

**UNIVERSIDADE O ESTADO DO AMAZONAS  
ESCOLA NORMAL SUPERIOR  
LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Iago Lucas Viana da Silva**

**INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES NO GENE *BRCA1* EM PACIENTES COM  
SUSPEITA DE CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO ATENDIDOS EM MANAUS  
AM**

**MANAUS-AM**

**2023**

**UNVIERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS**  
**ESCOLA NORMAL SUPERIOR**  
**LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Iago Lucas Viana da Silva**

**INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES NO GENE *BRCA1* EM PACIENTES COM  
SUSPEITA DE CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO ATENDIDOS EM MANAUS-  
AM**

**Trabalho de conclusão de curso  
apresentado à Universidade do  
Estado do Amazonas (UEA) como  
parte dos requisitos para obtenção  
do diploma de graduação.**

**Orientador: Cleiton Fantin  
Coorientadora: Diana Vieira Brito**

**MANAUS-AM**

**2023**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
**Sistema Integrado de Bibliotecas da Universidade do Estado do Amazonas.**

S586ii Viana da Silva, Iago Lucas  
INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES NO GENE  
BRCA1 EM PACIENTES COM SUSPEITA DE  
CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO ATENDIDOS EM  
MANAUS-AM / Iago Lucas Viana da Silva. Manaus :  
[s.n], 2023.  
28 f.: color.; 30 cm.

TCC - Licenciatura em ciências Biológicas -  
Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2023.  
Inclui bibliografia  
Orientador: Cleiton Fantin  
Coorientador: Diana Vieira Brito

1. Doenças Genéticas . 2. SNV. 3. Gene Supressor  
Tumoral. I. Cleiton Fantin (Orient.). II. Diana Vieira Brito  
(Coorient.). III. Universidade do Estado do Amazonas. IV.  
INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES NO GENE BRCA1  
EM PACIENTES COM SUSPEITA DE CÂNCER DE  
MAMA HEREDITÁRIO ATENDIDOS EM MANAUS  
AM

**Iago Lucas Viana da Silva**

**INVESTIGAÇÃO DE VARIANTES NO GENE *BRCA1* EM PACIENTES COM  
SUSPEITA DE CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO ATENDIDOS EM MANAUS-  
AM**

Trabalho de conclusão de curso  
apresentado à Universidade do  
Estado do Amazonas (UEA) como  
parte dos requisitos para obtenção  
do diploma de graduação.

**Orientador: Cleiton Fantin**  
**Coorientadora: Diana Vieira Brito**

**Aprovado em 02/03/2023**

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Dra. Ieda Hortêncio Batista**



---

**Dr. André Miasato Higa**



---

**Dr. Cleiton Fantin**

*Dedico esse trabalho à minha mãe e à minha avó (in memoriam)*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus colegas de laboratório por todo auxílio nas atividades e por todas confraternizações, até aquelas que eu faltei.

Ao meu orientador Cleiton Fantin por todos os ensinamentos e contribuições para meu crescimento acadêmico.

A minha coorientadora Diana Brito por ter me ensinado tudo que eu precisei para chegar até aqui, por ter me orientado da melhor forma possível, por ter sido uma pessoa extraordinária e indispensável no meu crescimento como cientista e por não desistir de mim mesmo eu não indo para a comemoração de aniversário dela no laboratório.

Aos meus amigos por me acompanharem durante toda minha jornada, em especial ao Micael e ao Vinicius por todo apoio. E agradeço a minha companheira Arleise Cristina por todos esses meses me ajudando em tudo e me apoiando durante essa finalização da primeira etapa da minha vida acadêmica.

À Universidade do Estado do Amazonas pelo espaço cedido para as atividades laboratoriais.

As minhas tias por me ajudarem e estarem comigo nos momentos mais difíceis que passei nesses longos últimos anos.

Ao meu cachorro por todas as vezes que ele colocou a bolinha nos meus pés e me obrigou a deixar de estudar para brincar com ele

“É preciso ter o caos dentro de si para gerar uma estrela cintilante”

