco 2º grau: 2
Adenocarcinoma endometriode	3 (05%)	57	100% (3)	I (2); IV (1)	NÃO (2)
Tumor Misto*	1 (02%)	31 ⁺	100%	I	NÃO
Tumor Misto**	1 (02%)	49 ⁺	80% HGSC + 10% Células claras	III	NÃO

Legenda: N significa o número de casos correspondentes a cada característica descrita; Tumor Misto* refere-se ao tumor com os subtipos histológicos HGSOC e Adenocarcinoma/ Cistoadenocarcinoma mucinoso; Tumor Misto** refere-se ao tumor com os subtipos histológicos HGSOC e Adenocarcinoma/ Cistoadenocarcinoma células claras; + equivale a idade ao diagnóstico.

5.2. Sequenciamento de Nova Geração:

A corrida do MiSeq foi realizada para 56 amostras pareadas de tumor e de sangue, o que resultou no total de 112 bibliotecas de DNA. O NGS destas amostras resultou em uma densidade de clusterização de 980K/mm² na *flow cell*. O percentual de clusters aprovados pelo filtro interno de qualidade da Illumina foi de 93,4%, sendo que 91,5% dos clusters obtiveram a acurácia de $Q > 30$. A corrida gerou um número total de 37.392.860 leituras, em que foram aprovadas 34.919.650 (96,5%) leituras. Para as amostras de tumor houve, em média, 467.125 leituras com uma variação de 43.605 a 683.890, enquanto para as amostras de sangue a média de leituras foi de 139.775 com uma variação de 68.473 a 345.466; médias que corresponderam à proporção 3:1 de leituras.

Para o gene *BRCA1* nas amostras de sangue o valor médio da média de cobertura por amplicon foi 335.995 vezes, sendo o valor médio mínimo de 59.167 vezes para o amplicon 09 e o valor médio máximo de 2.166.925 vezes para o amplicon 11. Enquanto que para as amostras de tumor, o gene *BRCA1* obteve o valor médio da média de cobertura por amplicon de 2.330.744 vezes com o valor mínimo de 442.641 vezes para o amplicon 09 e o valor máximo de 7.475.773 vezes para o amplicon 11. Com relação ao gene *BRCA2*, as amostras de sangue apresentaram um valor médio correspondeu a 287.289 vezes de cobertura média por amplicon, sendo o valor mínimo de 71.234 vezes para o amplicon 12 e o valor máximo de 818.112 vezes para o amplicon 19-20. Para as amostras tumorais, o valor médio do gene *BRCA2* correspondeu a 1.965.146 vezes de cobertura média por amplicon com o valor mínimo de 227.065 vezes para o amplicon 12 e o valor máximo de 5.377.819 vezes para o amplicon 17-18. Para o gene *TP53* nas amostras de sangue, o valor médio foi 381.900 vezes para a média de cobertura por amplicon com o valor mínimo de 308.361 vezes para o amplicon 02-04 e o valor máximo de 489.604 vezes para o amplicon 05-09. Já para as amostras de tumor, o gene *TP53* obteve o valor médio de 1.505.641 vezes para a média de cobertura por amplicon, com o valor mínimo de 961.946 vezes para o amplicon 10-11 e o valor máximo de 2.375.778 vezes para o amplicon 02-04. A tabela 5.2 apresenta os resultados sobre a cobertura por amplicon mencionados acima.

Tabela 5.2: Valores médio, mínimo e máximo da cobertura por amplicon para os genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*.

Gene	Cobertura por amplicon	
	Média_Tumor (Valor mínimo/máximo)	Média_Sangue (Valor mínimo/máximo)
<i>BRCA1</i>	2.330.744 (442.641/ 7.475.773)	335.995 (59.167/ 2.166.925)
<i>BRCA2</i>	1.965.146 (227.065/ 5.377.819)	287.289 (71.234/ 818.112)
<i>TP53</i>	1.505.641 (961.946/ 2.375.778)	381.900 (308.361/ 489.604)

Em relação à cobertura média por base para cada amplicon, o gene *BRCA1* apresentou nas amostras de sangue uma profundidade média de 32.892 vezes com o valor mínimo igual a 4.781 vezes para o amplicon 22-23 e com o valor máximo de 77.961 vezes para o amplicon 24. As amostras de tumor para o mesmo gene corresponderam a uma média de 281.728 vezes com o valor mínimo de 44.195 vezes para o amplicon 05-07 e o máximo igual a 727.932 vezes para o amplicon 12. Quanto ao gene *BRCA2*, as amostras de sangue obtiveram uma média de 24.688 vezes com o valor mínimo igual a 2.703 vezes para o amplicon 04-07 e com o valor máximo de 80.268 vezes para o amplicon 26. As amostras de tumor apresentaram um valor médio de 161.327 vezes com o valor mínimo de 28.658 vezes para o amplicon 04-07 e o máximo igual a 276.941 vezes para o amplicon 09. O gene *TP53* apresentou para as amostras de sangue um valor médio de 17.827 vezes com o valor mínimo igual a 15.215 vezes para o amplicon 05-09 e com o valor máximo de 22.225 vezes para o amplicon 02-04. As amostras de tumor para este gene apresentaram um valor médio igual a 84.042 vezes com o valor mínimo igual a 36.645 vezes para o amplicon 05-09 e o valor máximo de 171.227 vezes para o amplicon 02-04. As figuras de 5.1 a 5.6 apresentam a distribuição da cobertura média por base para cada amplicon em cada amostra de tumor (figuras 5.1; 5.3 e 5.5) e de sangue (figuras 5.2; 5.4 e 5.6).

Figura 5.1: Distribuição das médias de cobertura por base das amostras de tumor para o gene *BRCA1*.

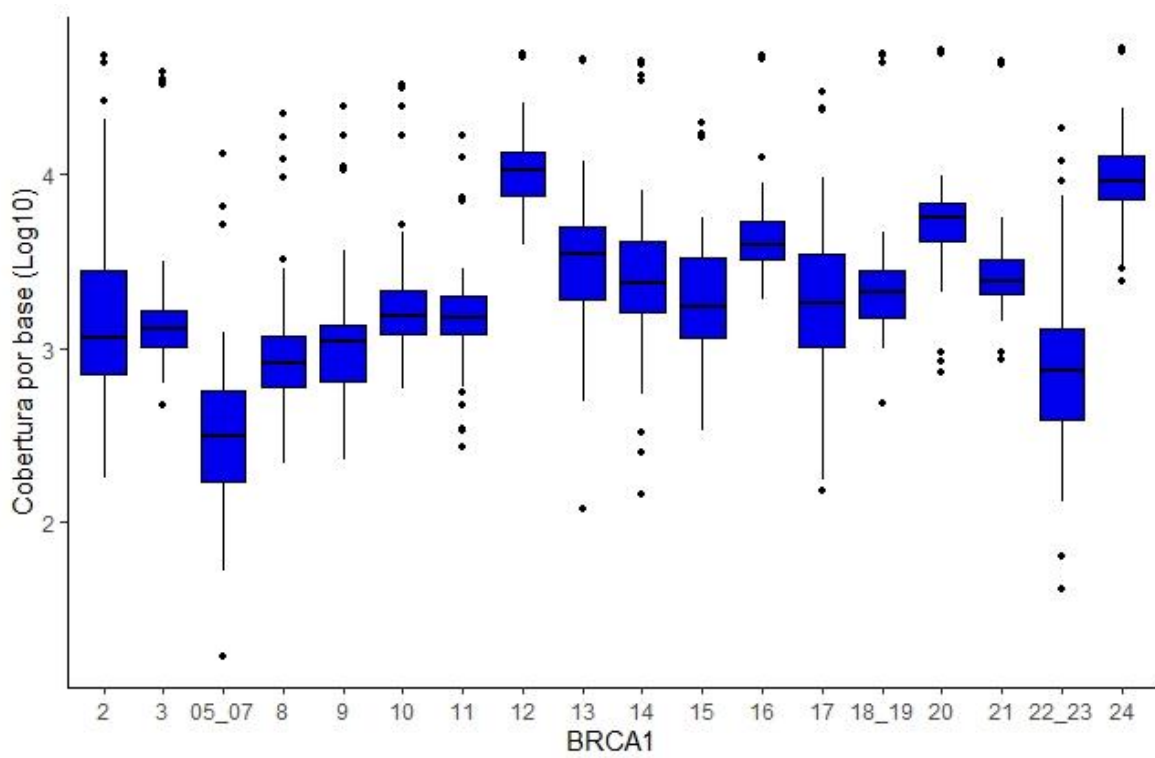


Figura 5.2: Distribuição das médias de cobertura por base das amostras de sangue para o gene *BRCA1*.

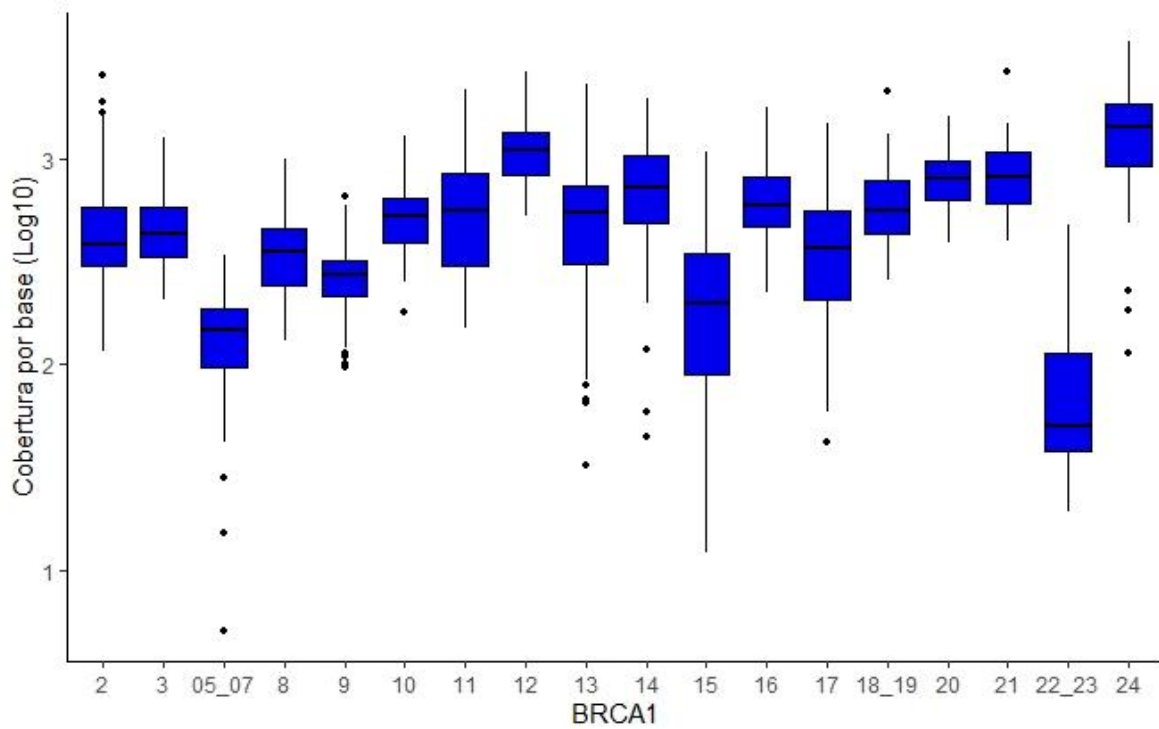


Figura 5.3: Distribuição das médias de cobertura por base das amostras de tumor para o gene *BRCA2*.

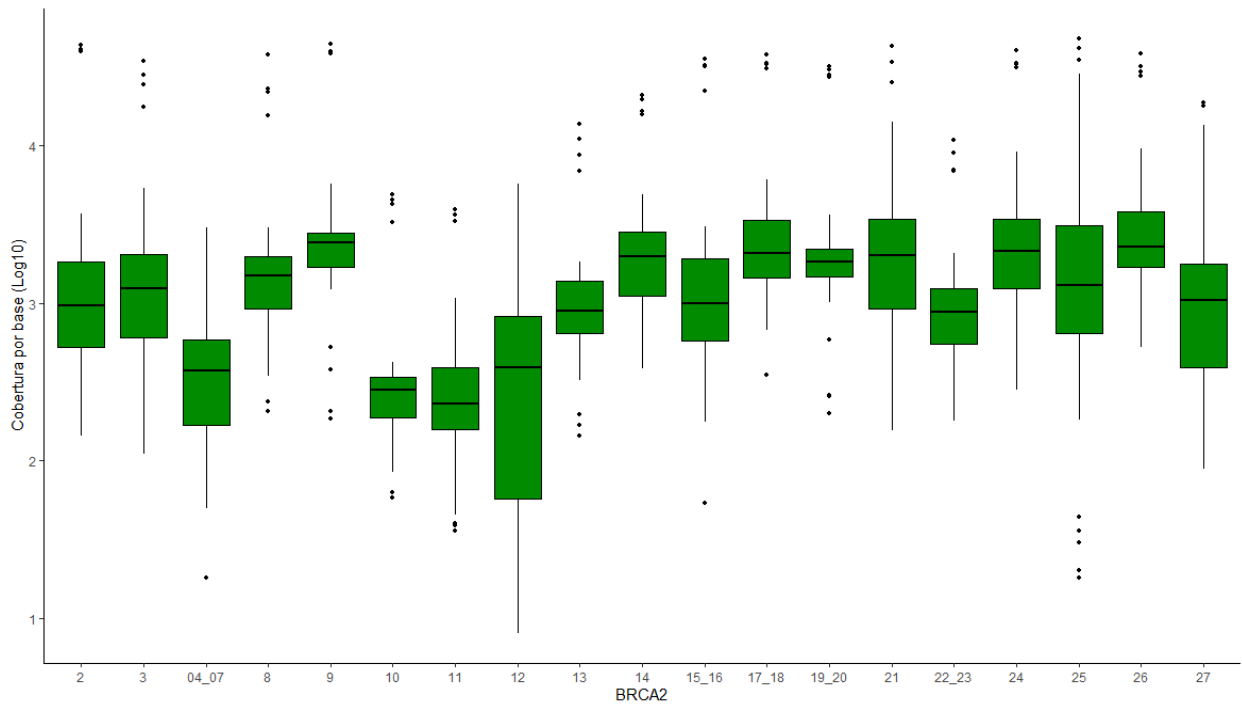


Figura 5.4: Distribuição das médias de cobertura por base das amostras de sangue para o gene *BRCA2*.

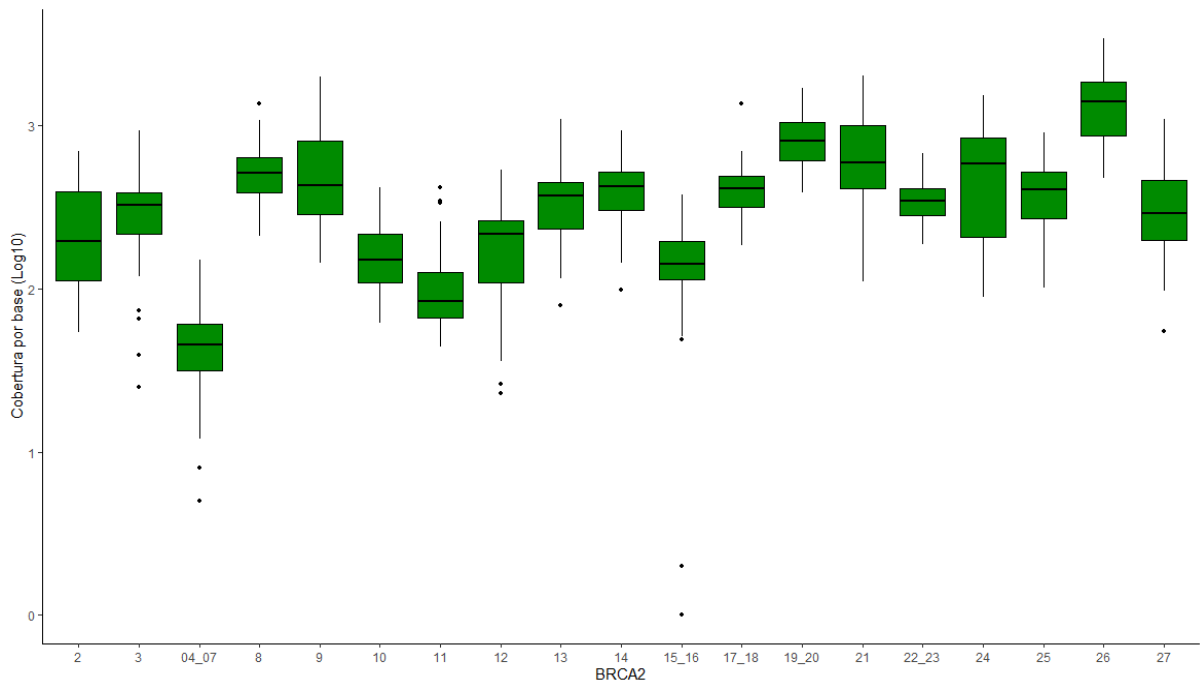


Figura 5.5: Distribuição das médias de cobertura por base das amostras de tumor para o gene *TP53*.

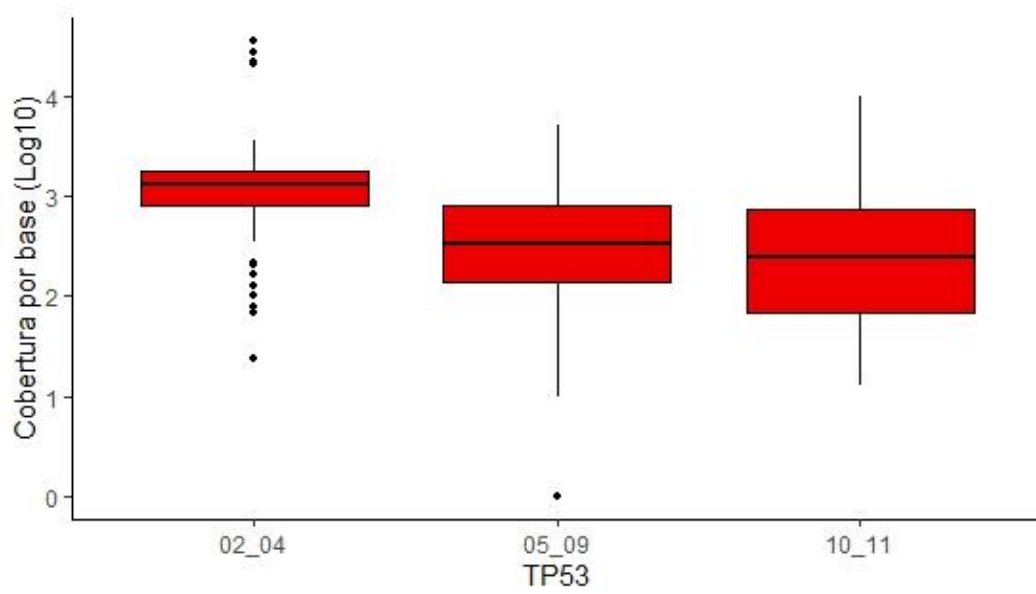
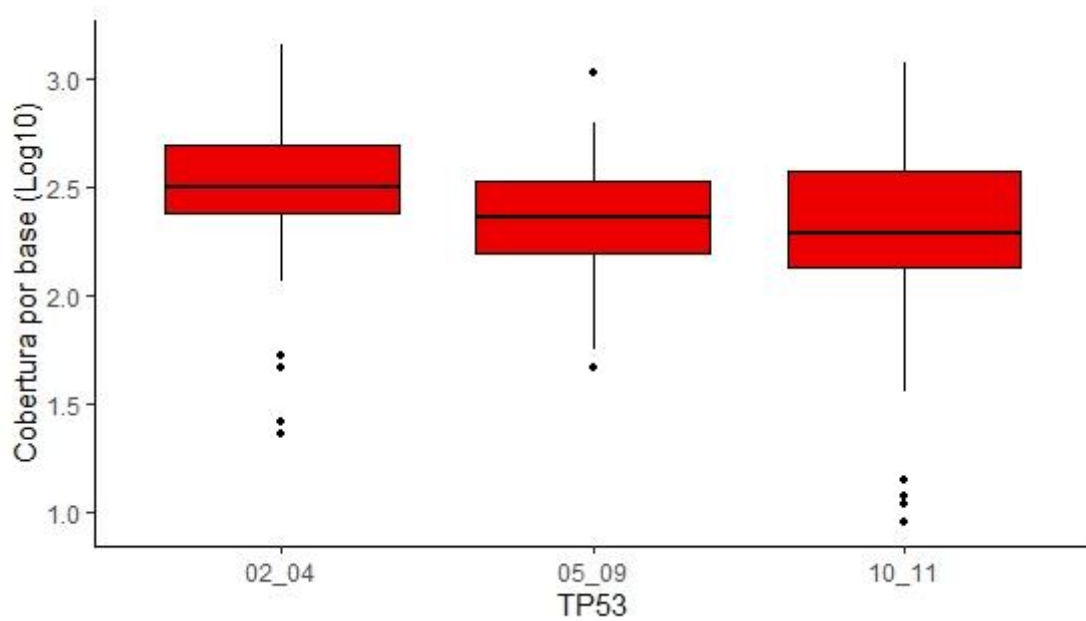


Figura 5.6: Distribuição das médias de cobertura por base das amostras de sangue para o gene *TP53*.



5.3. Variantes genéticas germinativas:

O sequenciamento de Nova Geração das 56 amostras de sangue resultou na identificação de 163 variantes germinativas nas regiões codificantes e flanqueadoras (posições de até 50pb) dos éxons dos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*. Do total de variantes identificadas, 112 foram variantes exônicas e 51 foram variantes intrônicas. Foram incluídas nas demais análises apenas as variantes exônicas, já que todas as variantes intrônicas identificadas não se localizaram no sítio acceptor ou doador de *splicing* (posições +/- 1pb ou 2pb do íntron).

Dessa forma, a caracterização quanto à patogenicidade foi feita para as 112 variantes germinativas presentes nos éxons dos genes de interesse. A análise de cobertura da posição para tais variantes variou de 49 vezes a 1599 vezes, o que confirmou a qualidade e a confiabilidade da anotação de cada variante. Dentre todas as variantes detectadas, o tipo *missense* ou troca de sentido foi o mais frequente das alterações encontradas, correspondendo a 108 (96%) variantes; seguido de 2 (2%) do tipo *frameshift* ou mudança na matriz de leitura e 2 (2%) do tipo *stop codon* ou códon de parada de leitura. Do número total de variantes germinativas analisadas, 99 (88%) foram classificadas como provavelmente benignas ou benignas; 06 (5%) como provavelmente patogênicas ou patogênicas; 4 (4%) como significado clínico incerto (VUS); 2 (2%) com conflitos de patogenicidade entre provavelmente benigna ou benigna e VUS; 1 (1%) variante VUS sem depósito no ClinVar.

Todas as 103 variantes classificadas como provavelmente benignas ou benignas equivaleram ao tipo *missense* (103/108), em que 40 das mesmas corresponderam ao gene *BRCA1*, 16 ao gene *BRCA2* e 47 ao gene *TP53*. A variante do tipo *missense* (1/108) classificadas como provavelmente patogênica ou patogênica foi encontrada no gene *BRCA1*; as 2 variantes do tipo *missense* (2/108) com conflito de patogenicidade entre provavelmente patogênica e VUS foram detectadas no gene *BRCA1*; a variante do tipo *missense* (1/108) com conflito de patogenicidade entre provavelmente benigna e VUS foi detectada em *BRCA2*; a única VUS do tipo *missense* (1/108) foi identificada no gene *BRCA2*. Nas variantes germinativas também foram encontradas 2 alterações do tipo *frameshift* (2/2) no gene *BRCA2*, as quais obtiveram a classificação de patogênica. Duas variantes do tipo *stop codon* (2/2) também foram identificadas no gene *BRCA1*, tendo uma (1/2) sido classificada como patogênica e a outra (1/2) classificada como VUS, no entanto sem depósito no ClinVar. A tabela 5.3 demonstra estes resultados e informações acerca da patogenicidade das alterações germinativas encontradas para cada gene serão descritas em seções posteriores.

Tabela 5.3: Enumeração pela classificação e tipo das variantes germinativas detectadas nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*.

Gene	Classificação	Tipo	N
<i>BRCA1</i>	PB/B	<i>Missense</i>	40
	PP/P	<i>Missense</i>	1
	P	<i>Stop códon</i>	1
	VUS*	<i>Stop codon</i>	1
	PP/VUS ⁺	<i>Missense</i>	2
<i>BRCA2</i>	PB/B	<i>Missense</i>	16
	VUS	<i>Missense</i>	1
	PB/VUS ⁺	<i>Missense</i>	1
	P	<i>Frameshift</i>	2
<i>TP53</i>	PB/B	<i>Missense</i>	47

Legenda: N significa o número de variantes identificadas por tipo para cada classificação; PB/B significa variante classificada como provavelmente benigna ou benigna; PP/P significa variante classificada como provavelmente patogênica ou patogênica; VUS* significa variante sem depósito de classificação no ClinVar; PP/VUS⁺ significa conflito de patogenicidade entre provavelmente patogênica e VUS; PB/VUS⁺ significa conflito de patogenicidade entre provavelmente benigna e VUS.

5.3.1 Variantes genéticas germinativas no gene *BRCA1*:

Nas regiões codificantes do gene *BRCA1* foram detectadas 45 variantes germinativas no total, sendo 43 variantes do tipo *missense* e 02 variantes do tipo *stop códon* (Tabela 5.4). As variantes do tipo *missense* foram classificadas em 40 provavelmente benignas ou benignas; 02 com conflito de patogenicidade entre provavelmente patogênica e VUS; 01 como patogênica. Enquanto que 01 variante do tipo *stop codon* foi classificada como patogênica e a outra do mesmo tipo foi classificada como VUS, mas sem depósito no ClinVar. O anexo 06 especifica todas as variantes germinativas em *BRCA1*.

Dos 40 casos que apresentaram mutações germinativas para o gene *BRCA1*, 37 pacientes apresentaram variantes classificadas como provavelmente benignas ou benignas e 05 pacientes corresponderam às variantes provavelmente patogênicas ou patogênicas e VUS, mas sem depósito no ClinVar.

Tabela 5.4: Variantes germinativas identificadas nas regiões codificantes do gene *BRCA1* como patogênicas, com conflito de patogenicidade ou sem classificação.

Paciente	Éxon	dbSNP	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	DP (%) alelo ALT
1	10	-	c.1387A>T	p.Lys463*	VUS	87	36 (41%)
12	13	rs80357389	c.4484G>T	p.Arg1495Met	P	383	164 (43%)
42	15	rs80357390	c.4964C>T	p.Ser1655Phe	VUS/PP ⁺	890	452 (51%)
66	10	rs80357136	c.3403C>T	p.Gln1135*	P	1306	624 (48%)
67	15	rs80357390	c.4964C>T	p.Ser1655Phe	VUS/PP ⁺	383	179 (47%)

Legenda: P significa variante classificada como patogênica; VUS/P⁺ significa conflito de patogenicidade entre VUS e patogênica; VUS/PP/P⁺ significa conflito de patogenicidade entre VUS e provavelmente patogênica e patogênica; DP significa profundidade de leitura na posição e ALT significa alelo alternativo.

5.3.2 Variantes genéticas germinativas no gene *BRCA2*:

Foram encontradas para o gene *BRCA2* nas regiões codificantes 20 variantes germinativas, sendo 18 *missense* e 02 *frameshift* (Tabela 5.5). As variantes do tipo *missense* foram classificadas em 14 benignas; 02 provavelmente benignas ou benignas; 01 com conflito de patogenicidade entre provavelmente benigna e VUS; 01 como VUS. As variantes do tipo *frameshift* foram classificadas como patogênicas. O anexo 07 especifica todas as variantes germinativas em *BRCA2*.

Essas variantes foram identificadas em 16 pacientes, desses 14 casos apresentaram variantes provavelmente benignas ou benignas e 04 casos possuíam variantes patogênicas, VUS ou com conflito de patogenicidade entre provavelmente benigna e VUS.

Tabela 5.5: Variantes germinativas identificadas nas regiões codificantes do gene *BRCA2* como patogênicas, VUS ou com conflito de patogenicidade.

Paciente	Éxon	dbSNP	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	DP (%) alelo ALT
62	Éxon 11	rs397507838	c.6281A>G	p.Tyr2094Cys	VUS	126	74 (59%)
62	Éxon 10	rs80359264	c.1138del	p.Ser380ValfsTer19	P	308	156 (51%)
64	Éxon 11	rs80359535	c.5771_5774del	p.Ile1924ArgfsTer38	P	107	53 (50%)
67	Éxon 11	rs80358880	c.6443C>A	p.Ser2148Tyr	VUS/PB ⁺	444	2199%)

Legenda: P significa variante classificada como patogênica; VUS/PB⁺ significa conflito de patogenicidade entre VUS e provavelmente benigna; DP significa profundidade de leitura na posição e ALT significa alelo alternativo.

5.3.3 Variantes genéticas germinativas no gene TP53:

Nas regiões codificantes do gene *TP53* foram identificadas 47 variantes germinativas, sendo todas do tipo *missense* e classificadas como benignas. Tais alterações estiveram presentes em 47 pacientes, no entanto uma mesma variante (c.215C>G) foi detectada em 45 diferentes casos. Os demais casos apresentaram a variante c.139C>T na paciente 06 e a variante c.869G>A na paciente 59. O anexo 08 especifica todas as variantes germinativas em *TP53*.

O gene *TP53* não apresentou nenhuma variante germinativa com potencial patogênico e, por isso, todas as alterações benignas mencionadas acima serão descritas na seção anexos deste trabalho.

5.4 Variantes genéticas somáticas:

O sequenciamento das amostras tumorais resultou no total de 121 variantes somáticas nas regiões codificantes e das posições flanqueadoras até 50pb dos éxons dos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*. De todas as variantes identificadas, 68 foram variantes exônicas e 53 foram variantes intrônicas; no entanto foram incluídas na análise as variantes exônicas e as variantes localizadas em sítio acceptor ou doador de *splicing*. Dessa forma, houve a exclusão de 51 variantes intrônicas e a inclusão de apenas 2 variantes (posições -1pb e +2pb do íntron), o que totalizou 70 variantes somáticas identificadas para os três genes de interesse.

A cobertura da posição para tais variantes variou de 77 vezes a 2832 vezes, o que assim como para as variantes germinativas, também confirmou a qualidade e a confiabilidade da anotação de cada variante. O tipo *missense* ou troca de sentido foi a mais frequente das alterações encontradas, correspondendo a 44 (63%) variantes; seguido de 14 (20%) do tipo *frameshift* ou mudança na matriz de leitura; 8 (11%) do tipo *stop codon* ou códon de parada de leitura; 1 (1%) do tipo deleção *inframe*; 1 (1%) do tipo inserção *inframe*; 1 (1%) do tipo sítio acceptor de *splicing* e 1 (1%) do tipo sítio doador de *splicing*. Dentre todas as variantes detectadas, 39 (56%) foram classificadas como provavelmente patogênicas ou patogênicas; 05 (07%) como significado clínico incerto (VUS); 6 (09%) como provavelmente benigna ou benigna; 1 com conflito de patogenicidade entre provavelmente patogênica e VUS (1%); e 19 variantes classificadas como VUS, mas sem depósito no ClinVar (27%).

As variantes provavelmente patogênicas ou patogênicas equivaleram em 19 das 44 variantes do tipo *missense*, sendo 18 correspondentes ao gene *TP53* e 1 ao gene *BRCA1*. Além de, 11 corresponderam ao tipo *frameshift* (11/14), em que 3 foram identificadas para o

gene *BRCA1*, 6 para *BRCA2* e 2 para *TP53*. As demais alterações provavelmente patogênicas ou patogênicas foram 7 do tipo *stop codon* (7/8), das quais 5 foram identificadas no gene *TP53* e 02 no gene *BRCA2*; assim como a variante do tipo deleção *inframe* e a localizada em sítio acceptor de *splicing* foram detectadas no gene *TP53*.

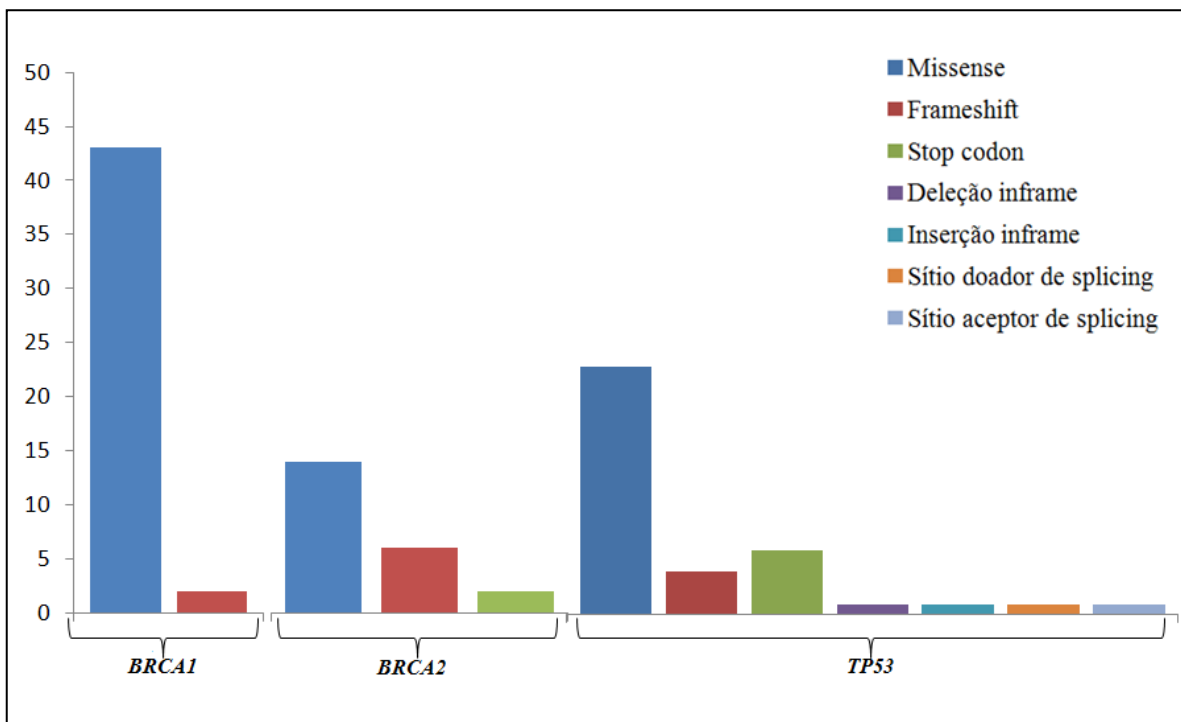
Com relação às VUS, 5 eram do tipo *missense* (5/44) e encontradas 3 no gene *TP53* e 2 em *BRCA2*. As 6 variantes provavelmente benignas ou benignas eram todas do tipo *missense* (7/44), em que 05 foram identificadas em *BRCA1*, 01 no gene *BRCA2* e 01 no gene *TP53*. A variante com conflito de patogenicidade entre patogênica e VUS foi *missense* (1/44) encontrada no gene *TP53*. As variantes classificadas como VUS, mas sem classificação depósito no ClinVar, foram 12 do tipo *missense* (12/44) localizadas 01 no gene *BRCA1* e 11 no gene *BRCA2*; contudo foi a mesma variante de *BRCA2* que esteve presente em 11 casos. Três variantes do tipo *frameshift* (03/14) detectadas 2 no gene *TP53* e 01 em *BRCA1*; além de 01 alteração *stop codon*, 01 inserção *inframe* e 01 variante em sítio doador de *splicing* localizadas no gene *TP53*. A tabela 5.6 e a figura 5.7 condensam as informações acerca patogenicidade das alterações somáticas encontradas para cada gene serão descritas em seções posteriores.

Tabela 5.6: Enumeração pela classificação e tipo das variantes germinativas detectadas nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*.

Gene	Classificação	Tipo	N
<i>BRCA1</i>	PB/B	<i>Missense</i>	5
	PP/P	<i>Missense</i>	1
	PP/P	<i>Frameshift</i>	3
	VUS*	<i>Missense</i>	1
	VUS*	<i>Frameshift</i>	1
<i>BRCA2</i>	PB/B	<i>Missense</i>	1
	PP/P	<i>Frameshift</i>	6
	PP/P	<i>Stop códon</i>	2
	VUS	<i>Missense</i>	2
	VUS*	<i>Missense</i>	11
<i>TP53</i>	PB	<i>Missense</i>	1
	PP/P	<i>Missense</i>	18
	PP/P	<i>Frameshift</i>	2
	PP/P	<i>Stop códon</i>	5
	PP/P	Deleção <i>inframe</i>	1
	PP/P	Sítio aceptor de <i>Splicing</i>	1
	VUS	<i>Missense</i>	3
	VUS/P ⁺	<i>Missense</i>	1
	VUS*	<i>Frameshift</i>	2
	VUS*	Inserção <i>inframe</i>	1
	VUS*	Sítio doador de <i>Splicing</i>	1

Legenda: N significa o número de variantes identificadas por tipo para cada classificação; PB/B significa variante classificada como provavelmente benigna ou benigna; PP/P significa variante classificada como provavelmente patogênica ou patogênica; VUS* significa variante sem depósito de classificação no ClinVar; VUS/P⁺ significa conflito de patogenicidade entre patogênica e VUS.

Figura 5.7: Distribuição das variantes somáticas para cada gene (*BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*), conforme a consequência das alterações.



5.4.1 Variantes genéticas somáticas no gene *BRCA1*:

O gene *BRCA1* apresentou um total de 11 variantes nas regiões codificantes (Tabela 5.7), sendo 7 variantes foram do tipo *missense* e 4 do tipo *frameshift*. Dentre as variantes *missense*, 5 foram classificadas como provavelmente benignas ou benignas, 1 como variante patogênica e 1 VUS, mas sem depósito não no ClinVar. As variantes do tipo *frameshift* classificaram-se como: 03 variantes patogênicas e 01 a princípio patogênica, que não apresenta depósito no ClinVar.

As variantes somáticas para o gene *BRCA1* foram detectadas em 08 casos, sendo que 2 casos apresentaram alterações classificadas como provavelmente benigna ou benigna e 6 foram referentes às variantes patogênicas e à variante sem depósito no ClinVar, mas por ser do tipo *frameshift* deve ser considerada à princípio como patogênica, segundo recomendações da ACMG. O anexo 09 especifica todas as variantes somáticas em *BRCA1*.

Tabela 5.7: Variantes somáticas identificadas nas regiões codificantes do gene *BRCA1* como patogênicas e sem classificação depositada no ClinVar.

Paciente	Éxon	dbSNP	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	DP (%) alelo ALT
04	09	rs80357537	c.668del	p.Lys223ArgfsTer11	P	2339	52 (02%)
08	10	-	c.3600_3619del	p.Gly1201GlufsTer11	P*	795	65 (08%)
10	10	-	c.1952A>G	p.Lys651Arg	VUS	2241	11 (0%)
15	10	rs886040056	c.2637del	p.Glu880ArgfsTer13	P	237	13 (05%)
57	19	rs80356937	c.5212G>A	p.Gly1738Arg	P	2674	2126 (80%)
67	10	rs886040056	c.2637del	p.Glu880ArgfsTer13	P	432	13 (03%)

Legenda: P significa variante classificada como patogênica; P* significa variante sem classificação pelo ClinVar, mas considerada a princípio patogênica, conforme recomendação da ACMG, por ser *frameshift*; DP significa profundidade de leitura na posição e ALT significa alelo alternativo.

5.4.2 Variantes genéticas somáticas no gene BRCA2:

Nas regiões codificantes do gene *BRCA2* foram identificadas 22 variantes (Tabela 5.8), em que dentre estas 14 variantes foram consideradas do tipo *missense*, 06 do tipo *frameshift* e 2 do tipo *stop codon*. No conjunto de variantes *missense*, 1 variante foi classificada como benigna, 2 como variantes VUS e as demais 11 variantes também como VUS, mas sem depósito no ClinVar. Todas as variantes do tipo *frameshift* assim como as variantes do tipo *stop codon* foram classificadas como patogênicas.

Foram relatadas variantes somáticas no gene *BRCA2* em 15 casos, dos quais 01 caso obteve uma variante benigna e 14 casos apresentaram as variantes patogênicas, VUS e VUS sem depósito no ClinVar. O anexo 10 especifica todas as variantes somáticas em *BRCA2*.

Tabela 5.8: Variantes somáticas identificadas nas regiões codificantes do gene *BRCA2* como patogênicas e VUS.

Paciente	Éxon	dbSNP	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	DP (%) alelo ALT
12	11	rs1555284238	c.5462A>G	p.Lys1821Arg	VUS	615	12 (02%)
12	18	-	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	VUS	1517	21 (01%)
15	18	-	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	VUS	1569	26 (02%)
33	18	rs757206472	c.8008T>C	p.Ser2670Pro	VUS	2173	11 (01%)
33	18	-	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	VUS	2365	33 (01%)
34	11	rs80359406	c.3860del	p.Asn1287IlefsTer6	P	453	11 (02%)
34	18	rs397507952	c.8021del	p.Lys2674ArgfsTer2	P	1325	27 (02%)
35	10	rs80358438	c.1528G>T	p.Glu510*	P	303	219 (72%)
35	18	-	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	VUS	2288	28 (01%)
36	18	-	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	VUS	1770	36 (02%)
38	18	rs397507952	c.8021del	p.Lys2674ArgfsTer2	P	2179	40 (02%)
43	18	rs397507952	c.8021del	p.Lys2674ArgfsTer2	P	1926	22 (01%)
49	18	-	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	VUS	740	12 (02%)
54	18	rs397507952	c.8021del	p.Lys2674ArgfsTer2	P	1336	27 (02%)
54	18	-	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	VUS	1409	12 (01%)
56	18	-	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	VUS	2832	36 (01%)
60	18	rs397507952	c.8021del	p.Lys2674ArgfsTer2	P	1543	33 (02%)
60	18	-	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	VUS	1620	16 (01%)

Paciente	Éxon	dbSNP	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	DP (%) alelo ALT
62	18	-	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	VUS	1414	22 (02%)
66	18	-	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	VUS	1836	22 (01%)
66	21	rs397508002	c.8680C>T	p.Gln2894*	P	473	43 (09%)

Legenda: P significa variante classificada como patogênica; DP significa profundidade de leitura na posição e ALT significa alelo alternativo.

5.4.3 Variantes genéticas somáticas no gene TP53:

Para o gene *TP53* foram encontradas 35 variantes somáticas nas regiões exônicas e 2 variantes intrônicas (Tabela 5.9). As variantes exônicas foram identificadas como 23 do tipo *missense*, 4 do tipo *frameshift*, 6 do tipo *stop codon*, 1 do tipo deleção *inframe*, 1 do tipo inserção *inframe*. Já as variantes intrônicas corresponderam a 1 em sítio doador de *splicing* e outra em sítio acceptor de *splicing*.

As variantes *missense* classificaram-se em 18 variantes provavelmente patogênicas ou patogênicas, 3 VUS, 1 com conflito de patogenicidade entre patogênica e VUS. As variantes *frameshift* foram categorizadas em 1 variante patogênica, 1 variante provavelmente patogênica e 2 variantes sem classificação no ClinVar, mas consideradas a princípio como patogênicas de acordo com as recomendações da ACMG.. As variantes do tipo *stop codon* foram classificadas como: 4 variantes patogênicas, 1 variante provavelmente patogênica ou patogênica e 01 variante sem classificação no ClinVar, mas considerada a princípio como patogênica conforme os critérios da ACMG. A variante do tipo deleção *inframe* foi classificada como provavelmente patogênica e a do tipo inserção *inframe* não teve sua classificação depositada no ClinVar, mas por causar uma inserção foi considerada como potencialmente patogênica de acordo aos critérios da ACMG. A variante intrônica de sítio doador de *splicing* foi categorizada a princípio como patogênica, conforme os critérios da ACMG; e a variante de sítio acceptor de *splicing* foi classificada como provavelmente patogênica.

Foram identificadas variantes somáticas no gene em 35 casos *TP53*, em que todos possuíram variantes patogênicas, provavelmente patogênicas, VUS, variante com conflito de patogenicidade e variantes *stop codon* ou *frameshift* ou modificadoras de *splicing* sem depósito no ClinVar, mas consideradas a princípio como patogênicas por recomendações da ACMG. O anexo 11 especifica todas as variantes somáticas em *TP53*.

Tabela 5.9: Variantes somáticas identificadas nas regiões exônicas e intrônicas do gene *TP53* como provavelmente patogênicas, patogênicas, VUS, com conflitos de patogenicidade.

Paciente	Éxon	DbSNP	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	DP (%) alelo ALT
01	05	rs1057519991	c.536A>G	p.His179Arg	VUS/P ⁺	2703	1869 (69%)
02	08	rs121913344	c.916C>T	p.Arg306*	PP	86	43 (50%)
03	06	rs760043106	c.584T>C	p.Ile195Thr	PP	83	61 (73%)
04	05	rs1057519978	c.421T>G	p.Cys141Gly	PP	1137	677 (60%)
05	06	rs730882019	c.455del	p.Pro152ArgfsTer18	P	2013	1296 (64%)
06	08	rs587781525	c.842A>T	p.Asp281Val	PP	77	28 (36%)
07	06	rs121912666	c.659A>G	p.Tyr220Cys	PP	526	308 (59%)
09	05	rs730882001	c.493C>T	p.Gln165*	P	144	130 (90%)
10	07	rs11540652	c.743G>A	p.Arg248Gln	PP	2174	1616 (74%)
11	07	rs730882027	c.752T>A	p.Ile251Asn	VUS	754	586 (78%)
12	06	rs786201838	c.578A>G	p.His193Arg	PP	555	336 (61%)
16	08	rs28934576	c.818G>A	p.Arg273His	PP	355	336 (95%)
17	04	rs587783062	c.267del	p.Ser90ProfsTer33	PP	1638	1480 (90%)
23	08	rs786201059	c.856G>A	p.Glu286Lys	PP	357	42 (12%)
27	06	rs397516436	c.637C>T	p.Arg213*	P	135	130 (96%)

Paciente	Éxon	DbSNP	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	DP (%) alelo ALT
30	07	-	c.780del	p.Ser261ValfsTer84	P*	206	155 (75%)
31	07	rs1064794309	c.764_766del	p.Ile255del	PP	218	89 (41%)
32	Íntron 05	-	c.559+2T>G	-	P*	247	206 (83%)
33	05	rs876660754	c.517G>T	p.Val173Leu	PP	152	85 (56%)
35	07	-	c.732_733insCATGCG	p.Gly244_Gly245insHisAla	P*	358	195 (54%)
42	09	-	c.988del	p.Leu330PhefsTer15	P*	400	62 (16%)
43	08	rs28934574	c.844C>T	p.Arg282Trp	PP	757	19 (03%)
48	07	rs121912651	c.742C>T	p.Arg248Trp	PP	1396	933 (67%)
49	04	rs1555526478	c.372C>A	p.Cys124*	P	1095	985 (90%)
50	05	rs121912654	c.469G>T	p.Val157Phe	VUS	1476	657 (45%)
52	05	rs730881999	c.380C>T	p.Ser127Phe	VUS	179	85 (47%)
54	07	rs587782664	c.711G>C	p.Met237Ile	P	1196	770 (64%)
55	05	rs730882001	c.493C>T	p.Gln165*	P	679	320 (47%)
56	08	rs193920774	c.797G>A	p.Gly266Glu	PP	623	569 (91%)
57	07	rs28934575	c.733G>A	p.Gly245Ser	PP	837	539 (64%)
60	05	rs148924904	c.488A>G	p.Tyr163Cys	PP	102	71 (70%)
63	Íntron 07	rs1555525367	c.783-1G>T	-	PP	94	77 (82%)
64	04	-	c.272G>A	p.Trp91*	P*	186	62 (33%)

Paciente	Éxon	DbSNP	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	DP (%) alelo ALT
65	05	rs28934578	c.524G>A	p.Arg175His	PP	135	77 (57%)
67	08	rs876659802	c.833C>T	p.Pro278Leu	PP	130	46 (35%)
67	07	rs765848205	c.710T>A	p.Met237Lys	PP	127	40 (31%)

Legenda: P significa variante classificada como patogênica; P* significa variante sem classificação pelo ClinVar, mas considerada a princípio patogênica, conforme recomendação da ACMG; PP significa variante classificada como provavelmente patogênica; VUS/P⁺ significa conflito de patogenicidade entre patogênica e VUS; DP significa profundidade de leitura na posição e ALT significa alelo alternativo.

5.5 Perda de Heterozigosidade:

As amostras de sangue apresentaram 9 variantes, para os genes *BRCA1* e *BRCA2*, classificadas como patogênicas, VUS, sem classificação depositada no ClinVar (e consideradas aqui como VUS) e com conflito de patogenicidade entre provavelmente patogênica e VUS. Para investigar a perda de heterozigosidade (LOH) em tais alterações, as respectivas posições nas regiões codificantes foram avaliadas nas amostras de tumor com o uso da ferramenta *Integrative Genomics Viewer* (IGV). Dessa maneira foi possível visualizar e comparar as proporções dos alelos de referência e alternativos nas amostras de sangue e de tumor.

A análise considerou como indicativo de LOH o critério da frequência alélica do alelo alternativo da amostra de tumor igual ou acima 80% ($ALT \geq 80\%$) e, por conseguinte, frequência alélica do alelo de referência igual ou abaixo 20% ($REF \leq 20\%$). A partir deste critério, houve indicação de LOH em 4 das nove variantes analisadas, sendo todas as variantes identificadas no gene *BRCA1* (Tabela 5.10).

Tabela 5.10: Proporção alélica nas variantes com LOH identificadas nas amostras de sangue e tumor

Paciente	Variante	Efeito na proteína	Classificação	Amostra	Proporção alélica (ALT/REF) em (%)
01	c.1387A>T	p.Lys463*	P*	Sangue	42% / 58%
				Tumor	89% / 11%
12	c.4484G>T	p.Arg1495Met	P	Sangue	42% / 58%
				Tumor	16% / 84%
66	c.3403C>T	p.Gln1135*	P	Sangue	48% / 52%
				Tumor	14% / 86%
67	c.4964C>T	p.Ser1655Phe	VUS/PP/P ⁺	Sangue	49% / 51%
				Tumor	20% / 80%

Legenda: P significa variante classificada como patogênica; P* significa variante sem classificação pelo ClinVar, mas considerada a princípio patogênica, conforme recomendação da ACMG; VUS/PP/P⁺ significa conflito de patogenicidade entre provavelmente patogênica, patogênica e VUS; REF significa alelo de referência e ALT significa alelo alternativo.

5.6 Variantes germinativas de *BRCA1* e *BRCA2* nas sequências codificantes:

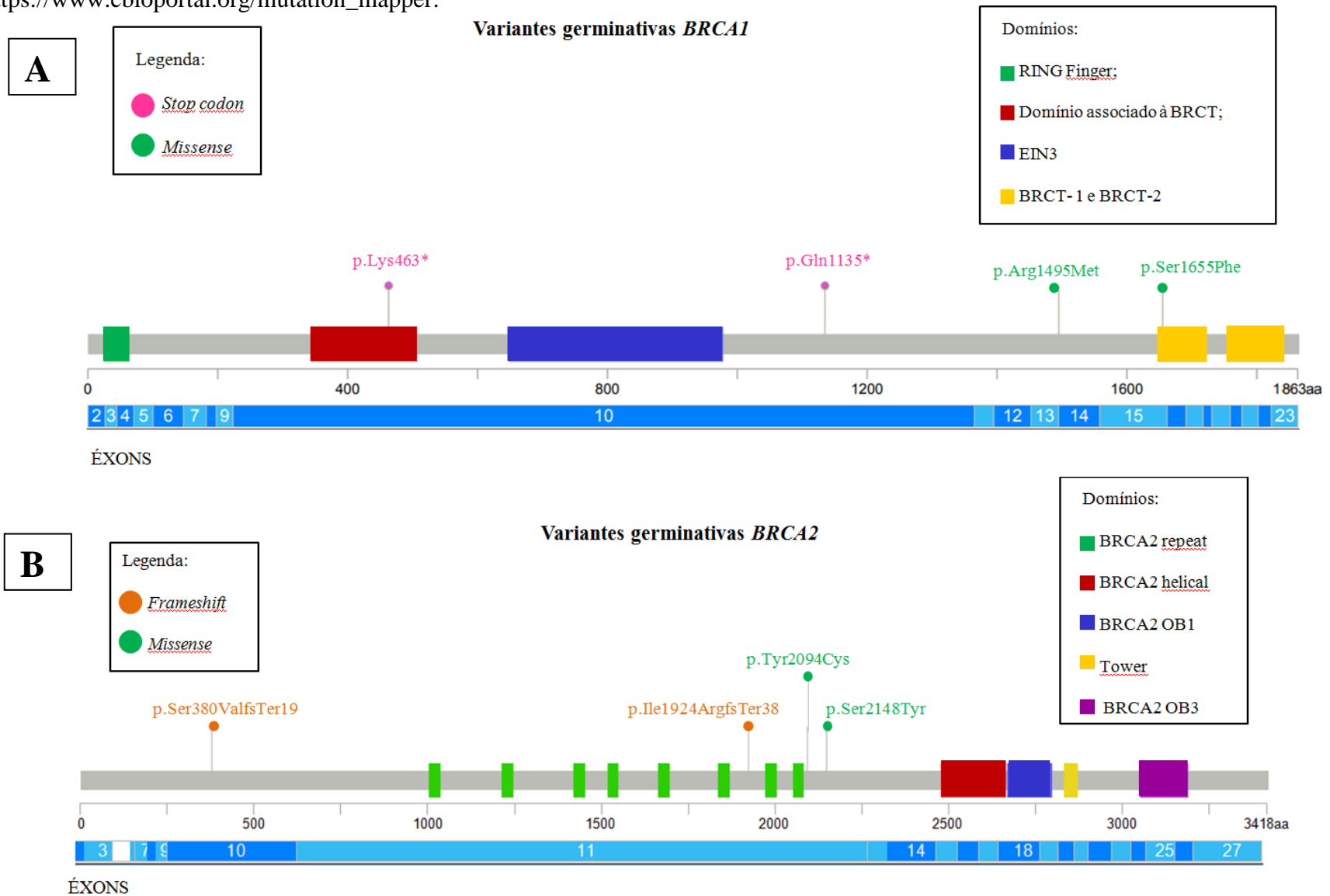
O gene *BRCA1* apresentou um total de 4 variantes germinativas com potencial patogênico e com significado clínico incerto (VUS), sendo 2 do tipo *stop codon* e 2 do tipo *missense*. As variantes *stop codon* corresponderam ao éxon 10 (c.784 até c.4209), considerado o maior dos 23 éxons do transcrito NM_007294.4 sendo que a variante (p.Lys463*).esteve situada no domínio associado ao domínio proteico BRCT. Com relação às variantes *missense*, p.Arg1495Met (c.4484G>T) foi localizada no éxon 14 do transcrito de referência e a variante p.Ser1655Phe (c.4964C>T) foi identificada no domínio “BRCT-1” (p.1642 até p.1736).

O gene *BRCA2* também apresentou 4 variantes germinativas consideradas 2 do tipo *missense* e 2 do tipo *frameshift*. As alterações do tipo como *missense* foram classificadas como 1 VUS e 1 com conflito de patogenicidade entre provavelmente benigna e VUS; enquanto que ambas as variantes *frameshift* são patogênicas. A variante p.Ser380ValfsTer19 foi localizada no éxon 10 (c.264 até c.636) do transcrito NM_000059.4 e as demais variantes p.Ile1924ArgfsTer38; p.Tyr2094Cys; p.Ser2148Tyr corresponderam às coordenadas do éxon 11 (c.636 até c.2280), conhecido como o maior éxon do transcrito referência de *BRCA2*.

Para o gene *TP53* não são apresentadas as variantes germinativas nas sequências codificantes, pelo fato de ter apresentado apenas variantes provavelmente benignas ou benignas, ou seja, sem a identificação de nenhuma alteração com potencial patogênico.

A figura 5.8 apresenta a localização ao longo dos transcritos de referência de *BRCA1* e *BRCA2* das variantes identificadas com potencial patogênico.

Figura 5.8: (A) Localização das variantes germinativas na sequência codificante de DNA. (A) Provavelmente patogênicas ou patogênicas e VUS para *BRCA1*. (B) VUS e com conflito de patogenicidade para *BRCA2*. Figuras criadas no *site* https://www.cbioportal.org/mutation_mapper.



5.7 Variantes somáticas de *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* nas sequências codificantes:

As variantes somáticas do gene *BRCA1* com potencial patogênico contabilizaram um total de 5 alterações, sendo 3 do tipo *frameshift* e 2 do tipo *missense*. As variantes *missense* foram classificadas como 1 patogênica e 1 como VUS sem depósito no ClinVar; enquanto as *frameshift* eram 2 patogênicas e 1 como VUS mas sem classificação no ClinVar. A variante *frameshift* p.Lys223ArgfsTer11 foi localizada no éxon 09 do transcrito NM_007294.4. A *missense* p.Lys651Arg, assim como as demais do tipo *frameshift* p.Gly1201GlufsTer11 e p.Glu880ArgfsTer13 se localizaram no éxon 10 do mesmo transcrito. A variante p.Gly1738Arg foi detectada no éxon 19 entre os domínios proteicos “BRCT-1” (p.1642 até p.1723) e “BRCT-2” (p.1756 até p.1855) (Figura 5.9 A).

Para o gene *BRCA2* foram identificadas 7 alterações somáticas com possível efeito patogênico, sendo 3 do tipo *missense*, 2 do tipo *frameshift* e 2 do tipo *stop codon*. As variantes *missense* foram classificadas como VUS, no entanto 1 destas não apresentou classificação depositada no ClinVar; já as variantes *frameshift* e 2 do tipo *stop codon* classificaram-se como patogênicas. A variante p.Glu510* foi identificada no éxon 10 do transcrito de referência NM_000059.4; as variantes p.Asn1287IlefsTer6 e p.Lys1821Arg foram detectadas no éxon 11 do mesmo transcrito. No domínio “BRCA2 OB1” (p.2670 até p.2799) foram localizadas as variantes p.Ser2670Pro; p.Lys2674Arg; p.Lys2674ArgfsTer2 (Figura 5.9 B).

No gene *TP53* foram identificadas 33 variantes somáticas com potencial patogênico, sendo 22 do tipo *missense*, 5 *stop codon*, 04 *frameshift*, 1 deleção *inframe* e 1 inserção *inframe*. As alterações *missense* foram classificadas em 17 provavelmente patogênicas ou patogênicas; 3 como VUS, 1 patogênica; 1 com conflito de patogenicidade entre patogênica e VUS. As variantes *stop codon* foram classificadas como 1 provavelmente patogênica ou patogênica; 1 sem classificação pelo ClinVar; 3 patogênicas. As alterações *frameshift* como 1 patogênica; 1 provavelmente patogênica e 2 como VUS sem classificação pelo ClinVar; já a deleção *inframe* como patogênica e a inserção *inframe* como VUS, mas sem depósito no ClinVar. A variante *stop codon* p.Trp91* foram identificadas no éxon 04 do transcrito NM_000546.6. As variantes *missense*, 2 *frameshift*, 3 *stop codon*, a deleção *inframe* e a inserção *inframe* localizaram-se no “P53 DNA binding domain” (p.95 até p.288). A variante *stop codon* p.Arg306* foi localizada no limite do éxon 08 com o éxon 09 do transcrito de referência; enquanto que a variante *frameshift* p.Leu330PhefsTer15 foi identificada no domínio “P53 tetramer” (p.318 até p.358) (Figura 5.10).

Figura 5.9: (A) Localização das variantes somáticas na sequência codificante de DNA. (A) Patogênicas e VUS para *BRCA1*. (B) Patogênicas e VUS para *BRCA2*. Figuras criadas no *site* https://www.cbioportal.org/mutation_mapper.

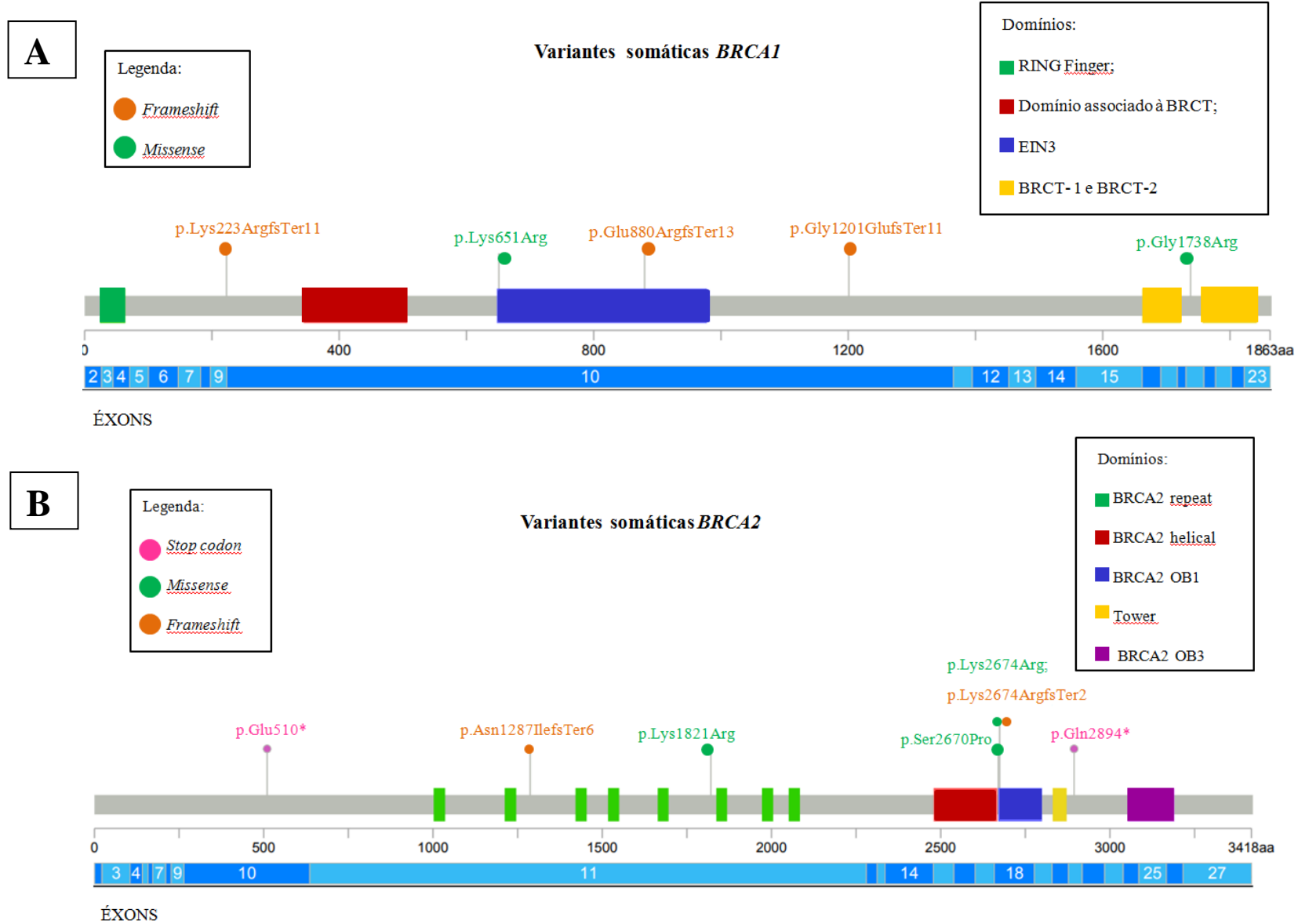
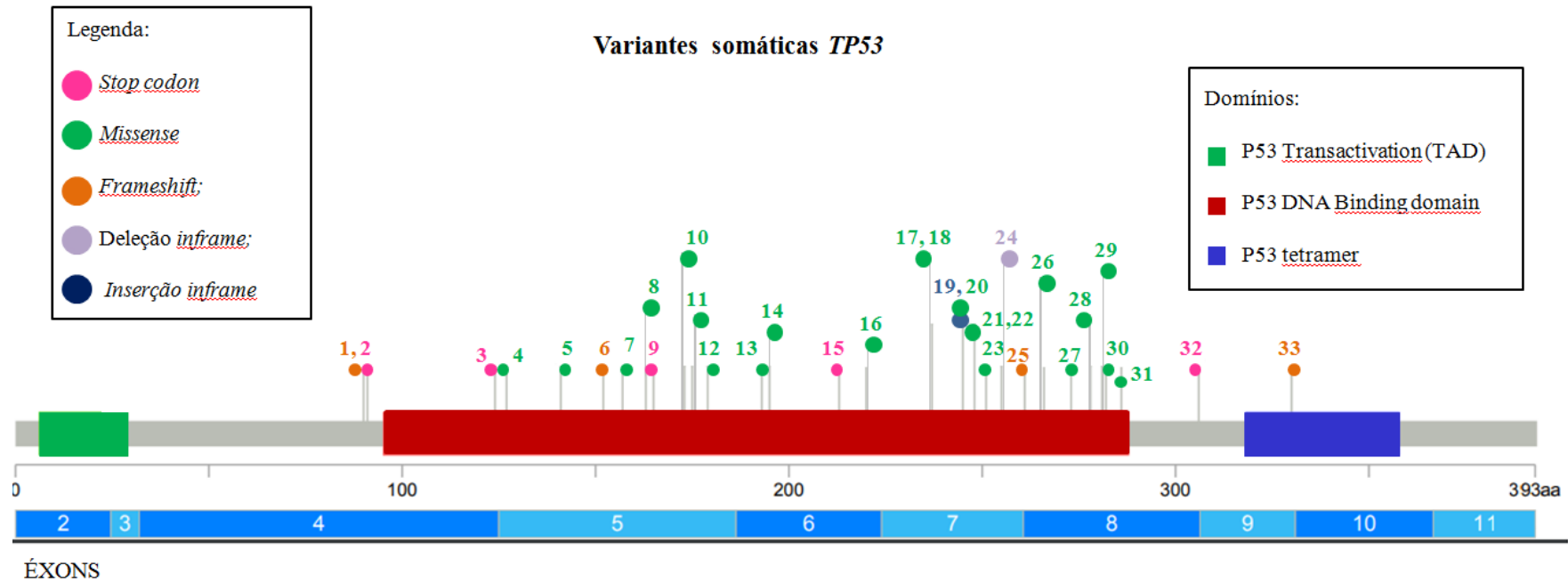


Figura 5.10: (A) Localização das variantes somáticas provavelmente patogênicas, patogênicas e VUS para *TP53* na sequência codificante de DNA. Figura criada no *site* https://www.cbioportal.org/mutation_mapper.



Legenda variantes:

- | | | | |
|------------------------|------------------|-------------------------------|------------------------|
| 1. p.Ser90ProfsTer3; | 8. p.Tyr163Cys; | 17. p.Met237Ile; | 26. p.Gly266Glu; |
| 2. p.Trp91*; | 9. p.Gln165*; | 18. p.Met237Lys; | 27. p.Arg273His; |
| 3. p.Cys124*; | 10. p.Val173Leu; | 19. p.Gly244_Gly245insHisAla; | 28. p.Pro278Leu; |
| 4. p.Ser127Phe; | 11. p.Arg175His; | 20. p.Gly245Ser; | 29. p.Asp281Val; |
| 5. p.Cys141Gly; | 12. p.His179Arg; | 21. p.Arg248Gln; | 30. p.Arg282Trp; |
| 6. p.Pro152ArgfsTer18; | 13. p.His193Arg; | 22. p.Arg248Trp; | 31. p.Glu286Lys; |
| 7. p.Val157Phe; | 14. p.Ile195Thr; | 23. p.Ile251Asn; | 32. p.Arg306*; |
| | 15. p.Arg213*; | 24. p.Ile255del; | 33. p.Leu330PhefsTer15 |
| | 16. p.Tyr220Cys; | 25. p.Ser261ValfsTer84; | |

5.8 Análise integrada das variantes germinativas e somáticas:

De todos os 56 casos de câncer de ovário do tipo epitelial analisados, 43 apresentaram variantes germinativas e também variantes somáticas nas respectivas amostras de tumor. Os demais 13 casos possuíam alterações germinativas ou somáticas, sendo que 01 amostra (caso 30) apresentou apenas uma variante somática e as demais 12 amostras (casos 13, 14, 18, 25, 29, 44, 45, 47, 53, 58, 59, 61) apresentaram apenas variantes germinativas. Dentre os 43 casos com variantes tanto a nível germinativo quanto somático, 07 destes possuíam variantes germinativas e somáticas, ou seja, em ambas as amostras pareadas foram identificadas com potencial patogênico. As variantes detectadas nos 7 casos mencionados foram classificadas como provavelmente patogênicas; patogênicas; VUS; variantes sem classificação depositada no ClinVar; variantes com conflito de patogenicidade entre patogênica e VUS.

Dentre todos os casos analisados, 13 pacientes não apresentaram variantes com indicação para perda de função alélica em nenhum dos genes investigados. A maioria destes casos (11/13) obteve variantes germinativas benignas e nenhuma variante somática; enquanto os demais 02 casos apresentaram variantes germinativas e somáticas benignas. Com relação às características clínico-patológicas, destaca-se a presença de casos (7/13) com o subtipo histológico de Adenocarcinoma/Cistoadenocarcinoma de Células Claras e a menor frequência de casos HGSOC (3/13). A representatividade tumoral foi igual a 100% para 5 casos, igual a 90% para 4 pacientes, 70% para 3 pacientes e 60% para 1 caso. A mediana de idade ao diagnóstico foi de 59 anos; o estadiamento tumoral equivaleu a 6 casos com estágio I, 4 com estágio III e 2 com estágio IV. O histórico familiar para a susceptibilidade genética a HBOC esteve presente em 4 casos e o número de óbitos foi equivalente a 6 dos 13 casos.

Com relação às pacientes que apresentaram variantes germinativas e somáticas (43/56), o subtipo histológico mais frequente foi o HGSOC com 30 casos, dos quais 18 apresentaram 100% de representatividade tumoral (RT); 02 com razão tumoral (RT) igual a 90%; 06 casos com RT de 80%; 03 casos com RT igual a 70% e 01 caso com RT de 60%. O segundo subtipo histológico mais encontrado foi o Cistoadenocarcinoma/Adenocarcinoma mucinoso com 06 casos, cujas RTs foram 03 casos com 100%; 01 caso com 90%; 01 caso com 80% e 01 caso com 60%. O Adenocarcinoma endometriode foi o terceiro subtipo histológico com 03 casos que obtiveram 100% de RT. Seguido de 02 casos de tumor misto de HGSOC e Adenocarcinoma de células claras, cada qual com 80% de RT correspondente ao subtipo histológico HGSOC e 10% com RT de Adenocarcinoma de células claras. Os demais dois

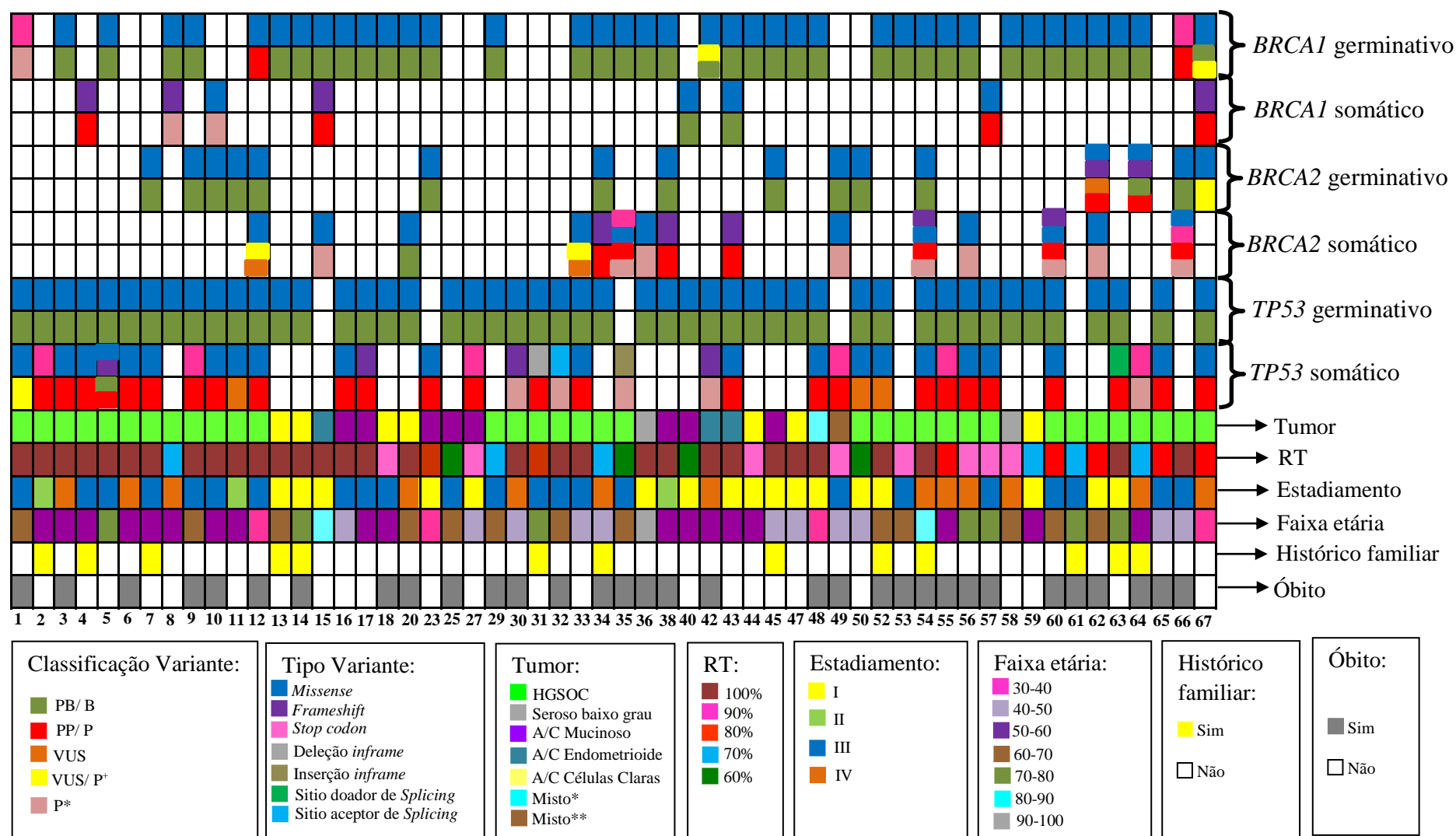
casos equivaleram aos subtipos histológicos Adenocarcinoma de células claras e Cistoadenocarcinoma/ Adenocarcinoma seroso de baixo grau, ambos com RT igual a 100%.

Para o grupo de 43 pacientes foram diagnosticados 04 casos no intervalo de 30 a 40 anos; 08 casos entre 40 e 50 anos; 15 casos entre 50 e 60 anos; 09 casos entre 60 e 70 anos; 04 casos entre 70 e 80 anos; 02 casos entre 80 e 90 anos e 01 caso diagnosticado aos 94 anos. Quanto ao estadiamento tumoral foram identificados 10 casos no estágio I; 03 casos no estágio II; 17 casos no estágio III e 12 casos no estágio IV. Dentre todos os casos identificados com variantes germinativas e somáticas foram registrados 24 óbitos.

Informações sobre histórico familiar relataram a presença em 24 casos de ao menos um parente afetado por câncer; sendo que 08 casos apresentaram dois ou mais parentes afetados de primeiro a terceiro grau. De todos os casos relatados com variantes germinativas e somáticas, 8 pacientes tinham familiares de primeiro e/ou segundo graus com tipos de câncer associados à síndrome hereditária HBOC e 1 paciente que possuiu um familiar de segundo grau com associação à síndrome de Li-Fraumeni. Dos casos com histórico familiar associado à HBOC, 01 apresentou familiar de primeiro grau de parentesco com câncer de ovário aos 40 anos; 07 possuíam parentes de segundo grau com neoplasias de mama, próstata, pâncreas ou ovário; 01 apresentou familiares afetados de primeiro e segundo graus.

A figura 5.11 apresenta por paciente todas as variantes germinativas e somáticas identificadas nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*; além das características clinico-patológicas (subtipo histológico, representatividade tumoral, estadiamento, faixa etária ao diagnóstico, histórico familiar e óbito).

Figura 5.11: Análise integrada das variantes germinativas e somáticas com as características clinico patológicas de cada paciente.



Legenda: Cada coluna resume as variantes germinativas e somáticas detectadas para cada paciente, assim como as características clinico-patológicas. A linha abaixo da tabela apresenta o código de cada amostra. O significado de cada cor está nos quadrados das legendas para cada categoria. PB/B provavelmente benigna/benigna; PP/P é provavelmente patogênica/patogênica; VUS/P⁺ é variante com conflito de classificação; P* variante sem classificação pelo ClinVar; RT significa representatividade tumoral.

6 DISCUSSÃO

6.1 Metodologia do sequenciamento em larga escala:

O uso de amostras de sangue juntamente com tecido de tumor fresco e congelado a -80°C, ao invés, de tecido em blocos de parafina (FFPE) foi o método de avaliação que permitiu um resultado com maior qualidade, uma vez que, o tecido em FFPE não conserva a integridade do DNA (WEREN *et al.*, 2016). A escolha do sequenciamento em larga escala (NGS) também foi a mais adequada para avaliar a carga mutacional de *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* das amostras pareadas de sangue e tumor. A metodologia NGS possibilita o sequenciamento simultâneo de diversos alvos em variadas amostras, sendo ideal para estudos sobre variantes germinativas e somáticas em câncer; além de viabilizar o sequenciamento de mais de um tipo de alteração como SNP e Indel (LUTHRA *et al.*, 2015).

O sequenciamento NGS comparado ao sequenciamento Sanger é um método com melhor custo-benefício, pelo fato de reduzir o rastreamento do material a um único procedimento. Enquanto o sequenciamento de Sanger resulta em uma profundidade de apenas 2 cópias (sentido direto e reverso) das amostras, o NGS sequencia clones moleculares da amostra, o que possibilita diversas leituras de uma única região. A estratégia de sequenciamento por NGS apresenta maior sensibilidade por detectar inúmeras mutações de base única (SNPs) e maior especificidade por reduzir artefatos de sequenciamento devido a erros introduzidos pela Taq polimerase (DE SCHRIJVER *et al.*, 2011).

O aprimoramento das técnicas de sequenciamento em larga escala juntamente com programas de análise por bioinformática, proporcionou a investigação de variantes pouco frequentes em amostras tumorais. Por conta da alta taxa de cobertura, esta técnica elimina o máximo de variantes falso positivas, que são consequência, por exemplo, da contaminação de tecido tumoral por células normais. A análise por NGS possui uma precisão capaz de detectar alterações verdadeiramente tumorais e assim ser uma ferramenta de auxílio para a prática clínica, ao desenvolvimento de terapias-alvo específicas (SHAW; MAITRA; 2019).

Devido a todas as questões explicitadas acima, que a metodologia por NGS ao invés do sequenciamento de Sanger foi aplicada neste estudo e resultou em uma cobertura média de 467.125 leituras nas amostras de tumor, além da detecção de frequências alélicas inferiores a 10%.

6.2 Eventos genéticos em câncer de ovário:

De todos os 56 casos analisados, em 7 pacientes foram identificadas variantes germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* com potencial patogênico, ou seja, variantes de significado incerto (VUS); variantes patogênicas; variantes com conflito de patogenicidade entre patogênica e VUS; e variante sem classificação pelo CliVar, mas possivelmente patogênica conforme critérios da ACMG. Houve a detecção de 09 variantes no total, sendo 04 diferentes alterações para cada gene e a variante c.5027C>T em *BRCA1* que foi encontrada em 2 pacientes. Neste estudo foi determinada em 13% (7/56) a prevalência de variantes patogênicas para portadores de mutações germinativas em *BRCA1/2*. Tal percentual se enquadra na variação de 2,3% a 20% da frequência de mutações para os genes *BRCA1/2*, mencionada por Silva et al. (2014), em mulheres brasileiras que se enquadram aos critérios de susceptibilidade genética à HBOC. As frequências de mutações germinativas patogênicas para *BRCA1* tendem a ser mais frequentes em comparação ao gene *BRCA2* (Maistro et al., 2016; Palmero et al., 2018); no entanto, encontramos aqui uma frequência similar entre *BRCA1* e *BRCA2*.

Em relação ao gene *TP53*, todas as alterações detectadas a nível germinativo foram benignas, sendo que a variante *missense* c.215C>G (p.Pro72Arg) esteve presente em 96% dos casos analisados, com frequências do alelo alternativo entre 51% a 100%. Tal polimorfismo apresenta altas frequências nas populações do norte europeu (80 a 85%) e, segundo Jeong et al. (2010), está em processo de fixação alélica dentro da população caucasiana. Segundo Dumont et al. (2003), esta substituição aumenta o potencial de apoptose celular por conta da troca pelo aminoácido Arginina favorecer a localização de p53 na mitocôndria. Alguns estudos analisaram a associação desta variante com o risco a variados tipos de câncer, dentre neoplasias ginecológicas como câncer de útero e endometrial; contudo permanece inconclusivo se a presença deste polimorfismo está ou não relacionado ao aumento do risco para câncer de ovário (UEDA et al., 2006; SCHILDKRAUT et al., 2009).

Os casos com variantes somáticas em *TP53* estão presentes em 85% (29/34) dos tumores do subtipo epitelial HGSOC, enquanto que as alterações em *BRCA1* em 15% (5/34) e 32% (11/34) para *BRCA2*. Estes resultados condizem aos dados de publicações anteriores que relatam sobre as maiores taxas de mutações somáticas ao gene *TP53*, percentuais que chegam a 96% (TCGA, 2011; PRAT et al., 2018). No entanto, as taxas das alterações somáticas para *BRCA1/2* contrastam dos demais estudos, os quais mencionam percentuais de 09% a 4,1% como Hennessy et al. (2010) que se baseou em ensaios de PCR quantitativa e de hibridização para a análise de perda de função alélica. Além de divergir também do estudo de Koczkowska

et al. (2016) que utilizou a metodologia NGS para avaliar variantes somáticas, mas com uma linha de corte de 4% na frequência alélica da variante. O uso de diferentes metodologias para avaliar a frequência mutacional em determinados genes como BRCA1/2 já contribuiu para a divergência dos resultados; no entanto, o mesmo ocorre em estudos que aplicam metodologias similares como o sequenciamento por NGS. Conforme Schrijver et al. (2010), tal fato pode ser reflexo das análises por bioinformática, pois um mesmo conjunto de dados pode ter diferentes resultados dependendo da forma de investigação das variantes, a exemplo do desenho do *pipeline* de análise, o uso dos diferentes filtros e linhas de corte para determinar as frequências alélicas nas amostras.

A verificação das frequências alélicas para as variantes somáticas patogênicas e VUS identificadas no gene *BRCA1*, constatou a perda de função alélica apenas da variante c.5212G>A (p.Gly1738Arg) na amostra de tumor. Tal variante obteve 80% de frequência do alelo alternativo nas células tumorais, um valor que se enquadra nos critérios que indicam a inativação do alelo de referência (JONSSON *et al.*, 2019). Esta mutação foi detectada no subtipo histológico HGSOC e com 90% de massa tumoral, sendo assim apresenta baixa taxa de contaminação com células normais e comprova a presença da alteração nos clones tumorais. As características histopatológicas do tumor confirmam o grau de pureza da amostra, o que, segundo Kanchi et al. (2014), é importante para evitar resultados falsos positivos e afirmar a susceptibilidade ao câncer de ovário. Esta variante *missense* foi associada ao maior risco de desenvolvimento do câncer de ovário, após a revisão do grau de patogenicidade da variante. Ensaios funcionais verificaram os efeitos deletérios desta alteração, por conta da localização na região C-terminal de *BRCA1*, entre os domínios BRCT-1 e BRCT-2, que desregula a ativação da transcrição proteica (CARVALHO *et al.*, 2007; EASTON *et al.*, 2007).

Para o gene *BRCA2* também houve a identificação da variante somática c.1528G>T (p.Glu510*), com possível perda de função alélica; já que a frequência do alelo alternativo no tumor equivaleu a 72%. Tal variante foi identificada em um caso com subtipo histológico HGSOC e representatividade tumoral de 60%, uma alteração que corresponde ao tipo *nonsense (stop codon)* e foi classificada como patogênica. A classificação dessa variante reflete o efeito deletério causado pela modificação p.Glu510*. Tal modificação gera um códon de terminação prematuro no éxon 10 de *BRCA2* que interrompe a tradução da proteína, resultando em um produto não funcional (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/51139/>).

Além da perda de função alélica por eventos somáticos, foi observada também a perda de heterozigidade (LOH) para as variantes germinativas de *BRCA1* c.1387A>T

(p.Lys463*), c.3403C>T (p.Gln1135*), c.4484G>T (p.Arg1495Met), c.4964C>T (p.Ser1655Phe) com potencial patogênico e todas localizadas no mesmo sítio da sequência referência na amostra de tumor. A indicação de LOH se deu através da avaliação das frequências alélicas nas amostras pareadas, a qual constatou o aumento na taxa do alelo alternativo ($\geq 80\%$) no tumor em relação ao sangue. Houve a identificação apenas nos casos de portadores de mutações germinativas para *BRCA1*, em casos de tumores epiteliais HGSOC, casos com RT de 80% a 100% e em estágios avançados de III a IV da doença; tais resultados corroboraram com os relatos de Rzepecka et al. (2012) sobre LOH. Assim como foi observado por Roy et al (2012), a perda do alelo de referência ocorreu, em todos os casos analisados, como resultado de mutação germinativa no gene *BRCA1* ou *BRCA2*, isto é não houve a detecção de variantes deletérias nos dois genes para um mesmo caso.

A variante c.1387A>T (p. Lys463*) apresentou LOH devido à frequência do alelo alternativo em 42% no sangue e 89% no tumor. Essa variante não apresenta classificação depositada no ClinVar e está localizada no domínio rico em Serina associado ao domínio BRCT, mas principalmente encontra-se também na região “Ovarian Cancer Cluster Region” (OCCR). A presença de uma mutação nesta região (c.670 até c.4096) está associada ao aumento no risco para câncer de ovário (REBBECK *et al.*, 2015); dessa forma o tipo da variante e a localização indicam a patogenicidade. Tal variante deve ser considerada como patogênica por gerar uma proteína truncada que favorece a predisposição e o risco ao câncer de ovário (RICHARDS *et al.*, 2015; SZABO *et al.*, 2004).

A variante c.3403C>T (p.Gln1135*) apresentou frequência do alelo alternativo em 52% no sangue e 86% no tumor, o que significa que esta variante pode causar LOH. Esta variante stop codon foi classificada como patogênica e localizada no éxon 10, o qual está inserido na região OCCR. Outra variante c.4484G>T (p.Arg1495Met) também foi indicada por promover LOH por ter a frequência do alelo alternativo em 43% no sangue e 84% no tumor. Tal variante *missense* foi classificada como patogênica e localizada no éxon 13 do transcrito de referência de *BRCA1*. Cotrim et al (2019) também detectou esta variante em uma análise sobre as mutações na população brasileira, contudo reclassificou a variante c.4484G>T como provavelmente patogênica.

A última considerada por ocasionar LOH foi c.4964C>T (p.Ser1655Phe), esta alteração foi identificada em um caso de Adenocarcinoma endometriode e em outro caso HGSOC. Apenas a amostra HGSOC apresentou frequências alélicas equivalentes à perda de heterozigossidade, sendo 51% para o alelo alternativo no sangue e 80% no tumor. Tal variante *missense* foi classificada com conflito de patogenicidade entre provavelmente patogênica e VUS, e localizada no domínio BRCT-1 da proteína *BRCA1*. Este domínio é fundamental para

a interação de BRCA1 com proteínas fosforiladas como Abraxas, BRIP1 e CtIP, interações que envolvem BRCA1 em um complexo para a ressecção da extremidade 5' no reparo de DSBs pela via HR (ROY *et al.*, 2012). Esta variante teve seu efeito deletério considerado moderado, após a análise funcional detectar que a alteração p.Ser1655Phe prejudica a transdução do sinal de dano ao DNA; pois não ocorre o reconhecimento do resíduo fosfoserina por seu peptídeo de ligação na região de repetição BRCT (LEE *et al.*, 2010).

A investigação de variantes somáticas nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* revelou 8 variantes novas, as quais não apresentam classificação depositada no ClinVar; a maioria foi identificada no gene *TP53* (5/8), seguida do gene *BRCA1* (2/8) e de *BRCA2* (1/8). As variantes c.3600_3619del e c.1952A>G (p.Lys651Arg) foram detectadas para o gene *BRCA1* em tumores do subtipo histológico HGSOC e com RT de 70% e 100%, respectivamente. A variante *frameshift* c.3600_3619del (p.Gly1201Glu>Ter11) foi localizada no éxon 10 do transcrito NM_007294.4, a qual foi predita como patogênica, segundo os critérios de classificação do *site* Varsome, por causar perda de função devido à deleção e não ser encontrada no banco de dados populacional gnomAD (<https://gnomad.broadinstitute.org/>). A predição da classificação está de acordo com as recomendações de patogenicidade acerca das alterações *frameshift* ou *nonsense*, que por resultarem em proteínas truncadas, elevam a predisposição ao câncer (RICHARDS *et al.*, 2015; SZABO *et al.*, 2004).

A segunda variante *missense* c.1952A>G (p.Lys651Arg) foi localizada também no éxon 10 e considerada como VUS pelo Varsome por não ser identificada no gnomAD e ser classificada como benigna por alguns programas de predição *in silico*. Como forma de esclarecer o significado incerto de variantes *missense* em BRCA1 seriam necessários ensaios funcionais a fim de verificar o impacto da variante na estrutura e dinâmica celular (FINDLAY *et al.*, 2018). Desse modo, essa variante *missense* poderia ter melhor definição quanto à indicação da classificação como VUS.

Para o gene *BRCA2* foi identificada a nova variante c.8021A>G (p.Lys2674Arg), a qual esteve presente em 11 casos dos subtipos histológicos HGSOC, Adenocarcinoma epitelial seroso de baixo grau, Adenocarcinoma endometriode, tumor misto (HGSOC e células claras) e com RT de 60% e 100%. Essa variante *missense* foi predita pelo Varsome com conflito de patogenicidade entre provavelmente patogênica e VUS, pelo fato de não ser detectada no gnomAD e ser classificada como patogênica por programas de predição *in silico*. A variante foi identificada no domínio BRCA2-OB1, o qual está localizado na região BRCA2 C-terminal e apresenta a função de ligação com alta afinidade a quebras de fita simples ou dupla de DNA (SPUGNESI *et al.*, 2013). Esta variante também é indicada ao ensaio funcional,

principalmente para a análise do efeito da alteração no domínio funcional e do potencial tumorigênico.

As novas variantes somáticas detectadas no gene *TP53* foram do tipo *frameshift*, substituição no de sítio de *splicing* doador, deleção *inframe* e *stop codon*. Tais alterações foram detectadas em 5 diferentes casos dos subtipos histológicos HGSOC (4/5) e Adenocarcinoma endometriode (1/6) e com RT variando de 60% a 100%. Segundo Garziera et al (2018), as mutações somática para *TP53* são mais frequentes em casos HGSOC e todas as variantes estão na região conservada do domínio de ligação ao DNA, entre os éxon 04 a 09.

A variante *stop codon* c.272G>A (p.Trp91*) foi localizada no éxon 04 do transcrito de referência, antes do domínio principal da proteína “P53 DNA binding domain”. Tal alteração foi classificada como patogênica pelo Varsome por gerar uma proteína truncada, não ter registro no gnomAD e ter predição *in silico* de variante patogênica. A variante *frameshift* c.780del (p.Ser261ValfsTer84) e a inserção *inframe* c.732_733insCATGCG (p.Gly244_Gly245insHisAla) foram localizadas no “P53 DNA binding domain”, tal domínio é capaz de ligar à regiões específicas do DNA e, por conseguinte, ativar a transcrição de genes envolvidos no ciclo celular e na resposta ao stress genômico (CHO *et al.*, 1994). A classificação do Varsome para a variante *frameshift* foi patogênica e para a inserção *inframe* foi provavelmente patogênica, de acordo com os mesmos critérios utilizados para a definição da variante *stop codon*.

A variante *frameshift* c.988del (p.Leu330PhefsTer15) foi classificada como patogênica pelo Varsome e identificada no domínio de tetramerização de p53, que está relacionado com a oligomerização da proteína. Kato et al. (2003) relatou sobre o ensaio funcional que constatou o efeito da inativação do transcrito devido à substituições de aminoácidos em alguns sítios na região C-terminal da proteína, dentre os sítios citados está o códon de substituição (Leu330) da variante em questão. Tal dado reforça a patogenicidade da variante não apenas por causar uma modificação na matriz de leitura e adicionar um códon de terminação, mas também pela posição da variante na proteína. A variante c.559+2T>G localizada em sítio doador de *splicing* no íntron 05 e classificada pelo Varsome como patogênica. Esta classificação também se enquadra no critério PVS1 da ACMG, o qual define como patogênica a variante em sítios canônicos de *splicing*; por resultar na ausência ou alteração do produto proteico (RICHARDS *et al.*, 2015).

Dentre todos os casos analisados com variantes somáticas em *TP53*, foi observado em 13 pacientes que cada uma apresentou frequências dos alelos alternativos $\geq 70\%$ para variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas ou VUS ou variante sem classificação, mas com indicação de patogenicidade. Com relação às características clínico-patológicas, a

maioria dos casos correspondeu ao subtipo histológico HGSOC, apresentou RT igual a 100%, tumor em estágio avançado (III-IV) e apenas duas pacientes possuíam histórico familiar referente à HBOC. Por nenhum caso ter apresentado variante germinativa com potencial patogênico, presumiu-se que as alterações somáticas neste gene seriam *drivers* da tumorigênese. Tal hipótese foi baseada no conhecimento das elevadas taxas de mutações em *TP53* nos casos de câncer de ovário, além da possibilidade de alterações neste gene serem precursoras na transformação de lesões pré-malignas do epitélio da tuba de falópio ou da superfície do epitélio ovariano (ZHANG *et al.*, 2019). Dados sugerem que modificações em tal epitélio sejam responsáveis pela maioria das neoplasias HGSOC, favorecendo o início da tumorigênese devido expansão clonal de mutações em *TP53* (WU *et al.*, 2013).

Além das evidências citadas, no presente estudo foi identificada a variante somática *missense* c.818G>A (R273H) em *TP53*, uma substituição frequentemente detectada em diversos tipos de tumor e resulta no efeito da perda de função alélica (WU *et al.*, 2013). Tal variante correspondeu a 95% de frequência do alelo alternativo em uma amostra do subtipo histológico Adenocarcinoma mucinoso, com 100% RT, tumor em estágio III e sem histórico familiar; um exemplo que pode indicar que seja uma mutação *driver*.

Contudo os estudos acerca de mutações *drivers* e *passengers* em *TP53* permanecem um desafio, visto que tal gene regula a transcrição de uma extensa gama de genes e influencia diversas vias metabólicas. Dessa forma, alterações neste gene são submetidas ao longo do processo tumorigênico a múltiplas pressões seletivas que dependem da especificidade do tecido de origem do tumor (LEROY *et al.*, 2014). A questão da interação tecido específico gera uma intra e inter heterogeneidade tumoral, que impacta na patogenicidade molecular, no prognóstico, no tipo e resposta ao tratamento (ZHANG *et al.*, 2019).

A terapia alvo para pacientes com mutações em *TP53* permanece mais em fase investigatória, ao contrário dos portadores de mutações germinativas em *BRCA1/2*, para os quais a aplicação da terapia com iPARP está bem estabelecida. A partir do conceito de letalidade sintética, tal terapia é indicada para casos de resistência a quimioterapia com platina ou de recidiva da doença (FONG *et al.*, 2009; KAUFMAN *et al.*, 2015). Para os casos com mutações somáticas existem estudos clínicos que analisam a administração de iPARP com a resposta ao tratamento e a sobrevida da paciente (Hennessy *et al.*, 2010). Algumas investigações relatam o benefício clínico dos portadores de mutações somáticas com o uso de iPARP e que as respostas ao tratamento são similares entre casos com alterações germinativas ou somáticas (FARAONI; GRAZIANI, 2018). De acordo com tais resultados, as pacientes detectadas, pelo presente estudo, com mutações somáticas em *BRCA1/2* poderiam se beneficiar com a terapia alvo de iPARP, pois a maioria dos casos são HGSOC e apresentam

100% de representatividade no tumor e assim, baixos índices de contaminação por células normais.

As frequências do alelo alternativo identificadas, no percentual estimado de massa tumoral por amostra, foram abaixo de 10% em 25 das 27 amostras e apenas as demais amostras apresentaram 72% e 80% do alelo alternativo. Tais proporções entre alelo alternativo e alelo de referência não permitiram a avaliação da perda de função alélica, mas não é possível confirmar que todas as transformações neoplásicas destas amostras ocorreram exclusivamente a partir das variantes detectadas. Os carcinomas de ovário apresentam alta heterogeneidade tumoral, ou seja, toda a composição neoplásica está associada aos clones tumorais que conferem a morfologia, a carga genética, a taxa mutacional, dentre outras características biológicas (KHALIQUE *et al.*, 2007). Além da concepção sobre clones tumorais, no processo da tumorigênese há também a evolução clonal, que sofre seleção natural durante, por exemplo, a quimioterapia. Tratamentos clínicos resultam na expansão de clones com vantagens mutacionais em detrimento de alterações não benéficas ao desenvolvimento tumoral (COOKE *et al.*, 2009). Tais questões mencionadas podem explicar as baixas frequências alélicas nas amostras, as quais são reflexos de um tempo e espaço na evolução tumoral.

6.3 Limitações do estudo:

O isolamento do material genético de fragmentos da peça cirúrgica completa, com peso entre 20mg e 150mg, restringiu a identificação de variantes somáticas ao nível de alterações presentes apenas na porção selecionada do tumor. De forma que, provavelmente, não ocorreu a detecção de variantes que poderiam ser fundamentais ao processo de tumorigênese da amostra analisada. No presente estudo, a estimativa da representatividade tumoral ($\geq 70\%$) visou minimizar o fator da contaminação da amostra por células normais, já que a seleção do fragmento analisado não ocorreu através da técnica de microdissecção.

O presente estudo abordou variantes genéticas germinativas e somáticas nos genes frequentemente modificados em câncer de ovário, mutações identificadas por um painel gênico customizado para *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*. Contudo, as neoplasias de ovário são constituídas por uma variedade de mutações em diversos outros genes envolvidos tanto na via de recombinação homóloga como em demais vias de reparo. O conceito *BRCAness* aplica-se ao tumor que exibe fenótipo de mutação germinativa em *BRCA1* ou *BRCA2* e sensibilidade aos inibidores de PARP, mas que apresenta variantes somáticas em outros genes como *ATM*,

ATR, CHEK1, CHEK2, RAD51, NBS1 e o genes da Anemia Fanconi (LORD; ASHWORTH, 2017).

A origem do câncer de ovário não ocorre apenas pelos eventos genéticos de mutações germinativas e somáticas em regiões exônicas como abordado neste estudo, mas também por outros mecanismos genéticos e epigenéticos como: (i) modificações nas regiões regulatórias do gene podem alterar o transcrito e direcioná-lo a via de decaimento do RNA (SZABO *et al.*, 2004); (ii) assim como a hipermetilação do promotor de *BRCA1* nas ilhas CpG que diminui a expressão do gene (BIANCO *et al.*, 2000); e (iii) grandes rearranjos genômicos (LRGs), que são deleções ou duplicações parciais e/ou completas de éxons nos genes *BRCA1, BRCA2* e *TP53*, as quais afetam a estrutura e as funções proteicas (EWALD *et al.*, 2009).

7 CONCLUSÃO

Este trabalho foi um dos poucos a realizar uma análise integrada de variantes germinativas e somáticas para os genes *BRCA1, BRCA2* e *TP53* em casos de câncer de ovário epitelial na população brasileira. A metodologia por NGS possibilitou o sequenciamento simultâneo dos casos de forma pareada, como também a detecção de baixas frequências alélicas presentes nas amostras de tumor. O algoritmo *Mutect2* utilizado na análise por bioinformática foi adequado para a identificação de variantes verdadeiramente somáticas, o que reduziu a possibilidade de falsos positivos.

As amostras de sangue analisadas apresentaram um total de 112 variantes germinativas para as regiões exônicas dos genes analisados, sendo detectadas 45 variantes para *BRCA1*, 20 para o gene *BRCA2* e 47 para *TP53*. As variantes germinativas com indicativa perda de função contabilizaram 5 para o gene *BRCA1*, 4 para *BRCA2* e nenhuma para o gene *TP53*. O total de variantes somáticas foi de 70 para os genes investigados, sendo 68 variantes exônicas e 2 intrônicas; para o gene *BRCA1* foram identificadas 11 variantes, 22 para o gene *BRCA2* e 37 para *TP53*. A indicação de perda de função ocorreu para 6 variantes em *BRCA1*, 14 variantes em *BRCA2* e 35 em *TP53*.

As pacientes com variantes de origem germinativa e indicativas de perda de função apresentaram, em sua maioria, o subtipo histológico HGSOC com 80 a 100% de representatividade tumoral; estadiamento tumoral avançado e sem histórico familiar ou pessoal. Em relação aos casos com variantes de origem somática, o subtipo HGSOC também correspondeu à maioria dos casos; a representatividade tumoral variou de 60 a 80%; estadiamento tumoral de I a IV e apenas 4 dos 42 casos apresentou histórico familiar.

A comparação das características clinico-patológicas entre os casos com variantes indicativas de perda de função e as pacientes sem variante com este tipo de efeito, destacou a associação do grupo, que não apresentou variantes de perda de função, com o subtipo histológico Adenocarcinoma/Cistoadenocarcinoma de Células Claras e com estágio I da doença. Tais características contrastam com a predominância do subtipo histológico HGSOC e o estadiamento tumoral avançado para casos com variantes indicativas de perda de função.

Como futuras perspectivas, haverá a confirmação das variantes patogênicas pelo sequenciamento de Sanger e também a quantificação destas por PCR em tempo real. Além disso, as respostas das pacientes ao tratamento serão avaliadas a fim de se realizar as análises de sobrevida livre de doença e sobrevida global.

8 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; MORGAN, D.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **The Cell**. Ed. Garland Science, 6ª edição, 1465p.;

ALSOP, K., FEREDAY, S., MELDRUM, C., DEFAZIO, A., EMMANUEL, C., GEORGE, J., DOBROVIC, A., BIRRER, M. J., WEBB, P. M., STEWART, C., FRIEDLANDER, M., FOX, S., BOWTELL, D., & MITCHELL, G. (2012). **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*, 30(21), 2654–2663. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.8545>;

ANTONIOU; P. D. P. PHAROAH, NAROD, H. A. RISCH, J. E. EYFJORD, J. L. HOPPER, N. LOMAN, H. OLSSON, O. JOHANNSSON, A BORG, B. PASINI, P. RADICE, S.MANOUKIAN, D. M. ECCLES, N. TANG, E. OLAH,H. ANTON-CULVER, E. WARNER, J. LUBINSKI, J. GRONWALD,B; GORSKI; TULINIUS; S. THORLACIUS; H. EEROLA; H. NEVANLINNA; SYRJA`KOSKI; O.-P. KALLIONIEMI; D. THOMPSON; C. EVANS, J. PETO, F. LALLOO, D. G. EVANS.; D. F. EASTON. (2003). **Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: A combined analysis of 22 studies**. *American Journal of Human Genetics*, 73(3), 709. <https://doi.org/10.1086/377592>;

AUNOBLE, B., SANCHES, R., DIDIER, E., & BIGNON, Y. J. (2000). **Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer (review)**. *International journal of oncology*, 16(3), 567–576. <https://doi.org/10.3892/ijo.16.3.567>;

BEKKER-JENSEN, S.;MAILAND, N. (2010) **Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells**. *DNA Repair*, 9 1219–1228;

BENJAMIN, D., SATO, T., CIBULSKIS, K., GETZ, G., STEWART, C., & LICHTENSTEIN, L. (2019). **Calling Somatic SNVs and Indels with Mutect2**. bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/861054>;

BENJAMIN,D; SATO, T; LICHTENSTEIN, L; SHAND, M. (2021). **Notes on Mutect2**. Disponível em: <https://github.com/broadinstitute/gatk/blob/master/docs/mutect/mutect.pdf>. Acessado em: 21/09/2021;

BIANCO, T., CAWALSH, D., ECOOPER, J., & DOBROVIC, A. (2000). **Tumour-specific distribution of BRCA1 promoter region methylation supports a pathogenetic role in breast and ovarian cancer**. *Carcinogenesis*, 21(2), 147–151;

BOLTON, K. L., GANDA, C., BERCHUCK, A., PHARAOH, P. D. P., GAYTHER, S. A. (2012). **Role of common genetic variants in ovarian cancer susceptibility and outcome: Progress to date from the ovarian cancer association consortium (OCAC)**. *Journal of Internal Medicine*, 271(4), 366–378. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2011.02509.x>;

BOYARSKIKH, U. A., GULYAEVA, L. F., AVDALYAN, A. M., KECHIN, A. A., KHRAPOV, E. A., LAZAREVA, D. G., KUSHLINSKII, N. E., MELKONYAN, A.,

ARAKELYAN, A., FILIPENKO, M. L. (2020). **Spectrum of TP53 Mutations in BRCA1/2 Associated High-Grade Serous Ovarian Cancer**. *Frontiers in Oncology*, 10(July), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01103>;

BROSE, M. S., REBBECK, T. R., CALZONE, K. A., STOPFER, J. E., NATHANSON, K. L., & WEBER, B. L. (2002). **Cancer risk estimates for BCRA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program**. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(18), 1365–1372. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.18.1365>;

BRUNET JS; NAROD AS; TONIN P ; FOULKES WD . (1997). **BRCA1 mutations and survival in women with ovarian cancer**. *N Engl J Med*; 336:1256;

BULLER, R.E., SHAHIN, M.S., GEISLER, J.P., ZOGG, M., DE YOUNG, B.R., DAVIS, C.S.. (2002). **Failure of BRCA1 dysfunction to alter ovarian cancer survival**. *Clin Cancer Res*; 8:1196–1202;

BYRD,M; SHENTON, A; MAHER, E; WOODWARD, E; BELK, R; LIM, C; LALLOO, F; HOWELL, ANTHONY G; JAYSON, G; EVANS; G. (2008). **Better life expectancy in women with BRCA2 compared with BRCA1 mutations is attributable to lower frequency and later onset of ovarian cancer**. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*;17:1535–1542,.

BYRUM, A. K., VINDIGNI, A., & MOSAMMAPARAST, N. (2019). **Defining and Modulating ‘BRCAness’**. *Trends in Cell Biology*, 29(9), 740–751. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.06.005>;

CANNISTRA, SA. (1997). **BRCA1 mutations and survival in women with ovarian cancer**. *N Engl J Med*;17:1254,.

CARVALHO, M. A., COUCH, F. J., & MONTEIRO, A. N. A. (2007). **Functional assays for BRCA1 and BRCA2**. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(2), 298–310. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.08.002>;

CARVALHO, M. A., MARSILLAC, S. M., KARCHIN, R., MANOUKIAN, S., GRIST, S., SWABY, R. F., URMENYI, T. P., RONDINELLI, E., SILVA, R., GAYOL, L., BAUMBACH, L., SUTPHEN, R., PICKARD-BRZOSOWICZ, J. L., NATHANSON, K. L., SALI, A., GOLDGAR, D., COUCH, F. J., RADICE, P., & MONTEIRO, A. N. A. (2007). **Determination of cancer risk associated with germ line BRCA1 missense variants by functional analysis**. *Cancer Research*, 67(4), 1494–1501. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3297>;

CHANDRA, A., PIUS, C., NABEEL, M., NAIR, M., VISHWANATHA, J. K., AHMAD, S., & BASHA, R. (2019). **Ovarian cancer: Current status and strategies for improving therapeutic outcomes**. *Cancer Medicine*, 8(16), 7018–7031. <https://doi.org/10.1002/cam4.2560>;

CHATTERJEE , N.; WALKER, C.G. (2017). **Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis**. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5): 235-263, doi: 10.1002/em.22087;

- CHO, Y., GORINA, S., JEFFREY, P. D., & PAVLETICH, N. P. (1994). **Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: Understanding tumorigenic mutations.** *Science*, 265(5170), 346–355. <https://doi.org/10.1126/science.8023157>;
- CIBULSKIS, K., LAWRENCE, M. S., CARTER, S. L., SIVACHENKO, A., JAFFE, D., SOUGNEZ, C., GABRIEL, S., MEYERSON, M., LANDER, E. S., & GETZ, G. (2013). **Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples.** *Nature Biotechnology*, 31(3), 213–219. <https://doi.org/10.1038/nbt.2514>;
- CLARK; RODRIGUEZ; RUSSELL; HANKIN; BOEHNING. (2012). **Structure-Function of the Tumor Suppressor BRCA1.** *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 1;
- COOKE, S. L., NG, C. K. Y., MELNYK, N., GARCIA, M. J., HARDCASTLE, T., TEMPLE, J., LANGDON, S., HUNTSMAN, D., & BRENTON, J. D. (2010). **Genomic analysis of genetic heterogeneity and evolution in high-grade serous ovarian carcinoma.** *Oncogene*, 29(35), 4905–4913. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.245>;
- COTRIM, D. P., RIBEIRO, A. R. G., PAIXÃO, D., DE QUEIROZ SOARES, D. C., JBILI, R., PANDOLFI, N. C., CEZANA, C., DE CÁSSIA MAURO, C., MANTOAN, H., BOVOLIM, G., DE BROT, L., TORREZAN, G. T., CARRARO, D. M., BAIOCCHI, G., DA CRUZ FORMIGA, M. N., & DA COSTA, A. A. B. A. (2019). **Prevalence of BRCA1 and BRCA2 pathogenic and likely pathogenic variants in non-selected ovarian carcinoma patients in Brazil.** *BMC Cancer*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-5235-3>;
- COUCH, F. J., SHIMELIS, H., HU, C., HART, S. N., POLLEY, E. C., NA, J., HALLBERG, E., MOORE, R., THOMAS, A., LILYQUIST, J., FENG, B., MCFARLAND, R., PESARAN, T., HUETHER, R., LADUCA, H., CHAO, E. C., GOLDFAR, D. E., DOLINSKY, J. S. (2017). **Associations between cancer predisposition testing panel genes and breast cancer.** *JAMA Oncology*, 3(9), 1190–1196. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.0424>;
- DALEY, J.M.;SUNG, P. (2014). **53BP1, BRCA1, and the Choice between Recombination and End Joining at DNA Double-Strand Breaks.** *Molecular and Cellular Biology*, v. 34 (8), p. 1380–1388;
- DE LEENEER, K., HELLEMANS, J., DE SCHRIJVER, J., BAETENS, M., POPPE, B., VAN CRIEKINGE, W., DE PAEPE, A., COUCKE, P., & CLAES, K. (2011). **Massive parallel amplicon sequencing of the breast cancer genes BRCA1 and BRCA2: Opportunities, challenges, and limitations.** *Human Mutation*, 32(3), 335–344. <https://doi.org/10.1002/humu.21428>;
- DEL VALLE, J., ROFES, P., MORENO-CABRERA, J. M., LÓPEZ-DÓRIGA, A., BELHADJ, S., VARGAS-PARRA, G., TEULÉ, À., CUESTA, R., MUÑOZ, X., CAMPOS, O., SALINAS, M., DE CID, R., BRUNET, J., GONZÁLEZ, S., CAPELLÁ, G., PINEDA, M., FELIUBADALÓ, L., LÁZARO, C. (2020). **Exploring the role of mutations in fanconi anemia genes in hereditary cancer patients.** *Cancers*, 12(4), 1–10. <https://doi.org/10.3390/cancers12040829>;

DENSHAM, M.; MORRIS, J. (2019). **Moving Mountains—The BRCA1 Promotion of DNA Resection.** *Frontiers in Molecular Biosciences*, Volume 6 | Article 79;

DION, L.; CARTON, I.; JAILLARD, S.; TIMOH, K. N.; HENNO, S.; SARDAIN, H., FOUCHER, F.; LEVÊQUE, J.; ROUGE, T; DE LA M.; BROUSSE, S.; LAVOUÉ, V. (2020). **The landscape and therapeutic implications of molecular profiles in epithelial ovarian cancer.** *Journal of Clinical Medicine*, 9(7), 1–12. <https://doi.org/10.3390/jcm9072239>;

DUMONT, P., LEU, J. I. J., DELLA PIETRA, A. C., GEORGE, D. L., & MURPHY, M. (2003). **The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential.** *Nature Genetics*, 33(3), 357–365. <https://doi.org/10.1038/ng1093>;

Dumont, P., Leu, J. I. J., Della Pietra, A. C., George, D. L., & Murphy, M. (2003). **The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential.** *Nature Genetics*, 33(3), 357–365. <https://doi.org/10.1038/ng1093>;

EASTON, D. F., BISHOP, D. T., FORD, D., CROCKFORD, G. P., HAITES, N., MILNER, B., ALLAN, L., KING, M. C., BOWCOCK, A., ANDERSON, L., EASTON, D. F., PONDER, B. A. J., PETO, J., SMITH, S., ANDERSON, K., FORD, D., STRATTON, M., SOBOL, H., & MAZOYER, S. (1993). **Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: Results from 214 families.** *American Journal of Human Genetics*, 52(4), 678–701;

EASTON, D. F., DEFFENBAUGH, A. M., PRUSS, D., FRYE, C., WENSTRUP, R. J., ALLEN-BRADY, K., TAVTIGIAN, S. V., MONTEIRO, A. N. A., IVERSEN, E. S., COUCH, F. J., & GOLDFAR, D. E. (2007). **A systematic genetic assessment of 1,433 sequence variants of unknown clinical significance in the BRCA1 and BRCA2 breast cancer-predisposition genes.** *American Journal of Human Genetics*, 81(5), 873–883. <https://doi.org/10.1086/521032>;

EASTON, D. F., FORD, D., BISHOP, D. T., HAITES, N., MILNER, B., ALLAN, L., EASTON, D. F., PONDER, B. A. J., PETO, J., SMITH, S., FORD, D., STRATTON, M., NAROD, S. A., LENOIR, G. M., FEUNTEUN, J., LYNCH, H., ARASON, A., BARKARDOTTIR, R., EGILSSON, V. (1995). **Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers.** *American Journal of Human Genetics*, 56(1), 265–271;

EWALD, I. P., COSSIO, S. L., PALMERO, E. I., PINHEIRO, M., NASCIMENTO, I. L. DE O., MACHADO, T. M. B., SANDES, K. A., TORALLES, B., GARICOCHEA, B., IZETTI, P., PEREIRA, M. L. S., BOCK, H., VARGAS, F. R., MOREIRA, M. Â. M., PEIXOTO, A., TEIXEIRA, M. R., & ASHTON-PROLLA, P. (2016). **BRCA1 and BRCA2 rearrangements in Brazilian individuals with hereditary breast and ovarian cancer syndrome.** *Genetics and Molecular Biology*, 39(2), 223–231. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2014-0350>;

EWALD, I. P., RIBEIRO, P. L. I., PALMERO, E. I., COSSIO, S. L., GIUGLIANI, R., & ASHTON-PROLLA, P. (2009). **Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2: A**

literature review. *Genetics and Molecular Biology*, 32(3), 437–446.
<https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000049>;

FADARE, O.; PARKASH, V. (2019). **Pathology of Endometrioid and Clear Cell Carcinoma of the Ovary.** *Surgical Pathology Clinics*, 12(2), 529–564.
<https://doi.org/10.1016/j.path.2019.01.009>;

FANALE, D., FIORINO, A., INCORVAIA, L., DIMINO, A., FILORIZZO, C., BONO, M., CANCELLIERE, D., CALÒ, V., BRANDO, C., CORSINI, L. R., SCIACCHITANO, R., MAGRIN, L., PIVETTI, A., PEDONE, E., MADONIA, G., CUCINELLA, A., BADALAMENTI, G., RUSSO, A., BAZAN, V. (2021). **Prevalence and Spectrum of Germline BRCA1 and BRCA2 Variants of Uncertain Significance in Breast/Ovarian Cancer: Mysterious Signals From the Genome.** *Frontiers in Oncology*, 11(June), 1–12;

FARAONI, I., & GRAZIANI, G. (2018). **Role of BRCA mutations in cancer treatment with poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors.** *Cancers*, 10(12):487
<https://doi.org/10.3390/cancers10120487>;

FARMER, H., MCCABE, H., LORD, C. J., TUTT, A. H. J., JOHNSON, D. A., RICHARDSON, T. B., SANTAROSA, M., DILLON, K. J., HICKSON, I., KNIGHTS, C., MARTIN, N. M. B., JACKSON, S. P., SMITH, G. C. M., & ASHWORTH, A. (2005). **Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy.** *Nature*, 434(7035), 917–921. <https://doi.org/10.1038/nature03445>;

FERLA, R., CALÒ, V., CASCIO, S., RINALDI, G., BADALAMENTI, G., CARRECA, I., SURMACZ, E., COLUCCI, G., BAZAN, V., & RUSSO, A. (2007). **Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes.** *Annals of Oncology*, 18(SUPPL. 6), 93–98.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdm234>;

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D. M.; FORMAN, D.; BRAY, F. (2015). **Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.** *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>;

FINDLAY, G. M., DAZA, R. M., MARTIN, B., ZHANG, M. D., LEITH, A. P., GASPERINI, M., JANIZEK, J. D., HUANG, X., STARITA, L. M., & SHENDURE, J. (2018). **Accurate classification of BRCA1 variants with saturation genome editing.** *Nature*, 562(7726), 217–222. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0461-z>;

FONG, P.; BOSS, D.; YAP, T.; TUTT, A.; WU, P.; MERGUI-ROELVINK, M.; PETER MORTIMER, P.; SWAISLAND, H.; LAU, A.; CONNOR, M.; ASHWORTH, A.; CARMICHAEL, J.; KAYE, S.; SCHELLENS,; BONO, J. (2009). **Inhibition of Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Tumors from BRCA Mutation Carriers.** *The New England Journal of Medicine*, 361, V.2;

FOOTE, J. R., LOPEZ-ACEVEDO, M., BUCHANAN, A. H., SECORD, A. A., LEE, P. S., FOUNTAIN, C., MYERS, E. R., COHN, D. E., REED, S. D., HAVRILESKY, L. J. (2017). **Cost comparison of genetic testing strategies in women with epithelial ovarian cancer.** *Journal of Oncology Practice*, 13(2), e120–e129;

FREY, M. K., & POTHURI, B. (2017). **Homologous recombination deficiency (HRD) testing in ovarian cancer clinical practice: a review of the literature.** *Gynecologic Oncology Research and Practice*, 4(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40661-017-0039-8>;

GADDUCCI, A.; GUARNERI, V.; PECCATORI, F. A.; RONZINO, G.; SCANDURRA, G.; ZAMAGNI, C.; ZOLA, P.; SALUTARI, V. (2019). **Current strategies for the targeted treatment of high-grade serous epithelial ovarian cancer and relevance of BRCA mutational status.** *Journal of Ovarian Research*, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0484-6>;

GARCÍA-CLOSAS, M., JACOBS, K., KRAFT, P., CHATTERJEE, N. (2011). **Analysis of epidemiologic studies of genetic effects and gene-environment interactions.** IARC scientific publications, 163, 281–301;

GARZIERA, M., CECCHIN, E., CANZONIERI, V., SORIO, R., GIORDA, G., SCALONE, S., DE MATTIA, E., RONCATO, R., GAGNO, S., POLETTI, E., ROMANATO, L., SARTOR, F., POLESEL, J., & TOFFOLI, G. (2018). **Identification of novel somatic TP53 mutations in patients with high-grade serous ovarian cancer (HGSOc) using next-generation sequencing (NGS).** *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5). <https://doi.org/10.3390/ijms19051510>;

GARZIERA, M.; RONCATO, R.; MONTICO, M.; MATTIA, E. DE; GAGNO, S.; POLETTI, E.; SCALONE, S.; CANZONIERI, V.; GIORDA, G.; SORIO, R.; CECCHIN, E.; TOFFOLI, G. (2019). **New Challenges in Tumor Mutation Heterogeneity in Advanced Ovarian Cancer by a Targeted Next-Generation Sequencing (NGS) Approach.** *Cells*, v. 8, 584; doi:10.3390/cells8060584;

GAYTHER SA, WARREN W, MAZOYER S, RUSSELL PA, HARRINGTON PA, CHIANO M, SEAL S. (1995). **Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation.** *Nature Genetics*, 11:428–433;

GEORGE, A., KAYE, S., & BANERJEE, S. (2017). **Delivering widespread BRCA testing and PARP inhibition to patients with ovarian cancer.** *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(5), 284–296. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.191>;

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, (2009). **Introdução à Genética.** Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 9.a edição;

HAIJUAN YANG, JEFFREY, P.; MILLER, J.; KINNUCAN, E.; SUN, Y. THOMA, H.; ZHENG, N.; CHEN, P.; LEE, W.; PAVLETICH, P. (2002). **BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure.** *Science* 297, 1837–1848;

HAUNSCHILD, C. E.; TEWARI, K. S. (2021). **The current landscape of molecular profiling in the treatment of epithelial ovarian cancer.** *Gynecologic Oncology*, 160(1), 333–345. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.09.043>;

HENNESSY, B. T. J., TIMMS, K. M., CAREY, M. S., GUTIN, A., MEYER, L. A., FLAKE, D. D., ABKEVICH, V., POTTER, J., PRUSS, D., GLENN, P., LI, Y., LI, J., GONZALEZ-ANGULO, A. M., MCCUNE, K. S., MARKMAN, M., BROADDUS, R. R., LANCHBURY, J. S., LU, K. H., & MILLS, G. B. (2010). **Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer.** *Journal of Clinical Oncology*, 28(22), 3570–3576. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.27.2997>;

HIRST, J.; CROW, J.; GODWIN, A. (2018). **Ovarian Cancer Genetics: Subtypes and Risk Factors.** *Ovarian Cancer - From Pathogenesis to Treatment*, 3–38. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72705>;

INCORVAIA, L., PASSIGLIA, F., RIZZO, S., GALVANO, A., LISTÌ, A., BARRACO, N., MARAGLIANO, R., CALÒ, V., NATOLI, C., CIACCIO, M., BAZAN, V., & RUSSO, A. (2017). “**Back to a false normality**”: **New intriguing mechanisms of resistance to PARP inhibitors.** *Oncotarget*, 8(14), 23891–23904. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14409>;

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.** – Rio de Janeiro : INCA, 2019, 117p;

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. (2009). **Rede nacional de câncer familiar: manual operacional.** In Ministério da Saúde - Instituto Nacional do Câncer;

IONESCU, C. A.; VLĂDĂREANU, S.; PLEȘ, L.; DIMITRIU, M. C. T.; FURĂU, G. O.; VLĂDESCU, T. C.; CĂLIN, A. M.; OPRESCU, N. D. (2017). **Synchronous bilateral primary ovarian carcinoma - case presentation.** *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 58(1), 219–223;

JAYSON, G. C., KOHN, E. C., KITCHENER, H. C., & LEDERMANN, J. A. (2014). **Ovarian cancer.** *The Lancet*, 384(9951), 1376–1388. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62146-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62146-7);

JELOVAC, D.; ARMSTRONG, D. (2011). **Recent Progress in the Diagnosis and Treatment of Ovarian Cancer.** *CA Cancer J*; v. 61, 183–203;

JEONG, B., HU, W., BELYI, V., RABADAN, R., & LEVINE, A. J. (2010). **Differential levels of transcription of p53 regulated genes by the arginine/proline polymorphism: p53 with arginine at codon 72 favors apoptosis.** *The FASEB Journal*, 24(5), 1347–1353. <https://doi.org/10.1096/fj.09-146001>;

JIANG, Q.; GREENBERG., R. (2015). **Deciphering the BRCA1 Tumor Suppressor Network.** *The Journal of Biological chemistry*, v. 290, (29), 17724–17732;

JIANG, X., LI, X., LI, W., BAI, H., & ZHANG, Z. (2019). **PARP inhibitors in ovarian cancer: Sensitivity prediction and resistance mechanisms.** *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(4), 2303–2313. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14133>;

- KATO, S., HAN, S. Y., LIU, W., OTSUKA, K., SHIBATA, H., KANAMARU, R., & ISHIOKA, C. (2003). **Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), 8424–8429. <https://doi.org/10.1073/pnas.1431692100>;
- Kaufman, B., Shapira-Frommer, R., Schmutzler, R. K., Audeh, M. W., Friedlander, M., Balmaña, J., Mitchell, G., Fried, G., Stemmer, S. M., Hubert, A., Rosengarten, O., Steiner, M., Loman, N., Bowen, K., Fielding, A., & Domchek, S. M. (2015). **Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation.** *Journal of Clinical Oncology*, 33(3), 244–250. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.2728>;
- KECHIN, A. A., BOYARSKIKH, U. A., ERMOLENKO, N. A., TYULYANDINA, A. S., LAZAREVA, D. G., AVDALYAN, A. M., TYULYANDIN, S. A., KUSHLINSKII, N. E., FILIPENKO, M. L. (2018). **Loss of Heterozygosity in BRCA1 and BRCA2 Genes in Patients with Ovarian Cancer and Probability of Its Use for Clinical Classification of Variations.** *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 165(1), 94–100. <https://doi.org/10.1007/s10517-018-4107-9>;
- KEDAR-BARNES, I., & PAUL, R. (2004). **The Jewish people: Their ethnic history, genetic disorders and specific cancer susceptibility.** *Familial Cancer*, 3(3–4), 193–199. <https://doi.org/10.1007/s10689-004-9544-0>;
- KHALIQUE, L ; AYHAN, A; WEALE, ME; JACOBS, IJ ; RAMUS, SJ; GAYTHER, SA. (2007). **Genetic intra-tumour heterogeneity in epithelial ovarian cancer and its implications for molecular diagnosis of tumours.** *Journal of Pathology*; 211: 286–295;
- KIM, G., ISON, G., MCKEE, A. E., ZHANG, H., TANG, S., GWISE, T., SRIDHARA, R., LEE, E., TZOU, A., PHILIP, R., CHIU, H. J., RICKS, T. K., PALMBY, T., RUSSELL, A. M., LADOUCEUR, G., PFUMA, E., LI, H., ZHAO, L., LIU, Q., PAZDUR, R. (2015). **FDA approval summary: Olaparib monotherapy in patients with deleterious germline BRCA-mutated advanced ovarian cancer treated with three or more lines of chemotherapy.** *Clinical Cancer Research*, 21(19), 4257–4261. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0887>;
- KIM, S. I., LEE, M., KIM, H. S., CHUNG, H. H., KIM, J. W., PARK, N. H., & SONG, Y. S. (2019). **Effect of BRCA mutational status on survival outcome in advanced-stage high-grade serous ovarian cancer.** *Journal of Ovarian Research*, 12(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0511-7>;
- KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. (1997). **Gatekeepers and Caratekers.** *Nature News and Views*, v.386, 762-763;
- KNUDSON, A. G. (1971). **Mutation and Cancer : Statistical Study of Retinoblastoma.** 68(4), 820–823;
- KNUDSON, A. G. (2001). **Two genetic hits (more or less) to cancer.** *Nature Reviews Cancer*, 1(2), 157–162. <https://doi.org/10.1038/35101031>;

- KOBAYASHI, H., OHNO, S., SASAKI, Y., & MATSUURA, M. (2013). **Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (Review)**. *Oncology Reports*, 30(3), 1019–1029. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2541>;
- KOCZKOWSKA, M., ZUK, M., GORCZYNSKI, A., RATAJSKA, M., LEWANDOWSKA, M., BIERNAT, W., LIMON, J., & WASAG, B. (2016). **Detection of somatic BRCA1/2 mutations in ovarian cancer – next-generation sequencing analysis of 100 cases**. *Cancer Medicine*, 5(7), 1640–1646. <https://doi.org/10.1002/cam4.748>;
- KONECNY, G. E., & KRISTELEIT, R. S. (2016). **PARP inhibitors for BRCA1/2-mutated and sporadic ovarian cancer: Current practice and future directions**. *British Journal of Cancer*, 115(10), 1157–1173. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.311>;
- KOPANOS, C., TSIOLKAS, V., KOURIS, A., CHAPPLE, C. E., ALBARCA AGUILERA, M., MEYER, R., & MASSOURAS, A. (2019). **VarSome: the human genomic variant search engine**. *Bioinformatics*, 35(11), 1978–1980. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty897>;
- KOSSAI, M.; LEARY, A.; SCOAZEC, J. Y.; GENESTIE, C. (2018). **Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease**. *Pathobiology*, 85(1–2), 41–49. <https://doi.org/10.1159/000479006>;
- LEDERMANN, J. A., DREW, Y., & KRISTELEIT, R. S. (2016). **Homologous recombination deficiency and ovarian cancer**. *European Journal of Cancer*, 60, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2016.03.005>;
- LEDERMANN, J., HARTER, P., GOURLEY, C., FRIEDLANDER, M., VERGOTE, I., RUSTIN, G., SCOTT, C. L., MEIER, W., SHAPIRA-FROMMER, R., SAFRA, T., MATEI, D., FIELDING, A., SPENCER, S., DOUGHERTY, B., ORR, M., HODGSON, D., BARRETT, J. C., & MATULONIS, U. (2014). **Olaparib maintenance therapy in patients with platinum-sensitive relapsed serous ovarian cancer: A preplanned retrospective analysis of outcomes by BRCA status in a randomised phase 2 trial**. *The Lancet Oncology*, 15(8), 852–861. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70228-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70228-1);
- LEE, M. S., GREEN, R., MARSILLAC, S. M., COUELLE, N., WILLIAMS, R. S., YEUNG, T., FOO, D., HAU, D. D., HUI, B., MONTEIRO, A. N. A., & GLOVER, J. N. M. (2010). **Comprehensive analysis of missense variations in the BRCT domain of BRCA1 by structural and functional assays**. *Cancer Research*, 70(12), 4880–4890. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4563>;
- LI, J; ZOU, C; BAI, Y ; WAZER, DE; BAND, V ; GAO, Q. (2006). **DSS1 is required for the stability of BRCA2**. *Oncogene*, v. 25, 1186–1194;
- LI, V. D., LI, K. H., & LI, J. T. (2019). **TP53 mutations as potential prognostic markers for specific cancers: analysis of data from The Cancer Genome Atlas and the International Agency for Research on Cancer TP53 Database**. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145(3), 625–636. <https://doi.org/10.1007/s00432-018-2817-z>;
- LOMBARD; CHUA, K. F.; MOSTOSLAVSKY; FRANCO, S. **DNA Repair, Genome Review Stability, and Aging**. *Cell*, Vol. 120, 497–512;

- LORD, C. J., & ASHWORTH, A. (2016). **BRCAness revisited**. *Nature Reviews Cancer*, 16(2), 110–120. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.21>;
- LUTHRA, R., CHEN, H., ROY-CHOWDHURI, S., & SINGH, R. R. (2015). **Next-generation sequencing in clinical molecular diagnostics of cancer: Advantages and challenges**. *Cancers*, 7(4), 2023–2036. <https://doi.org/10.3390/cancers7040874>;
- LYRA, P. C. M., NEPOMUCENO, T. C., DE SOUZA, M. L. M., MACHADO, G. F., VELOSO, M. F., HENRIQUES, T. B., DOS SANTOS, D. Z., RIBEIRO, I. G., RIBEIRO, R. S., RANGEL, L. B. A., RICHARDSON, M., IVERSEN, E. S., GOLDFAR, D., COUCH, F. J., CARVALHO, M. A., MONTEIRO, A. N. A. (2021). **Integration of functional assay data results provides strong evidence for classification of hundreds of BRCA1 variants of uncertain significance**. *Genetics in Medicine*, 23(2), 306–315;
- MAISTRO, S., TEIXEIRA, N., ENCINAS, G., KATAYAMA, M. L. H., NIEWIADONSKI, V. D. T., CABRAL, L. G., RIBEIRO, R. M., GABURO JUNIOR, N., DE GOUVÊA, A. C. R. C., CARRARO, D. M., SABINO, E. C., DIZ, M. DEL P. E., CHAMMAS, R., DE BOCK, G. H., & FOLGUEIRA, M. A. A. K. (2016). **Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in epithelial ovarian cancer patients in Brazil**. *BMC Cancer*, 16(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2966-x>;
- MAXWELL, K. N.; WUBBENHORST, B.; WENZ, B. M.; DE SLOOVER, D.; PLUTA, J.; EMERY, L.; BARRETT, A.; KRAYA, A. A.; ANASTOPOULOS, I. N.; YU, S.; JIANG, Y.; CHEN, H.; ZHANG, N. R.; HACKMAN, N.; D'ANDREA, K.; DABER, R.; MORRISSETTE, J. J. D.; MITRA, N.; FELDMAN, M.; NATHANSON, K. L. (2017). **BRCA locus-specific loss of heterozygosity in germline BRCA1 and BRCA2 carriers**. *Nature Communications*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00388-9>;
- MAY, P.; MAY, E. (1999). **Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein**. *Oncogene*, v. 18, 7621 ± 7636;
- MIKI, Y., SWENSEN, J., SHATTUCK-EIDENS, D., FUTREAL, P. A., HARSHMAN, K., TAVTIGIAN, S., LIU, Q., COCHRAN, C., BENNETT, L. M., DING, W., BELL, R., ROSENTHAL, J., HUSSEY, C., TRAN, T., MCCLURE, M., FRYE, C., HATTIER, T., PHELPS, R., HAUGEN-STRANO, A., SKOLNICK, M. H. (1994). **A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1**. *Science*, 266(5182), 66–71. <https://doi.org/10.1126/science.7545954>;
- MIRZA, M. R., MONK, B. J., HERRSTEDT, J., OZA, A. M., MAHNER, S., REDONDO, A., FABBRO, M., LEDERMANN, J. A., LORUSSO, D., VERGOTE, I., BEN-BARUCH, N. E., MARTH, C., MAĐRY, R., CHRISTENSEN, R. D., BEREK, J. S., DØRUM, A., TINKER, A. V., DU BOIS, A., GONZÁLEZ-MARTÍN, A., MATULONIS, U. A. (2016). **Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer**. *New England Journal of Medicine*, 375(22), 2154–2164. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1611310>;
- MISCHA, LI, M.; GREENBERG, R. (2012). **Links between genome integrity and BRCA1 tumor suppression**. *Trends in Biochemical Sciences* October, v. 37 (10);

- MOORE, K., COLOMBO, N., SCAMBIA, G., KIM, B.-G., OAKNIN, A., FRIEDLANDER, M., LISYANSKAYA, A., FLOQUET, A., LEARY, A., SONKE, G. S., GOURLEY, C., BANERJEE, S., OZA, A., GONZÁLEZ-MARTÍN, A., AGHAJANIAN, C., BRADLEY, W., MATHEWS, C., LIU, J., LOWE, E. S., DISILVESTRO, P. (2018). **Maintenance Olaparib in Patients with Newly Diagnosed Advanced Ovarian Cancer**. *New England Journal of Medicine*, 379(26), 2495–2505. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1810858>;
- MULLANEY, J. M., MILLS, R. E., STEPHEN PITTARD, W., DEVINE, S. E. (2010). **Small insertions and deletions (INDELs) in human genomes**. *Human Molecular Genetics*, 19(R2), 131–136. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq400>;
- MYLAVARAPU, S., DAS, A., ROY, M. (2018). **Role of BRCA mutations in the modulation of response to platinum therapy**. *Frontiers in Oncology*, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00016>;
- NAROD, S.A., J FEUNTEUN, H T LYNCH, P WATSON, T CONWAY, J LYNCH, G M LENOIR. (1991). **Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12–q23**. *Lancet* 338, 82–83;
- NAUMANN, R. W., & COLEMAN, R. L. (2011). **Management strategies for recurrent platinum-resistant ovarian cancer**. *Drugs*, 71(11), 1397–1412. <https://doi.org/10.2165/11591720-000000000-00000>;
- NEWMAN, B., MILLIKAN, R. C., & KING, M. C. (1997). **Genetic epidemiology of breast and ovarian cancers**. *Epidemiologic Reviews*, 19(1), 69–79. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a017948>;
- NICHOLS, K. E., MALKIN, D., GARBER, J. E., FRAUMENI, J., & LI, F. P. (2001). **Germline p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers**. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 10(2), 83–87;
- PAL T;PERMUTH-WEY, J; KAPOOR, R.; CANTOR,A.; SUTPHEN, R. (2007). **Improved survival in BRCA2 carriers with ovarian cancer**. *Fam Cancer*; 6:113–119;
- PALMERO, E.; CARRARO, D; ALEMAR; B; MOREIRA; M.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, et al. (2018). **The germline mutational landscape of BRCA1 and BRCA2 in Brazil**. *Scientific Reports*, v.8:9188, DOI:10.1038/s41598-018-27315-2;
- PAN; Z. XING XIE, X. (2017). **BRCA mutations in the manifestation and treatment of ovarian cancer**. *Oncotarget*, v 8, (57), pp: 97657-97670;
- PAPA, A., CARUSO, D., STRUDEL, M., TOMAO, S., & TOMAO, F. (2016). **Update on Poly-ADP-ribose polymerase inhibition for ovarian cancer treatment**. *Journal of Translational Medicine*, 14(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1027-1>;
- PAPP, E; HALLBERG, D; GOTTFRIED, E. KONECNY; SLAMON, D; VELCULESCU, V; SCHARPF, R. (2018). **Integrated Genomic, Epigenomic, and Expression Analyses of Ovarian Cancer Cell Lines**. *Cell Reports* 25, 2617–2633;

PENNINGTON, K. P., WALSH, T., HARRELL, M. I., LEE, M. K., PENNILL, C. C., RENDI, M. H., THORNTON, A., NORQUIST, B. M., CASADEI, S., NORD, A. S., AGNEW, K. J., PRITCHARD, C. C., SCROGGINS, S., GARCIA, R. L., KING, M. C., & SWISHER, E. M. (2014). **Germline and somatic mutations in homologous recombination genes predict platinum response and survival in ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinomas.** *Clinical Cancer Research*, 20(3), 764–775. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-2287>;

PETRUCELLI, N.; MARY B. DALY, M. B.; FELDMAN, G.L. 2010. **Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2.** *Genetics IN Medicine*, v. 12, (5);

PIETRAGALLA, A., ARCIERI, M., MARCHETTI, C., SCAMBIA, G., FAGOTTI, A. (2020). **Ovarian cancer predisposition beyond BRCA1 and BRCA2 genes.** *International Journal of Gynecological Cancer*, 30(11), 1803–1810. <https://doi.org/10.1136/ijgc-2020-001556>;

PLON, S. E., ECCLES, D. M., EASTON, D., FOULKES, W. D., GENUARDI, M., GREENBLATT, M. S., HOGERVORST, F. B. L., HOOGERBRUGGE, N., SPURDLE, A. B., TAVTIGIAN, S. V. (2008). **Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results.** *Human Mutation*, 29(11), 1282–1291. <https://doi.org/10.1002/humu.20880>;

PRAKASH, R.; ZHANG, Y.; FENG, W.; JASIN, M. (2015). **Homologous Recombination and Human Health: The Roles of BRCA1, BRCA2 and Associated Proteins.** *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7;

PRAT, J. (2015). **Abridged republication of FIGO’s staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum.** *Cancer*, 121(19), 3452–3454. <https://doi.org/10.1002/cncr.29524>;

PRAT, J., D’ANGELO, E., & ESPINOSA, I. (2018). **Ovarian carcinomas: at least five different diseases with distinct histological features and molecular genetics.** *Human Pathology*, 80, 11–27. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.06.018>;

RAMUS, S. J.; GAYTHER, S. A. (2009). **The Contribution of BRCA1 and BRCA2 to Ovarian Cancer.** *Molecular Oncology*, 3(2), 138–150. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2009.02.001>;

REBBECK, T. R., FRIEBEL, T. M., FRIEDMAN, E., HAMANN, U., HUO, D., KWONG, A., OLAH, E., OLOPADE, O. I., SOLANO, A. R., TEO, S. H., THOMASSEN, M., WEITZEL, J. N., CHAN, T. L., COUCH, F. J., GOLDFAR, D. E., KRUSE, T. A., PALMERO, E. I., PARK, S. K., TORRES, D., NATHANSON, K. L. (2018). **Mutational spectrum in a worldwide study of 29,700 families with BRCA1 or BRCA2 mutations.** *Human Mutation*, 39(5), 593–620. <https://doi.org/10.1002/humu.23406>;

REBBECK, T. R., MITRA, N., WAN, F., SINILNIKOVA, O. M., HEALEY, S., MCGUFFOG, L., CHENEVIX-TRENCH, G., EASTON, D. F., ANTONIOU, A. C., NATHANSON, K. L., LAITMAN, Y., KUSHNIR, A., PALUCH-SHIMON, S., BERGER, R., ZIDAN, J., FRIEDMAN, E., EHRENCRONA, H., STENMARK-ASKMALM, M.,

EINBEIGI, Z., ANDRULIS, I. (2015). **Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer.** JAMA - Journal of the American Medical Association, 313(13), 1347–1361. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.5985>;

REBBECK, T. R., MITRA, N., WAN, F., SINILNIKOVA, O. M., HEALEY, S., MCGUFFOG, L., CHENEVIX-TRENCH, G., EASTON, D. F., ANTONIOU, A. C., NATHANSON, K. L., LAITMAN, Y., KUSHNIR, A., PALUCH-SHIMON, S., BERGER, R., ZIDAN, J., FRIEDMAN, E., EHRENCRONA, H., STENMARK-ASKMALM, M., EINBEIGI, Z., ANDRULIS, I. (2015). **Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer.** JAMA - Journal of the American Medical Association, 313(13), 1347–1361. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.5985>;

RICHARDS, S., AZIZ, N., BALE, S., BICK, D., DAS, S., GASTIER-FOSTER, J., GRODY, W. W., HEGDE, M., LYON, E., SPECTOR, E., VOELKERDING, K., REHM, H. L. (2015). **Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology.** Genetics in Medicine, 17(5), 405–424. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>;

RISCH, H. A., MCLAUGHLIN, J. R., COLE, D. E. C., ROSEN, B., BRADLEY, L., KWAN, E., JACK, E., VESPRINI, D. J., KUPERSTEIN, G., ABRAHAMSON, J. L. A., FAN, I., WONG, B., NAROD, S. A. (2001). **Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer.** American Journal of Human Genetics, 68(3), 700–710. <https://doi.org/10.1086/318787>;

RODRÍGUEZ-BALADA, M., ROIG, B., MARTORELL, L., MELÉ, M., SALVAT, M., VILELLA, E., BORRÀS, J., GUMÀ, J. (2016). **In silico, in vitro and case-control analyses as an effective combination for analyzing BRCA1 and BRCA2 unclassified variants in a population-based sample.** Cancer Genetics, 209(11), 487–492. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2016.09.003>;

ROY, R., CHUN, J., & POWELL, S. N. (2012). **BRCA1 and BRCA2: Different roles in a common pathway of genome protection.** Nature Reviews Cancer, 12(1), 68–78. <https://doi.org/10.1038/nrc3181>;

RUBIN, C., BENJAMIN, I., BEHBAKHT, K., TAKAHASHI, H., PH.D., A. MORGAN M., A. LIVOLSI, V, BERCHUCK, A., CHAEL G. MUTO, M., E. GARBER, J., L. WEBER, B., T. LYNCH, H., BOYD, J. (1997). **BRCA1 mutations and survival in women with ovarian cancer.** N Engl J Med; 336:1256;

RYLAND, G. L., DOYLE, M. A., GOODE, D., BOYLE, S. E., CHOONG, D. Y. H., ROWLEY, S. M., LI, J., BOWTELL, D. D., TOTHILL, R. W., CAMPBELL, I. G., GORRINGE, K. L. (2015). **Loss of heterozygosity: What is it good for?** BMC Medical Genomics, 8(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0123-z>;

RZEPECKA, I. K., SZAFRON, L., STYS, A., BUJKO, M., PLISIECKA-HALASA, J., MADRY, R., OSUCH, B., MARKOWSKA, J., BIDZINSKI, M., & KUPRYJANCZYK, J. (2012). **High frequency of allelic loss at the BRCA1 locus in ovarian cancers: Clinicopathologic and molecular associations.** *Cancer Genetics*, 205(3), 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2011.12.005>;

SAMTOOLS. (2015). **Especificações do Variant Call Format.** Disponível em: <https://github.com/samtools/hts-specs>. Acessado em: 10/10/2021;

SCHILDKRAUT, J. M., GOODE, E. L., CLYDE, M. A., IVERSEN, E. S., MOORMAN, G., BERCHUCK, A., MARKS, J. R., LISSOWSKA, J., PEPLONSKA, B., CUNNINGHAM, J. M., VIERKANT, R. A., RIDER, D. N., CHENEVIX-TRENCH, G., WEBB, P. M., BEESLEY, J., CHEN, X., BERG, D. VAN DEN, CONTI, D., ELUND, C. K., KRÜGER, S. (2010). **Single Nucleotide Polymorphisms in the TP53 Region and Susceptibility to Invasive Epithelial Ovarian Cancer.** *NIH Public Access*. 69(6), 2349–2357. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2902>;

SCHNEIDER, K; ZELLEY, K; NICHOLS, K.E., GARBER, J. **Li-Fraumeni Syndrome.** Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1311/>. Acessado em 05/10/2021;

SCHWARZ, R. F., NG, C. K. Y., COOKE, S. L., NEWMAN, S., TEMPLE, J., PISKORZ, A. M., GALE, D., SAYAL, K., MURTAZA, M., BALDWIN, P. J., ROSENFELD, N., EARL, H. M., SALA, E., JIMENEZ-LINAN, M., PARKINSON, C. A., MARKOWETZ, F., & BRENTON, J. D. (2015). **Spatial and Temporal Heterogeneity in High-Grade Serous Ovarian Cancer: A Phylogenetic Analysis.** *PLoS Medicine*, 12(2), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001789>;

SHAW, K. R. M., & MAITRA, A. (2019). **The Status and Impact of Clinical Tumor Genome Sequencing.** *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 20, 413–432. <https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083118-015034>;

SHIMIZU, I.; YOSHIDA Y.; MASAYOSHI SUDA, M.; MINAMINO, T. (2014). **DNA Damage Response and Metabolic Disease.** *Cell Metabolism*, 20, 967-977;

SHULMAN, L. P. (2010). **Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC): Clinical Features and Counseling for BRCA1 and BRCA2, Lynch Syndrome, Cowden Syndrome, and Li-Fraumeni Syndrome.** *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*, 37(1), 109–133. <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2010.03.0>;

SILVA, F. C., LISBOA, B. C. G., FIGUEIREDO, M. C. P., TORREZAN, G. T., SANTOS, É. M. M., KREPISCHI, A. C., ROSSI, B. M., ACHATZ, M. I., & CARRARO, D. M. (2014). **Hereditary breast and ovarian cancer: Assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients.** *BMC Medical Genetics*, 15(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-15-55>;

SNUSTAD P.; SIMON, M. (2012). **Principle of Genetics.** Ed. Garland Science, 6ª edição, 786p;

- SOLOMON, E. ; BAKER, D. F. (1991). **Report on the committee on the genetic constitution of chromosome 17.** *Cytogenet. Cell Genet.* 51: 319-337;
- SPIVAK, G. (2015). **Nucleotide excision repair in humans.** *DNA Repair*, 36: 10-18
<http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.09.003>;
- SPUGNESI, L., BALIA, C., COLLAVOLI, A., FALASCHI, E., QUERCIOLI, V., CALIGO, M. A., & GALLI, A. (2013). **Effect of the expression of BRCA2 on spontaneous homologous recombination and DNA damage-induced nucle.** *Mutagenesis*, 28(2), 187–195. <https://doi.org/10.1093/mutage/ges069>;
- STOPPA-LYONNET, D. (2016). **The biological effects and clinical implications of BRCA mutations: Where do we go from here?** *European Journal of Human Genetics*, 24(S1), S3–S9. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.93>;
- STOVER, E. H., FUH, K., KONSTANTINOPOULOS, P. A., MATULONIS, U. A., & LIU, J. F. (2020). **Clinical assays for assessment of homologous recombination DNA repair deficiency.** *Gynecologic Oncology*, 159(3), 887–898. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.09.029>;
- SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A.; BRAY, F. (2021). **Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries.** *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>;
- SWISHER, E. M., LIN, K. K., OZA, A. M., SCOTT, C. L., GIORDANO, H., SUN, J., KONECNY, G. E., COLEMAN, R. L., TINKER, A. V., O'MALLEY, D. M., KRISTELEIT, R. S., MA, L., BELL-MCGUINN, K. M., BRENTON, J. D., CRAGUN, J. M., OAKNIN, A., RAY-COQUARD, I., HARRELL, M. I., MANN, E., MCNEISH, I. A. (2017). **Rucaparib in relapsed, platinum-sensitive high-grade ovarian carcinoma (ARIEL2 Part 1): an international, multicentre, open-label, phase 2 trial.** *The Lancet Oncology*, 18(1), 75–87. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30559-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30559-9);
- SYMINGTON, L. (2016). **Mechanism and Regulation of DNA End Resection in Eukaryotes.** *Crit Rev Biochem Mol Biol*; 51(3): 195–212. [doi:10.3109/10409238.2016.1172552](https://doi.org/10.3109/10409238.2016.1172552);
- SZABO, I.C.; WORLEY, T. MONTEIRO, A. (2004). **Understanding Germ-Line Mutations in BRCA1.** *Cancer Biology & Therapy* 3:6, 515-520;
- TESTA, U.; PETRUCCI, E.; PASQUINI, L.; CASTELLI, G.; PELOSI, E. (2018). **Ovarian Cancers: Genetic Abnormalities, Tumor Heterogeneity and Progression, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells.** *Medicines*, 5(1), 16. <https://doi.org/10.3390/medicines5010016>;
- THOMPSON, D.; EASTON, D. F. (2002). **Cancer incidence in BRCA1 mutation carriers.** *Journal of the National Cancer Institute*, 94(18), 1358–1365. <https://doi.org/10.1093/jnci/94.18.1358>;

THOMPSON, THOMPSON. (2007). **Genetics in Medicine. Chapter 16- Cancer Genetics and Genomics.** Ed. Elsevier, 7ª edição, 582p.;

TOSS, A., & LAURA, C. (2013). **Molecular mechanisms of PARP inhibitors In BRCA-related ovarian cancer.** Journal of Cancer Science and Therapy, 5(11), 409–416. <https://doi.org/10.4172/1948-5956.1000234>;

UEDA, M., TERAJ, Y., KANDA, K., KANEMURA, M., TAKEHARA, M., YAMAGUCHI, H., NISHIYAMA, K., YASUDA, M., & UEKI, M. (2006). **Germline polymorphism of p53 codon 72 in gynecological cancer.** Gynecologic Oncology, 100(1), 173–178. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.08.015>;

VENCKEN, P. M. L. H., KRIEGE, M., HOOGWERF, D., BEUGELINK, S., VAN DER BURG, M. E. L., HOONING, M. J., BERNIS, E. M., JAGER, A., COLLÉE, M., BURGER, C. W., & SEYNAEVE, C. (2011). **Chemosensitivity and outcome of BRCA1- and BRCA2-associated ovarian cancer patients after first-line chemotherapy compared with sporadic ovarian cancer patients.** Annals of Oncology, 22(6), 1346–1352. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdq628>;

WALLACE, S.; MURPHY, D.; SWEASY, J. B. (2012). **Base excision repair and cancer.** Cancer Letters, v.327, 73–89;

WALSH, T., CASADEI, S., LEE, M. K., PENNILL, C. C., NORD, A. S., THORNTON, A. M., ROEB, W., AGNEW, K. J., STRAY, S. M., WICKRAMANAYAKE, A., NORQUIST, B., PENNINGTON, K. P., GARCIA, R. L., KING, M. C., SWISHER, E. M. (2011). **Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 108(44), 18032–18037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115052108>;

WEBB, P. M.; JORDAN, S. J. (2017). **Epidemiology of epithelial ovarian cancer.** Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology, 41, 3–14. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006>;

WEREN, R. D. A., MENSENKAMP, A. R., SIMONS, M., EIJKELENBOOM, A., SIE, A. S., OUCHENE, H., VAN ASSELDONK, M., GOMEZ-GARCIA, E. B., BLOK, M. J., DE HULLU, J. A., NELEN, M. R., HOISCHEN, A., BULTEN, J., TOPS, B. B. J., HOOGERBRUGGE, N., & LIGTENBERG, M. J. L. (2017). **Novel BRCA1 and BRCA2 Tumor Test as Basis for Treatment Decisions and Referral for Genetic Counselling of Patients with Ovarian Carcinomas.** Human Mutation, 38(2), 226–235. <https://doi.org/10.1002/humu.23137>;

WOLF-DIETRICH HEYER,; KIRK T. EHMSSEN, K.; LIU, (2010). **Regulation of Homologous Recombination in Eukaryotes.** Annu. Rev. Genet., 44:113-139;

WOOSTER R, NEUHAUSEN SL, MANGION J, ET AL. (1995). **Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13.** Science. ;265 (5181):2088-90;

WOOSTER, R.; WEBER, B.L. (2003). **Breast and ovarian cancer**. N Engl J Med, 348(23): 2339-47;

WU, R., BAKER, S. J., HU, T. C., NORMAN, K. M., FEARON, E. R., & CHO, K. R. (2013). **Type I to type II ovarian carcinoma progression: Mutant Trp53 or Pik3ca confers a more aggressive tumor phenotype in a mouse model of ovarian cancer**. American Journal of Pathology, 182(4), 1391–1399. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.12.031>;

YANG,.; KHAN, S; SUN, Y; HESS, K; SHMULEVICH, I ; ANIL. ; SOOD, K; ZHANG, W. (2011). **Association of BRCA1 and BRCA2 Mutations With Survival, Chemotherapy, Sensitivity, and Gene Mutator Phenotype in Patients With Ovarian Cancer**. JAMA, Vol 306, No. 14;

ZHANG, F.; JIANG LIN, M.; JIAXUE WU,J.; LIN YE,L.; HONG CAI., H.;BING XIA,B.; XIAOCHUN YU.; X. (2009). **PALB2 Links BRCA1 and BRCA2 in the DNA-Damage Response**. Current Biology 19, 524–529;

ZHANG, S., DOLGALEV, I., ZHANG, T., RAN, H., LEVINE, D. A., & NEEL, B. G. (2019). **Both fallopian tube and ovarian surface epithelium are cells-of-origin for high-grade serous ovarian carcinoma**. Nature Communications, 10(1): 5367. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13116-2>.

9 ANEXOS

Anexo 01: Carta de aprovação do projeto pelo CONEP.

PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Prevalência de mutação nos genes BRCA1 e 2 e aspectos clínicos de pacientes com câncer de ovário do Instituto Nacional de Câncer

Pesquisador: ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS SANTOS

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa na qual esteja prevista a dissociação irreversível dos dados dos participantes da pesquisa;);

Versão: 5

CAAE: 78305417.3.0000.5274

Instituição Proponente: Coordenação de Pesquisa

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ
MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.569.182

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos Apresentação do Projeto, Objetivo da Pesquisa e Avaliação dos Riscos e Benefícios foram retiradas do documento "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_913734.pdf", gerado a partir das informações inseridas pelo Pesquisador Responsável do estudo na Plataforma Brasil em 23/02/2018.

INTRODUÇÃO

Em todo o mundo o câncer de ovário é uma das maiores causas de morte entre as malignidades ginecológicas, com uma incidência de aproximadamente 225.000 casos novos (3,7% de todos os casos de câncer em mulheres) e aproximadamente 140.000 mortes (4,2% das mortes por câncer em mulheres ao ano). No Brasil, este tipo de câncer é o sétimo mais incidente na população geral, tendo sido estimados 6.150 casos novos para 2016. O último registro de mortalidade (2013) constatou 3282 mortes por esta neoplasia (SIM, 2013), e a alta letalidade se deve ao diagnóstico tardio. Isto ressalta a importância de reconhecer mulheres de alto risco ao desenvolvimento do câncer visando detecção e tratamento precoces. Mais de um quinto (aproximadamente 23%) dos tumores de ovário está relacionado a condições hereditárias. Em aproximadamente 65-85% destes

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: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.569.182

casos, a alteração genética está em um dos genes BRCA. Mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA2 predispõem à síndrome de câncer de mama e de ovário hereditários ou no inglês “Hereditary Breast and Ovarian Cancer” (HBOC). Estima-se que mulheres com mutação em BRCA1 tenham o risco de 24 a 40% de desenvolver câncer de ovário até os 70 anos (sobretudo o tipo epitelial), enquanto as que têm mutação em BRCA2 este risco seja de 8-18%. A literatura aponta peculiaridades de prognóstico em pacientes com HBOC. Tanto os cânceres de ovário de cunho hereditário quanto os esporádicos têm sido diagnosticados em estádios avançados, porém as publicações apontam maior sobrevida e melhor prognóstico entre pacientes com HBOC em relação às pacientes com câncer sem a síndrome. Além disso, no grupo de pacientes com mutação parece haver maior sobrevida entre mulheres portadoras de mutação em BRCA2 quando comparadas a portadoras de mutação em BRCA1. Há ainda controvérsias se pacientes com mutação nos genes BRCA1 e 2 apenas no tumor também apresentam melhor sobrevida. Nos últimos anos tem-se estudado tratamentos específicos em pacientes com mutação. Aparentemente, estas pacientes apresentam melhor resposta às medicações baseadas em platina em relação àquelas sem mutação, assim como aos medicamentos indutores da letalidade sintética. Considerando que HBOC é uma síndrome de herança autossômica dominante, há 50% de risco de transmissão do alelo mutado à prole. Estes indivíduos estão igualmente em alto risco de desenvolvimento tanto de tumores de ovário como de mama, cólon, pele, próstata, e devem ser submetidos a protocolos de detecção para estes tumores. Assim sendo, é fundamental o aconselhamento genético nestas famílias pela necessidade de rastrear tumores, traçar estratégias de tratamento e orientar cirurgias profiláticas. Na população Brasileira poucos estudos exploram a prevalência de HBOC e os aspectos clínicos relacionados a esta condição. Este projeto visa identificar a prevalência de mutação em genes BRCA1 e 2 em sangue e em tumor de ovário, assim como traçar características clínico-patológicas deste grupo de pacientes.

HIPÓTESE

1. Os cânceres de ovário do tipo epitelial possuem maior prevalência de mutação em genes BRCA1 e 2.
2. Mutações germinativas em BRCA1 e/ou 2 são frequentes em pacientes com mutações somáticas nestes genes.
3. Mutações somáticas tumorais em genes BRCA 1 e/ou 2 conferem características tumorais, clínicas e patológicas particulares
4. Mutações germinativas e somáticas em genes BRCA 1 e/ou 2 podem contribuir para sobrevida

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:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.569.182

diferencial nestas pacientes.

METODOLOGIA

- 1- Consulta de Aconselhamento Genético conforme rotina Institucional.
- 2- Coleta de Dados Clínico-Demográficos
- 3- Amplificação de BRCA1 e BRCA2 e preparação de bibliotecas para New Generation Sequencing (NGS).
- 4- Análise dos dados obtidos por bioinformática
- 5- Análises estatísticas.

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Serão incluídas pacientes com diagnóstico de tumor de ovário de origem epitelial matriculadas no INCA cujas biópsias de tumores de ovário e sangue periférico foram coletadas e armazenadas pelo BNT entre 2007 e 2016.

CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Recusa da paciente em participar do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

Identificar a frequência de mutações em BRCA1 e BRCA2 em espécimes tumorais (para mutações somáticas) e de sangue (para mutações germinativas) de pacientes diagnosticadas com câncer de ovário de origem epitelial.

OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

- Descrever as características clínico-patológicas nas mulheres com carcinomas de ovário de origem epitelial associados à presença de mutação germinativa e/ou somática em BRCA1 ou BRCA2.
- Comparar as características clínico-patológicas entre mulheres diagnosticadas com carcinoma de ovário de origem epitelial que apresentem mutações germinativas em BRCA1 ou BRCA2 com aquelas que não apresentam essas mutações.
- Avaliar a associação entre mutações germinativas e a resposta ao término do tratamento, a sobrevida livre de doença e a sobrevida global em dois e em cinco anos.

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

Continuação do Parecer: 2.569.182

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

O tratamento será exatamente o mesmo caso a paciente participe ou não deste estudo. As consultas de aconselhamento genético serão feitas por profissionais treinados em informação de risco de forma a minimizar riscos psicológicos.

BENEFÍCIOS

O benefício ocorrerá se alguma alteração for encontrada nos genes BRCA1 e 2, pois será proposta a intensificação de rastreamento para câncer de mama e ovário tendo em vista que pacientes com mutações constitutivas em genes BRCA1 e 2 têm aumento de risco para estes tumores. Além disso, outros familiares poderão ter seu DNA avaliado quanto a presença da mesma mutação. Através deste estudo será possível traçar o perfil de pacientes do Instituto Nacional de Câncer com mutação nos genes BRCA1 e 2.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

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

Recomendações:

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

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

1. No documento de "Folha de Rosto", intitulado "ovariofolhaderosto.pdf", o campo Patrocinador Principal não está preenchido. Conforme Norma Operacional CNS nº 001 de 2013 item 3.3.a): "todos os campos devem ser preenchidos, datados e assinados, com identificação dos signatários. Ressalta-se que o Patrocinador Principal é: toda pessoa física ou jurídica, pública ou privada, que apoia a pesquisa mediante ações de financiamento, infraestrutura, recursos humanos ou apoio institucional. Caso se trate de um órgão nacional de fomento à pesquisa, a assinatura dos responsáveis pelo órgão não é exigida, contudo é necessário o preenchimento adequados das informações. Solicita-se adequação

RESPOSTA: Preenchimento do nome do "Financiador Principal" (órgão nacional de fomento à pesquisa) realizado e anexado à Plataforma Brasil.

ANÁLISE:PENDÊNCIA ATENDIDA.

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: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.569.182

2. O documento intitulado "declaracoesexigidaspelaresolucao441.doc" não se encontra assinado. Solicita-se a inclusão da versão assinada do documento.

RESPOSTA: Versão assinada do arquivo "declaracoesexigidaspelaresolucao441.doc" anexada à Plataforma Brasil.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. No item 6 do documento intitulado: "REGULAMENTOfolha2.pdf", lê-se: "O material biológico armazenado é propriedade dos pesquisadores responsáveis pelo armazenamento das mesmas;" Ressalta-se que o material biológico humano armazenado em biorrepositório/biobanco é de propriedade do PARTICIPANTE DA PESQUISA, permanecendo sua guarda sob a responsabilidade institucional. Sendo assim, solicita-se a adequação do trecho indicado.

RESPOSTA: O texto alterado tem agora o seguinte conteúdo: "O material biológico armazenado é propriedade do participante da pesquisa permanecendo sua guarda sob responsabilidade da instituição (Instituto Nacional de Câncer)."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. Todos os protocolos de pesquisa devem conter demonstrativo da existência de infraestrutura necessária e apta ao desenvolvimento da pesquisa, bem como para atender eventuais problemas dela resultantes, com documento que expresse a concordância da instituição e/ou organização por meio de seu responsável maior com competência. Diante do exposto, solicita-se apresentar demonstrativo detalhado da existência de infraestrutura necessária e apta ao desenvolvimento da pesquisa, assinada pelo responsável maior do local onde se dará a pesquisa (Norma Operacional CNS nº 001 de 2013, item 3.3.h).

RESPOSTA: Em resposta a essa questão foi anexado documento (REGULAMENTODOLABARMAMOSTRASOVARIO.doc) com informações sobre a infraestrutura disponível para a realização do projeto de pesquisa, assinado pelo responsável pelo Programa de Genética do Instituto Nacional de Câncer.

O Laboratório do Programa de Genética e o Centro de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer possuem toda a infraestrutura necessária ao armazenamento de amostras e à realização do projeto. O Laboratório do Programa de Genética possui: Freezers a -20, 2 freezers a -80°C, 10 termocicladores, dois sequenciadores de DNA (ABI 3730 e ABI 3130), um sequenciador de nova geração Illumina (HiSeq 2500), 06 microcentrífugas (sendo 01 refrigerada), 02 centrífugas refrigeradas, 04 cubas de eletroforese para ácidos nucleicos, 03 capelas para preparação de

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: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.569.182

reações de PCR, 02 fluxos laminares para processamento de amostras biológicas, um sistema para criopreservação de amostras em Nitrogênio (para 10.000 amostras), Bioanalyzer 2100 (Agilent). O Centro de Pesquisa do INCA também disponibiliza também infraestrutura de bioinformática necessária à condução do projeto: Supercomputador Altix UltraViolet 100 da Sillion Graphics International, com cluster de computadores com 64 processadores Intel Xeon 7500 de 6 "cores", totalizando 384 núcleos independentes de processamento, e 6 TB de memória RAM, acompanhado de uma unidade armazenamento de dados A IS5000 de 108 TB, ligada ao cluster SGI UV 100 via links especiais e composta de 60 baias que recebem discos rígidos de 1,8 TB que serão usados para armazenar os dados gerados pelo Illumina HiSeq; duas workstations com sistema UNIX, cada um com 128GB de memória RAM e dois processadores Intel XEON de seis núcleos de 2.00Ghz; um computador Mac-Pro com 64 gb de memória RAM e dois processadores Intel Xeon de seis núcleos de 2.66Ghz; três soluções de armazenamento Iomega StorCenter de 12TB de armazenamento cada. Além da infraestrutura física, a Divisão de Genética conta com um técnico nível médio e três tecnologistas de nível superior com doutorado. O Instituto Nacional do Câncer também fornece reagentes para pesquisa como: reagentes de biologia molecular (Taq DNA Polimerase, kits de sequenciamento, kits de purificação de fragmentos de DNA, marcador de peso molecular, dNTPs, etc), material plástico descartável (ponteiros para micropipetas, tubos de polipropileno, microtubos de polipropileno). Além dos reagentes e material de consumo, a instituição também fornece serviço de gasometria, e reposição de Nitrogênio para armazenamento de culturas celulares e amostras biológicas, e serviço de manutenção de equipamentos.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, intitulado "TCLEPB14112017.doc":

5.1. Na página 03 de 08 lê-se: "Se você concordar, os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa utilizarão também parte do material de tumor e sangue armazenado no Banco Nacional de Tumores.". Solicita-se que conste no TCLE que o participante da pesquisa será informado sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do biorrepositório, quando for o caso (Resolução CNS nº 441 de 2011, item 8).

RESPOSTA: O texto alterado tem agora o seguinte conteúdo: "Se você concordar, os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa utilizarão também parte do material de tumor e sangue armazenado no Banco Nacional de Tumores. Caso seja constatada perda ou destruição de suas amostras biológicas você será informada, assim como sobre a devolução de material ao Banco de

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:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.569.182

Tumores do Instituto Nacional de Câncer (BNT) ao término deste estudo. Os pesquisadores também consultarão seus dados clínicos e laboratoriais que se encontram no seu prontuário. O sangue e tumor serão utilizados para extração do DNA, amplificação dos genes BRCA1 e 2 e sequenciamento. É importante destacar que o material será utilizado apenas com a finalidade descrita e tudo o que restar será devolvido ao BNT.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.2. Solicita-se incluir a informação no TCLE que as amostras biológicas serão utilizadas somente para as finalidades descritas no protocolo de pesquisa e que serão descartadas após o término do estudo.

RESPOSTA: O texto da página 3/8 foi alterado e tem agora o seguinte conteúdo: “É importante destacar que o material será utilizado apenas com a finalidade descrita e tudo o que restar será devolvido ao Banco de Tumores do Instituto Nacional de Câncer.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.3. Na página 03 de 08 lê-se: "Além disso, outros familiares poderão ter seu DNA avaliado quanto a presença da mesma mutação." Para a avaliação do DNA dos familiares será necessária a coleta de material biológico desses. Contudo, não há nenhuma informação no documento do projeto detalhado que diz que serão realizadas novas coletas de amostras biológicas. Solicitam-se maiores informações quanto à nova coleta de amostras biológicas e o uso de material genético dos familiares das participantes de pesquisa.

RESPOSTA: Os familiares NÃO farão parte da pesquisa. As pacientes serão encaminhadas ao ambulatório de Aconselhamento Genético onde rotineiramente são feitas orientações quanto ao risco e informação quanto à medidas de redução de risco nestas famílias. O texto alterado tem agora o seguinte conteúdo: Foi retirado da página 3 de 8 do TCLE: "Além disso, outros familiares poderão ter seu DNA avaliado quanto a presença da mesma mutação." E adicionado na página 3 de 8, o texto: “Além disso, pacientes com mutação serão encaminhados ao ambulatório de Aconselhamento Genético da Instituição cuja rotina inclui informações de risco e condutas de redução de risco de ocorrência em você e seus familiares.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.3.1. Caso ocorra a coleta das amostras biológicas, ou o uso do material genético dos familiares das participantes de pesquisa, será necessária a apresentação de um novo Termo de

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:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.569.182

Consentimento destinado a esses familiares, onde eles fornecerão anuência em participar da pesquisa em questão. Ressalta-se que este novo TCLE deverá ser elaborado tendo como referência o capítulo IV da Resolução CNS nº 466/2012.

RESPOSTA: NÃO será realizada coleta de amostra de familiares para fins desta pesquisa. As pacientes incluídas na pesquisa serão encaminhadas ao ambulatório de genética onde passarão por consulta conforme rotina Institucional.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.4. Na página 03 de 08, lê-se: "Não existem riscos físicos adicionais a você pela sua participação nesta pesquisa". Cabe lembrar que, segundo a Resolução CNS nº 466 de 2012, toda pesquisa com seres humanos envolve riscos em tipos e gradações variados. No item II.22 da Resolução CNS nº 466 de 2012, define-se risco da pesquisa como "[a] possibilidade de danos à dimensão física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural ou espiritual do ser humano, em qualquer pesquisa e dela decorrente". Diante do exposto, solicita-se informar no TCLE os potenciais riscos e incômodos que o estudo possa acarretar ao participante de pesquisa, por exemplo, a quebra do sigilo.

RESPOSTA: O texto alterado na página 3 de 8 do TCLE e tem agora o seguinte conteúdo: "Não existem riscos físicos adicionais a você pela sua participação nesta pesquisa. É importante que você entenda que nenhum procedimento médico adicional será realizado e nenhuma nova amostra de sangue ou de tumor, será coletada. Com respeito a riscos psicológicos haverá acompanhamento pela equipe de Aconselhamento Genético que é formado por profissionais com experiência no seguimento de pacientes com condições hereditárias e as situações de estresse associadas. As informações sobre a eventual presença de mutação e outros dados pessoais serão mantidas de maneira confidencial e sigilosa. Apenas os pesquisadores autorizados terão acesso aos dados individuais, resultados de exames e testes bem como às informações do seu registro médico."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.5. Na página 04 de 08 lê-se: "Você não pagará por qualquer procedimento, medicação em estudo ou teste exigido como parte desta pesquisa.". Para melhor esclarecer o participante da pesquisa, solicita-se que seja incluído no TCLE que todas as despesas tidas com a pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador responsável/ patrocinador, isto é, o participante da pesquisa não arcará com nenhum custo referente a procedimentos ou visitas ao centro de estudo

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:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.569.182

(Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.11 e II.16).

RESPOSTA: O texto alterado na página 4 de 8 do TCLE e tem agora o seguinte conteúdo: “Se você concordar com o uso da parte de seu tumor e/ou sangue armazenados e/ou das informações do seu prontuário como descrito acima, você não terá quaisquer custos ou despesas (gastos) pela sua participação nessa pesquisa. Você não pagará por qualquer procedimento, medicação em estudo ou teste exigido como parte desta pesquisa. Todas as despesas tidas com a pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador responsável/ patrocinador, isto é, o participante da pesquisa não arcará com nenhum custo referente a procedimentos ou visitas ao centro de estudo.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.6. Na página 05 de 08, lê-se: "Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento desta pesquisa, e que necessite de atendimento médico e psicológico, ficará a cargo da instituição.". No trecho em questão não consta a garantia de assistência integral e gratuita pelo tempo que for necessário, acompanhamento e indenização em casos de danos decorrentes da participação no estudo. Ressalta-se que o paciente sempre tem direito a buscar por indenização em caso de danos relacionados à pesquisa, conforme itens V.6 e V.7 da Resolução CNS nº 466 de 2012. Solicita-se que sejam incluídas no TCLE garantias de compromisso explícito por parte dos responsáveis pelo estudo garantindo assistência, acompanhamento e busca por indenização por dano decorrente da pesquisa.

RESPOSTA: O texto alterado na página 5 de 8 do TCLE e tem agora o seguinte conteúdo: “Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento desta pesquisa, e que necessite de atendimento médico e psicológico, ficará a cargo da instituição. É garantida a assistência, acompanhamento e busca por indenização por dano decorrente da pesquisa.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.7. Na página 05 de 08 lê-se: "(...) a equipe de pesquisadores deve ser comunicada e a coleta de amostras ou o uso das amostras para os exames relativos à pesquisa será imediatamente interrompida." O trecho em questão sugere nova coleta de amostras biológicas. Contudo, na metodologia do projeto detalhado não há nenhuma informação referente à nova coleta de material biológico das participantes de pesquisa. Neste caso, solicitam-se maiores informações.

RESPOSTA: O texto alterado na página 5 de 8 do TCLE e tem agora o seguinte conteúdo: “A sua participação é voluntária e a recusa em autorizar a sua participação não acarretará quaisquer penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito, ou mudança no seu tratamento e

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:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 2.569.182

acompanhamento médico nesta instituição. Você poderá retirar seu consentimento a qualquer momento sem qualquer prejuízo. Em caso de você decidir interromper sua participação na pesquisa, a equipe de pesquisadores deve ser comunicada e o uso das amostras para os exames relativos à pesquisa será imediatamente interrompida.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.7.1. Caso ocorra nova coleta de amostras biológicas, solicita-se que a informação seja inserida no documento do TCLE.

RESPOSTA: Não serão incluídas novas amostras biológicas.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5.8. As informações referentes a como se dará o processo de "Aconselhamento Genético" não estão apresentadas no documento do TCLE. Solicita-se esclarecer as medidas que serão adotadas em relação ao aconselhamento genético dos familiares das participantes de pesquisa já falecidas. Uma vez que o termo de consentimento de biobanco não exclui a comunicação dos resultados aos familiares em situações de risco genético (Resolução CNS 441/2011).

RESPOSTA: Os familiares NÃO serão incluídos na pesquisa. Os resultados serão informados em consulta no ambulatório de aconselhamento genético, conforme rotina institucional, ficando a cargo do setor o seguimento das paciente incluídas e seus familiares conforme cada caso.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

6. Quanto ao Projeto Detalhado, intitulado: "CANCERDEOVARIOEHBOCACES.doc":

6.1. Conforme resolução CNS nº 441 de 2011 item IV lê-se: "No caso de Biorrepositório, as condições associadas ao armazenamento de material biológico humano devem estar explicitadas no Projeto de Pesquisa respectivo, devendo seu Regulamento ser apreciado pelo CEP institucional ou por CEP indicado pela CONEP e, quando for o caso, pela CONEP [...]". Solicita-se apresentação das condições de armazenamento das amostras.

RESPOSTA: O texto alterado na página 10 de 17 do Projeto Detalhado e tem agora o seguinte conteúdo: "3 - Armazenamento de amostras no setor de genética. As amostras serão solicitadas ao Banco de Tumores do Instituto Nacional de Câncer e armazenadas no setor de genética. É previsto o armazenamento por dois anos. As alíquotas serão estocadas no freezer à -20º eluídas em água. Cada amostra será identificada por numeração de forma à apenas os pesquisadores envolvidos no

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

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.569.182

projeto saberem à qual paciente pertence. Ao fim do estudo todas as alíquotas serão devolvidas ao Banco de Tumores do Instituto Nacional de Câncer.”

O Regulamento referente ao biorrepositório (REGULAMENTODOLABARMAMOSTRASOVARIO20022018.doc.PDF) foi anexado à documentação do presente projeto.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

6.2. Solicita-se que constem no Projeto Detalhado os critérios de inclusão e exclusão devendo ser apresentados de acordo com as exigências da metodologia a ser utilizada no estudo (Norma Operacional CNS nº 001 de 2013, item 3.4.1.11).

RESPOSTA: O texto do Projeto Detalhado foi alterado na página 4 de 17 e tem agora o seguinte conteúdo:

“III. Critérios de Inclusão e Exclusão.

Inclusão. Serão incluídas pacientes com diagnóstico de tumor de ovário de origem epitelial matriculadas no INCA cujas biópsias de tumores de ovário e sangue periférico foram coletadas e armazenadas pelo Banco de Tumores do Instituto Nacional de Câncer (BNT) entre 2007 e 2016.

Exclusão. Recusa da paciente em participar do estudo.”

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Considerações Finais a critério da CONEP:

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

Situação: Protocolo aprovado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_913734.pdf	23/02/2018 16:29:58		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	CARTARESPOSTACONEP.pdf	23/02/2018 16:02:26	ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e	REGULAMENTODOLABARMAMOSTRASOVARIOversaoimpa.pdf	23/02/2018 15:57:35	ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS	Aceito

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: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.569.182

Infraestrutura	REGULAMENTODOLABARMAMOSTR ASOVARIOversaolimpa.pdf	23/02/2018 15:57:35	SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	REGULAMENTODOLABARMAMOSTR ASOVARIOcommarcacoes.pdf	23/02/2018 15:56:09	ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracoesexigidaspelaresolucaoversa olimpa.pdf	23/02/2018 15:54:53	ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	declaracoesexigidaspelaresolucaocomm arcacao.pdf	23/02/2018 15:54:01	ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEovarioversaolimpa.doc	20/02/2018 13:20:10	ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS SANTOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEovario20022018.doc	20/02/2018 13:19:24	ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS SANTOS	Aceito
Outros	PROJETODETALHADOOVARIOsemma rcacao.doc	17/02/2018 19:18:45	ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS SANTOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETODETALHADOOVARIO160220 18.doc	17/02/2018 19:15:11	ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	fderostoovarioplatbrasil.pdf	17/02/2018 18:49:56	ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS SANTOS	Aceito
Outros	FichaClinicav211117.pdf	21/11/2017 11:09:39	ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS SANTOS	Aceito
Outros	formulariosubmissaoincafolha4.pdf	03/10/2017 14:24:00	ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS SANTOS	Aceito
Outros	formulariosubmissaoincafolha3.pdf	03/10/2017 14:21:36	ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS SANTOS	Aceito
Outros	formulariosubmissaoincafolha2.pdf	03/10/2017 14:20:10	ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS SANTOS	Aceito
Outros	formulariosubmissaoincafolha1.pdf	03/10/2017 14:17:03	ANNA CLAUDIA EVANGELISTA DOS SANTOS	Aceito

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: BRASÍLIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 2.569.182

Situação do Parecer:

Aprovado

BRASILIA, 29 de Março de 2018

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

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

Anexo 02: Tabela com os resultados da revisão histopatológica e a representatividade tumoral de cada amostra..

Caso	Código Amostra	Tipo histológico BNT	Tipo histológico confirmado (Revisão histológica)	Representatividade tumoral
01	01	HGSC	HGSC	100 (%)
02	02	HGSC	HGSC	100 (%)
03	03	HGSC	HGSC	100 (%)
04	04	HGSC	HGSC	100 (%)
05	05	HGSC	HGSC	100 (%)
06	06	HGSC	HGSC	100 (%)
07	07	HGSC	HGSC	100 (%)
08	08	HGSC	HGSC	70 (%)
09	09	HGSC	HGSC	100 (%)
10	10	HGSC	HGSC	100 (%)
11	11	HGSC	HGSC	100 (%)
12	12	HGSC	HGSC	100 (%)
13	13	A endometrióide	A/C de células claras	100 (%)
14	14	A de células claras	A de células claras	100 (%)
15	15	A endometrióide	A endometrióide	100 (%)
16	16/22	A/C mucinoso	A/C mucinoso	100 (%)
17	17/21	A/C mucinoso	A/C mucinoso	100 (%)
18	18	A/C de células claras	A/C de células claras	90 (%)
19	20	A/C de células claras	Adenocarcinoma de células claras	100 (%)
20	23/24	A/C mucinoso	A/C mucinoso	80%
21	25/26	A/C mucinoso	A/C mucinoso	60%
22	27/28	A/C mucinoso	A/C mucinoso	90 (%)
23	29	HGSC	HGSC	70 (%)
24	30	HGSC	HGSC	100 (%)
25	31	HGSC	HGSC	80%
26	32	HGSC	HGSC	100 (%)

Caso	Código Amostra	Tipo histológico BNT	Tipo histológico confirmado (Revisão histológica)	Representatividade tumoral
27	33	HGSC	HGSC	100 (%)
28	34	HGSC	HGSC	70 (%)
29	35	HGSC	HGSC	60%
30	36	HGSC	A/C seroso de baixo grau	100 (%)
31	38/39	A/C mucinoso	A/C mucinoso	100 (%)
32	40/41	A/C mucinoso	A/C mucinoso	60%
33	42	A endometrióide	A endometrióide	100 (%)
34	43	A endometrióide	A endometrióide	100 (%)
35	44	A/C de células claras	A/C de células claras	90 (%)
36	45/46	A/C mucinoso	A/C mucinoso	100 (%)
37	47	A/C de células claras	Cistoadenocarcinoma de células claras	100 (%)
38	48	HGSC	HGSC + A/C mucinoso	100 (%)
39	49	HGSC	Tumor misto (HGSC + Células claras)	80% HGSC + 10% Células claras
40	50	HGSC	HGSC	60%
41	52	HGSC	HGSC	100 (%)
42	53	HGSC	HGSC	90 (%)
43	54	HGSC	HGSC	100 (%)
44	55	HGSC	HGSC	80%
45	56	HGSC	HGSC	90 (%)
46	57	HGSC	HGSC	90 (%)
47	58	HGSC (papilar)	A/C seroso de baixo grau	90%
48	59	A/C de células claras	A/C de células claras	70%
49	60	HGSC	HGSC	80%
50	61	HGSC	HGSC	70 (%)
51	62	HGSC	HGSC	80%
52	63	HGSC	HGSC	100 (%)
53	64	HGSC (papilar)	HGSC	70 (%)
54	65	HGSC	HGSC	80%
55	66	HGSC	HGSC	100 (%)
56	67	HGSC	HGSC	80%

Legenda: A significa adenocarcinoma; A/C significa Adenocarcinoma e Cistoadenocarcinoma.

Anexo 03: Tabela com as características clinico-patológicas de cada paciente.

Código Amostra	Idade	Estadiamento	Histórico familiar de câncer	Óbito
1	62	III C	Tia materna ignorado; Tia paterna com câncer de mama	30/06/2018
2	59	IIC	Avó paterna câncer de pele ; Pai câncer de pele e próstata; Tio materno com câncer de estômago; Tia paterna com câncer de útero; Tio paterno com próstata	***
3	53	IV	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	30/03/2017
4	53	III	Pai com câncer de pâncreas; Tio paterno com câncer indeterminado; Irmã com câncer de mama	***
5	70	IIIC	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	***
6	52	IV	Avó materna câncer de estômago	31/08/2015
7	54	IIIC	Avó paterna com câncer de mama; Tia paterna com câncer de mama; Tio paterno com neoplasia maligna sem localização específica	***
8	54	IV	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	***
9	66	IIIA	Tia paterna com neoplasia maligna ginecológica	06/02/2017
10	51	IIIC	Tia materna com neoplasia maligna de cabeça,face e pescoço com localização mal definida (CID76.0)	16/12/2020
11	58	IIA	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	***
12	32	IIIC	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	28/02/2016
13	61	IC	Irmão com câncer de próstata	***
14	75	IA	Pai com câncer de mama (nódulo mamário) (CID 63.9); Irmão com localização mal definida abdômen (CID76.2); 2 Irmãs com câncer de mama aos 64 e outra aos 40 anos; Irmão com neoplasia sem especificação de localização (CID 80)	11/03/2017
15	87	IA	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	***
16	42	IIIC	Tio materno com neoplasia sem especificação de localização (cid80)	***
17	56	III	Mãe com neoplasia com localização mal definida abdômen (CD76.2)	***
18	56	IIIC	SEM HISTÓRICO REGISTRADO	14/09/2016

Código Amostra	Idade	Estadiamento	Histórico familiar de câncer	Óbito
20	61	IV	Irmã com neoplasia sem especificação de localização (cid80)	08/06/2015
23	32	IA	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	***
25	65	IIIC	Pai com câncer de pulmão	31/05/2015
27	48	IC	SEM HISTÓRICO REGISTRADO	***
29	63	IIIC	Tia paterna com câncer indeterminado	11/09/2012
30	45	IV	Avó paterna com neoplasia secundária de intestino grosso e reto	02/08/2013
31	76	IIIC	Irmão com câncer de mama	***
32	64	III A	Mãe com neoplasia maligna de fígado e vias biliares intra-hepáticas	12/04/2015
33	45	IIIC	Tia materna com câncer de mama aos 51 anos	***
34	47	IV	Mãe com câncer de mama aos 63 anos; Avó materna com ca mama aos 70 anos	12/03/2014
35	60	IIIC	Avó materna com câncer de estômago	23/05/2016
36	94	IA	2 Filhos com câncer de próstata	10/06/2013
38	59	IIC	2 Tios maternos com neoplasias malignas de localização mal definida de lábio, cavidade oral ou faringe	24/01/2017
40	54	IC	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	***
42	50	IV	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	14/06/2016
43	58	I	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	***
44	57	IB1	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	***
45	49	IC2	Irmã câncer de mama aos 32 anos; avó materna ca estômago aos 76 anos	***
47	42	IA	Irmã com neoplasia maligna sem especificação de localização (cid80)	***
48	31	IB	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	30/04/2015
49	49	IIIC	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	25/12/2014

Código Amostra	Idade	Estadiamento	Histórico familiar de câncer	Óbito
50	49	IB	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	***
52	69	IV	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	29/05/2017
53	62	IIIC	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	07/11/2016
54	84	IV	Irmão com câncer leucemia aguda de tipo celular não especificado	29/03/2014
55	51	IV	Tia materna com câncer de pele	14/01/2017
56	76	IV	Mãe com câncer de ovário (cd56) aos 40 anos	27/09/2013
57	71	IIIA	SEM HISTÓRICO REGISTRADO	20/07/2015
58	62	IV	Filha com câncer de útero (cd55) aos 30 anos	***
59	56	IC	Tio paterno com neoplasia maligna sem especificação de localização (cid80); Irmão com câncer de estômago; Filha com câncer de ovário aos 35 anos	***
60	61	IIIB	Mãe com neoplasia maligna de boca aos 98 anos	27/10/2017
61	74	IIIC	Mãe com câncer de útero aos 60 anos	30/06/2017
62	65	IB	SEM HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER	07/07/2019
63	63	IA	Irmã com cancer de mama aos 25 anos	***
64	52	IV	SEM HISTÓRICO REGISTRADO	28/11/2015
65	46	IIIC	Mãe com neoplasia maligna do trato intestinal; Irmã com câncer de útero; Irmã com câncer de mama	15/11/2014
66	44	IIIC	Avó paterna câncer de mama aos 80 anos	03/12/2017
67	37	IV	SEM HISTÓRICO REGISTRADO	***

Anexo 04: Sequências de primers de *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53* utilizadas nas reações de PCR.

Gene	Primer Forward	Sequência 5'-3'	Primer Reverse	Sequência 5'-3'	Tamanho (pb)
<i>BRCA1</i>	BRCA1_2F	GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT	BRCA1_2R	TGCTTTTTCTTCCCTAGTATGT	258
<i>BRCA1</i>	BRCA1_3F	TCCTGACACAGCAGACATTTA	BRCA1_3R	TTGGATTTTTTCGTTCTCACTTA	339
<i>BRCA1</i>	BRCA1_5-7F	GTTTAGGTTTTTGCTTATGCAGCATCCA	BRCA1_5-7R	TCAGGTACCCTGACCTTCTCTGAAC	3081
<i>BRCA1</i>	BRCA1_8F	TGTTAGCTGACTGATGATGGT	BRCA1_8R	ATCCAGCAATTATTATTAATAAC	267
<i>BRCA1</i>	BRCA1_9F	CCACAGTAGATGCTCAGTAAATA	BRCA1_9R	TAGGAAAATACCAGCTTCATAGA	211
<i>BRCA1</i>	BRCA1_10F	TGGTCAGCTTTCTGTAATCG	BRCA1_10R	GTATCTACCCACTCTCTTTTCAG	241
<i>BRCA1</i>	BRCA1_11-AF	CCACCTCCAAGGTGTATGAAGTATG	BRCA1_11-ER	GGAGCCCACTTCATTAGTAC	2580
<i>BRCA1</i>	BRCA1_11-EF2	AGTCGGGAAACAAGCATAGAAA	BRCA1_11-GR	GTGCTCCCCAAAAGCATAAA	1656
<i>BRCA1</i>	BRCA1_12F	GTCCTGCCAATGAGAAGAAA	BRCA1_12R	TGTCAGCAAACCTAAGAATGT	265
<i>BRCA1</i>	BRCA1_13F	AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA	BRCA1_13R	ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC	320
<i>BRCA1</i>	BRCA1_14F	CTAACCTGAATTATCACTATCA	BRCA1_14R	GTGTATAAATGCCTGTATGCA	312
<i>BRCA1</i>	BRCA1_15F2	TGGCTGCCCAGSAAGTATG	BRCA1_15R	AACCAGAATATCTTTATGTAGGA	338
<i>BRCA1</i>	BRCA1_16F	AATTCTTAACAGAGACCAGAAC	BRCA1_16R	AAAACCTTTCCAGAATGTTGT	450
<i>BRCA1</i>	BRCA1_17F	GTGTAGAACGTGCAGGATTG	BRCA1_17R	TCGCCTCATGTGGTTTTA	263
<i>BRCA1</i>	BRCA1_18F	GGCTCTTTAGCTTCTTAGGAC	BRCA1_19R	CATTGTTAAGGAAAGTGGTGC	799
<i>BRCA1</i>	BRCA1_20F	ATATGACGTGTCTGCTCCAC	BRCA1_20R	GGGAATCCAAATTACACAGC	401
<i>BRCA1</i>	BRCA1_21F	AAGCTCTTCCTTTTTGAAAGTC	BRCA1_21R	GTAGAGAAATAGAATAGCCTCT	298
<i>BRCA1</i>	BRCA1_22F	TCCCATTGAGAGGTCTTGCT	BRCA1_23R	ACTGTGCTACTCAAGCACCA	1751
<i>BRCA1</i>	BRCA1_24F	ATGAATTGACACTAATCTCTGC	BRCA1_24R	GTAGCCAGGACAGTAGAAGGA	280

Gene	Primer Forward	Sequência 5'-3'	Primer Reverse	Sequência 5'-3'	Tamanho (pb)
BRCA2	BRCA2_2F	TGTTCCCATCCTCACAGTAAG	BRCA2_2R	GTAAGGGTTTTTAGCAAGCA	347
BRCA2	BRCA2_3F	GGTAAACTAAGGTGGGA	BRCA2_3R	ATTTGCCCAGCATGACACA	390
BRCA2	BRCA2_4F	ATCCCAGTATAGAGGAGA	BRCA2_7R	ATTGTCAGTTACTAACACAC	1778
BRCA2	BRCA2_8F	GTGTCATGTAATCAAATAGT	BRCA2_8R	CAGGTTTAGAGACTTTCTC	288
BRCA2	BRCA2_9F	GGACCTAGGTTGATTGCA	BRCA2_9R	GTCAAGAAAGGAAAGGTAA	586
BRCA2	BRCA2_10-1F	CTATGAGAAAGGTTGTGAG	BRCA2_10-3R	CATGTATACAGATGATGCCTAAG	1324
BRCA2	BRCA2_11-1F2	AACTTAGTGAAAAATATTTAGT	BRCA2_11-4R	CTTGCTGCTGTCTACCTG	1704
BRCA2	BRCA2_11-5BF	CCATAATTTAACACCTAGCCA	BRCA2_11-7R	TTCGGAGAGATGATTTTTGTC	1903
BRCA2	BRCA2_11-8F	GCCTTAGCTTTTTACACAA	BRCA2_11-11R	CCCCCAAAGTACTACACAA	1975
BRCA2	BRCA2_12F	ACTCTTTCAAACATTAGGTCA	BRCA2_12R	TTTGAGAGGCAGGTGGAT	340
BRCA2	BRCA2_13F2	TGCTGATTTCTGTTGTATGCTTG	BRCA2_13R2	TTGGCTTCCAAACTTTTGTG	709
BRCA2	BRCA2_14F	GAATACAAAACAGTTACCAGA	BRCA2_14R	CACCACCAAAGGGGAAA	647
BRCA2	BRCA2_15F2	GGGGTTGTGCTTTTTAAATT	BRCA2_16R	TAGTTCGAGAGACAGTTAAG	1640
BRCA2	BRCA2_17F	CAGAGAATAGTTGTAGTTGTT	BRCA2_18R	GAAATTGAGCATCCTTAGTAA	1191
BRCA2	BRCA2_19F	ATATTTTTAAGGCAGTCTAGA	BRCA2_20R	CTTGTTGCTATTCTTTGTCTA	977
BRCA2	BRCA2_21F	CTTTTAGCAGTTATATAGTTTC	BRCA2_21R	GCCAGAGAGTCTAAAACAG	340
BRCA2	BRCA2_22F	TTTGTTGATTTGTCCTGTTTA	BRCA2_23R	CCGTGGCTGGTAAATCTG	825
BRCA2	BRCA2_24F	ACCGGTACAAACCTTTCATTG	BRCA2_24R	CTGGTAGCTCCAATAATC	324
BRCA2	BRCA2_25F	CTATTTTGATTTGCTTTTATTATT	BRCA2_25R	GCTATTTCTTGATACTGGAC	447
BRCA2	BRCA2_26F	TTGGAAACATAAATATGTGGG	BRCA2_26R	ACTTACAGGAGCCACATAAC	336
BRCA2	BRCA2_27F	CTACATAATTATGATAGGCT	BRCA2_27R	GTAATAATGTGTGGTTTAAA	737

Gene	Primer Forward	Sequência 5'-3'	Primer Reverse	Sequência 5'-3'	Tamanho (pb)
TP53	TP53_2-3F	CCAGGTGACCCAGGGTTGGA	TP53_4R	AGAGGAATCCCAAAGTTCCA	778
TP53	TP53_5-6F	TGTTCACTTGTGCCCTGACT	TP53_8-9R	AGTGTTAGACTGGAACTTT	1803
TP53	TP53_10F	CAATTGTAACCTGAACCATC	TP53_11R	AGGCTGTCAGTGGGGAACAA	1215

Anexo 05: Conjuntos de amplicons e primers utilizados nas PCR multiplex e convencional para a amplificação dos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*.

BRCA1		
PCR Multiplex	Amplicons	Primers
Conjunto Ma	11 ^a	11AF/ 11ER
	14	14F/ 14R
	2	2F/ 2R
Conjunto Mb	22-23	22F/ 23R
	12	12F/ 12R
	16	16F/ 16R
Conjunto Mc	18-19	18F/ 19R
	3	3F/ 3R
	21	21F/ 21R
Conjunto Md	10	10F/10R
	9	9F/ 9R
	8	8F/ 8R
Conjunto Me	13	13F/ 13R
	17	17F/ 17R
Conjunto Mf	20	20F/ 20R
	24	24F/ 24R
PCR convencional	11b	11EF/ 11GR
PCR convencional	15	15F2/ 15R
Long Range	5-7	5-7F/5-7R

BRCA2		
PCR Multiplex	Amplicons	Primers
Conjunto M1	11b	11-5BF/ 11-7R
	13	13F2/ 13R2
	9	8F/ 8R
	8	9F/ 9R
Conjunto M2	11c	11-8F/ 11-11R
	10	10-1F/ 10-3R
	19-20	19F/ 20R
	26	26F/ 26R
Conjunto M3	11a 2	11-1F2/ 11-4R
	22-23	22F/ 23R
	25	25F/ 25R
	2	2F/ 2R
Conjunto M4	4-7	4F/ 7R
	17-18	17F/ 18R
	14	14F/ 14R
	24	24F/ 24R
Conjunto M5	15-16	15F2/ 16R
	27	27F/ 27R
	21	21F/21R
Conjunto M6	3	3F/ 3R
	12	12F/ 12R

TP53		
PCR Multiplex	Amplicons	Primers
01	2- 4	2-3F/ 4R
02	5-9	5-6F/ 8-9R
03	10-11	10F/ 11R

Anexo 06: Variantes germinativas identificadas no gene *BRCA1*.

Código Amostra	Gene	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	Frequência ALT
1	<i>BRCA1</i>	c.1387A>T	p.Lys463*	P*	87	41%
3	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Arg1495Met	PB	266	48%
5	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	217	48%
8	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	363	99%
9	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	345	45%
12	<i>BRCA1</i>	c.4484G>T	p.Pro871Leu	P	383	43%
13	<i>BRCA1</i>	c.3418A>G	p.Ser1140Gly	PB	316	53%
13	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	347	46%
14	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	341	54%
15	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	283	52%
16	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	400	50%
17	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	232	100%
18	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	226	50%
20	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	265	100%
23	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	144	51%
29	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	164	49%

Código Amostra	Gene	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	Frequência ALT
34	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	338	51%
35	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	484	100%
36	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	224	53%
38	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	523	100%
42	<i>BRCA1</i>	c.4964C>T	p.Ser1655Phe	VUS/P	890	51%
42	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	555	99%
43	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	573	54%
44	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	1002	47%
45	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	385	50%
47	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	213	48%
48	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	416	100%
52	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	163	52%
53	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	637	49%
54	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	492	47%
55	<i>BRCA1</i>	c.3418A>G	p.Ser1140Gly	PB	1599	48%
55	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	306	46%
56	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	525	44%
58	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	792	48%
59	<i>BRCA1</i>	4598G>T	p.Ser1533Ile	PB	1075	50%
60	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	164	48%
61	<i>BRCA1</i>	c.3418A>G	p.Ser1140Gly	PB	948	48%
61	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	395	52%
62	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	86	50%

Código Amostra	Gene	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	Frequência ALT
63	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	327	53%
64	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	161	50%
66	<i>BRCA1</i>	c.3403C>T	p.Gln1135*	P	1306	48%
67	<i>BRCA1</i>	c.4964C>T	p.Ser1655Phe	VUS/P	383	47%
67	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	199	100%

Anexo 07: Variantes germinativas identificadas no gene *BRCA2*.

Código Amostra	Gene	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	Frequência ALT
7	<i>BRCA2</i>	c.8830A>T	p.Ile2944Phe	B	348	56%
9	<i>BRCA2</i>	c.7469T>C	p.Ile2490Thr	B	113	48%
10	<i>BRCA2</i>	c.5744C>T	p.Thr1915Met	B	73	51%
11	<i>BRCA2</i>	c.5198C>T	p.Ser1733Phe	B	66	44%
12	<i>BRCA2</i>	c.6220C>A	p.His2074Asn	B	128	42%
23	<i>BRCA2</i>	c.8830A>T	p.Ile2944Phe	B	143	43%
34	<i>BRCA2</i>	c.4241C>T	p.Thr1414Met	B	50	44%
34	<i>BRCA2</i>	c.5704G>A	p.Asp1902Asn	B	70	53%
38	<i>BRCA2</i>	c.4258G>T	p.Asp1420Tyr	B	61	51%
45	<i>BRCA2</i>	c.8830A>T	p.Ile2944Phe	B	642	49%
49	<i>BRCA2</i>	c.4090A>C	p.Ile1364Leu	B	131	52%
50	<i>BRCA2</i>	c.8503T>C	p.Ser2835Pro	B	631	51%
54	<i>BRCA2</i>	c.2926T>A	p.Ser976Thr	PB	91	51%
54	<i>BRCA2</i>	c.2927C>T	p.Ser976Phe	PB	91	51%
62	<i>BRCA2</i>	c.6281A>G	p.Tyr2094Cys	VUS	126	59%
62	<i>BRCA2</i>	c.1138del	p.Ser380ValfsTer19	P	308	51%

Código Amostra	Gene	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	Frequência ALT
64	<i>BRCA2</i>	c.7469T>C	p.Ile2490Thr	B	98	47%
64	<i>BRCA2</i>	c.5771_5774del	p.Ile1924ArgfsTer38	P	107	50%
66	<i>BRCA2</i>	c.8503T>C	p.Ser2835Pro	B	1007	50%
67	<i>BRCA2</i>	c.6443C>A	p.Ser2148Tyr	VUS/PB	444	49%

Anexo 08: Variantes germinativas identificadas no gene *TP53*.

Código Amostra	Gene	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	Frequência ALT
1	<i>TP53</i>	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	312	57%
2	<i>TP53</i>	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	834	100%
3	<i>TP53</i>	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	424	100%
4	<i>TP53</i>	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	349	58%
5	<i>TP53</i>	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	859	100%
6	<i>TP53</i>	c.139C>T	p.Pro47Ser	B	1211	42%
7	<i>TP53</i>	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	384	100%
8	<i>TP53</i>	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	615	100%
9	<i>TP53</i>	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	440	68%
10	<i>TP53</i>	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	288	57%
11	<i>TP53</i>	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	186	100%
12	<i>TP53</i>	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	271	100%
13	<i>TP53</i>	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	519	59%
14	<i>TP53</i>	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	282	100%
16	<i>TP53</i>	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	440	100%

Código Amostra	Gene	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	Frequência ALT
17	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	408	100%
18	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	801	100%
20	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	1106	100%
25	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	1472	100%
27	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	374	100%
29	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	77	64%
31	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	406	100%
32	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	406	99%
33	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	416	99%
34	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	599	51%
36	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	1590	100%
38	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	179	100%
40	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	578	100%
42	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	683	51%
43	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	695	100%
44	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	1329	62%
45	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	464	100%
47	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	49	67%
48	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	323	64%
50	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	789	100%
52	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	477	100%
54	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	79	100%
55	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	447	100%
56	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	781	100%
57	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	443	100%
58	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	849	55%
59	TP53	c.869G>A	p.Arg290His	B	338	49%

Código Amostra	Gene	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	Frequência ALT
60	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	514	100%
62	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	518	100%
63	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	352	100%
65	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	529	71%
67	TP53	c.215C>G	p.Pro72Arg	B	547	100%

Anexo 09: Variantes somáticas identificadas no gene *BRCA1*.

Código Amostra	Gene	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	Frequência ALT
4	<i>BRCA1</i>	c.668del	p.Lys223ArgfsTer11	P	2339	2%
8	<i>BRCA1</i>	c.3600_3619del	p.Gly1201GlufsTer11	P*	795	8%
10	<i>BRCA1</i>	c.1952A>G	p.Lys651Arg	P*	2241	0%
15	<i>BRCA1</i>	c.2637del	p.Glu880ArgfsTer13	P	237	5%
40	<i>BRCA1</i>	c.4900A>G	p.Ser1634Gly	PB	1799	41%
40	<i>BRCA1</i>	c.3548A>G	p.Lys1183Arg	PB	1981	40%
40	<i>BRCA1</i>	c.3113A>G	p.Glu1038Gly	PB	1741	44%
40	<i>BRCA1</i>	c.2612C>T	p.Pro871Leu	PB	913	43%
43	<i>BRCA1</i>	c.1067A>G	p.Gln356Arg	B	884	37%
57	<i>BRCA1</i>	c.5212G>A	p.Gly1738Arg	P	2674	80%
67	<i>BRCA1</i>	c.2637del	p.Glu880ArgfsTer13	P	432	3%

Anexo 10: Variantes somáticas identificadas no gene *BRCA2*.

Código Amostra	Gene	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	Frequência ALT
12	<i>BRCA2</i>	c.5462A>G	p.Lys1821Arg	VUS	615	2%
12	<i>BRCA2</i>	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	P*	1517	1%
15	<i>BRCA2</i>	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	P*	1569	2%
20	<i>BRCA2</i>	c.7469T>C	p.Ile2490Thr	B	305	52%
33	<i>BRCA2</i>	c.8008T>C	p.Ser2670Pro	VUS	2173	1%
33	<i>BRCA2</i>	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	P*	2365	1%
34	<i>BRCA2</i>	c.3860del	p.Asn1287IlefsTer6	P	453	2%
34	<i>BRCA2</i>	c.8021del	p.Lys2674ArgfsTer2	P	1325	2%
35	<i>BRCA2</i>	c.1528G>T	p.Glu510*	P	303	72%
35	<i>BRCA2</i>	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	P*	2288	1%
36	<i>BRCA2</i>	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	P*	1770	2%
38	<i>BRCA2</i>	c.8021del	p.Lys2674ArgfsTer2	P	2179	2%
43	<i>BRCA2</i>	c.8021del	p.Lys2674ArgfsTer2	P	1926	1%
49	<i>BRCA2</i>	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	P*	740	2%
54	<i>BRCA2</i>	c.8021del	p.Lys2674ArgfsTer2	P	1336	2%
54	<i>BRCA2</i>	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	P*	1409	1%
56	<i>BRCA2</i>	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	P*	2832	1%
60	<i>BRCA2</i>	c.8021del	p.Lys2674ArgfsTer2	P	1543	2%
60	<i>BRCA2</i>	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	P*	1620	1%
62	<i>BRCA2</i>	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	P*	1414	2%
66	<i>BRCA2</i>	c.8021A>G	p.Lys2674Arg	P*	1836	1%
66	<i>BRCA2</i>	c.8680C>T	p.Gln2894*	P	473	9%

Anexo 11: Variantes somáticas identificadas no gene *TP53*.

Código Amostra	Gene	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	Frequência ALT
1	<i>TP53</i>	c.536A>G	p.His179Arg	VUS/P	2703	69%
2	<i>TP53</i>	c.916C>T	p.Arg306Ter	PP	86	50%
3	<i>TP53</i>	c.584T>C	p.Ile195Thr	PP	83	73%
4	<i>TP53</i>	c.421T>G	p.Cys141Gly	PP	1137	60%
5	<i>TP53</i>	c.455del	p.Pro152ArgfsTer18	P	2013	64%
5	<i>TP53</i>	c.85A>G	p.Asn29Asp	PB	2007	1%
6	<i>TP53</i>	c.842A>T	p.Asp281Val	PP	77	36%
7	<i>TP53</i>	c.659A>G	p.Tyr220Cys	PP	526	59%
9	<i>TP53</i>	c.493C>T	p.Gln165*	P	144	90%
10	<i>TP53</i>	c.743G>A	p.Arg248Gln	PP	2174	74%
11	<i>TP53</i>	c.752T>A	p.Ile251Asn	VUS	754	78%
12	<i>TP53</i>	c.578A>G	p.His193Arg	PP	555	61%
16	<i>TP53</i>	c.818G>A	p.Arg273His	PP	355	95%
17	<i>TP53</i>	c.267del	p.Ser90ProfsTer33	PP	1638	90%
23	<i>TP53</i>	c.856G>A	p.Glu286Lys	PP	357	12%
27	<i>TP53</i>	c.637C>T	p.Arg213*	P	135	96%
30	<i>TP53</i>	c.780del	p.Ser261ValfsTer84	P*	206	75%
31	<i>TP53</i>	c.764_766del	p.Ile255del	PP	218	41%
32	<i>TP53</i>	c.559+2T>G	x	P*	247	83%
33	<i>TP53</i>	c.517G>T	p.Val173Leu	PP	152	56%
35	<i>TP53</i>	c.732_733insCATGCG	p.Gly244_Gly245insHisAla	P*	358	54%

Código Amostra	Gene	HGVSc	HGVSp	Classificação	DP	Frequência ALT
42	<i>TP53</i>	c.988del	p.Leu330PhefsTer15	P*	400	16%
43	<i>TP53</i>	c.844C>T	p.Arg282Trp	PP	757	3%
48	<i>TP53</i>	c.742C>T	p.Arg248Trp	PP	1396	67%
49	<i>TP53</i>	c.372C>A	p.Cys124Ter	P	1095	90%
50	<i>TP53</i>	c.469G>T	p.Val157Phe	VUS	1476	45%
52	<i>TP53</i>	c.380C>T	p.Ser127Phe	VUS	179	47%
54	<i>TP53</i>	c.711G>C	p.Met237Ile	P	1196	64%
55	<i>TP53</i>	c.493C>T	p.Gln165*	P	679	47%
56	<i>TP53</i>	c.797G>A	p.Gly266Glu	PP	623	91%
57	<i>TP53</i>	c.733G>A	p.Gly245Ser	PP	837	64%
60	<i>TP53</i>	c.488A>G	p.Tyr163Cys	PP	102	70%
63	<i>TP53</i>	c.783-1G>T	x	PP	94	82%
64	<i>TP53</i>	c.272G>A	p.Trp91*	P*	186	33%
65	<i>TP53</i>	c.524G>A	p.Arg175His	PP	135	57%
67	<i>TP53</i>	c.833C>T	p.Pro278Leu	PP	130	35%
67	<i>TP53</i>	c.710T>A	p.Met237Lys	PP	127	31%

Legenda dos Anexos 06 - 11: B significa variante benigna; PB significa provavelmente benigna; P significa variante classificada como patogênica; P* significa variante sem classificação pelo ClinVar, mas considerada a princípio patogênica, conforme recomendação da ACMG; PP significa variante classificada como provavelmente patogênica; VUS/PB significa conflito de patogenicidade entre provavelmente benigna e VUS; VUS/P significa conflito de patogenicidade entre patogênica e VUS; DP significa profundidade de leitura na posição e ALT significa alelo alternativo.