Friedrich Nietzsche

## RESUMO

O câncer é uma doença genética que envolve múltiplos fatores que levam a sua formação, sendo considerada uma das principais doenças da atualidade. O tipo de câncer que mais acomete a população feminina é o câncer de mama (CM), o qual, além de apresentar uma alta taxa de mortalidade, também é capaz de gerar sequelas físicas e psicológicas de difícil recuperação. Um dos fatores de risco para esse tipo de câncer é o histórico familiar, o qual aumenta as chances de acometimento em idades precoces, sendo fortemente relacionado à ocorrência de mutações em genes de predisposição. O gene *BRCA1* é o principal responsável pelos casos de câncer de mama hereditário. A identificação de mutações nesse gene é capaz de fornecer dados epidemiológicos a respeito do perfil de casos de CM hereditário em uma região. Na Região Norte do Brasil, porém, ainda não há informações expressivas sobre esse tema. Desse modo, o objetivo desse estudo foi investigar as variantes presentes em cinco regiões do gene *BRCA1* em indivíduos com suspeita de câncer de mama hereditário. Um total de 48 participantes foram selecionados nesse estudo. Foi realizada a extração do DNA genômico, seguida da reação de PCR dos éxons 5, 6, 12, 17 e 18. Após a PCR, as amostras passaram pela purificação com PEG 8000. A reação de sequenciamento foi realizada com o Kit *BigDye* e a leitura das sequências foi feita no sequenciador ABI 3130XL. As sequências obtidas foram lidas no programa *BioEdit*. Não foram identificadas mutações nas regiões estudadas. Sugere-se que novos estudos sejam feitos visando o sequenciamento completo do gene *BRCA1*, além de estudos envolvendo outros genes de predisposição ao câncer de mama.

Palavras-chave: doenças genéticas, SNVs, gene supressor tumoral, hereditariedade.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**BARD1 – Proteína BARD1**

***BRCA1* – Gene Breast Cancer 1**

**BRCA1 – Proteína BRCA1**

**BRCA2 Gene Breast Cancer 2**

**BRCT – BRCA1 C-Terminal**

**CC – Coiled Coil**

**CM – Câncer de Mama**

**CO – Câncer de Ovário**

**CTAB – Brometo de Cetrimônio**

**DNTP – Desoxiribonucleotídeos**

**EDTA – Etileno Diamino Tetracético**

**INPA – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia**

**LTBM – Laboratório Temático de Biologia Molecular**

**NCBI – National Center of Biotechnology information**

**NCCN – National Comprehensive Cancer Network**

**PCR – Reação em cadeia da Polimerase**

**PEG – Polietilenoglicol**

**RF – Ring Finger**

**RH – Recombinação Homóloga**

**SNV – Variante de Nucleotídeo Único**

**TA – Temperatura de Anelamento**

**TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**UEA – Universidade do Estado do Amazonas**

**VUS – Variante de Significado Incerto**

**WT – Wild Type**

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS .....	11
2.1 OBJETIVO GERAL .....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER .....	11
3.2 O CÂNCER DE MAMA .....	12
3.3 O GENE <i>BRCA1</i> .....	12
3.4 PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA.....	14
3.5 ESTUDOS DE RASTREIO DE SNVS NO BRASIL].....	14
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	15
4.1 COLETA DAS AMOSTRAS.....	15
4.2 EXTRAÇÃO DO DNA .....	16
4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE .....	16
4.4 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.....	18
4.5 ELETROFORESE .....	18
4.6 SEQUENCIAMENTO.....	18
4.7 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS.....	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	19
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	22
7 REFERÊNCIAS .....	23

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama (CM) é a doença genética que mais acomete a população feminina do Brasil e o segundo tipo de câncer mais incidente no mundo. No Brasil foram estimados 66.280 novos casos no ano de 2021, com uma média de 18 mil mortes. Cerca de 90% desses casos são considerados esporádicos, estando associados a fatores que aumentam o risco de desenvolvimento da doença (INCA, 2021), enquanto 10% dos casos estão associados à herança de mutações germinativas em famílias com histórico para CM, que predispõem o indivíduo ao surgimento do câncer (VENKITARAMAN, 2014).

O principal gene que atua no desenvolvimento do CM hereditário é o supressor tumoral *BRCA1*, por desempenhar um papel importante no reparo de erros no DNA através da recombinação homóloga (VENKITARAMAN, 2002). Variantes de nucleotídeo único (SNVs) que ocorrem nesse gene são capazes de alterar o funcionamento da proteína impedindo que o seu papel seja desempenhado. Essas variantes são classificadas de acordo com seu tipo molecular e sua significância clínica (PHAROAH, 1997).

Estudos de identificação das SNVs envolvidas no CM hereditário vêm revelando cada vez mais o perfil mutacional de determinadas regiões do Brasil. Poucos, porém, têm sido realizados no Estado do Amazonas (LOURENÇO, 2004; DUFLOTH *et al.*, 2005; ROCHA *et al.*, 2020). O pioneiro nos estudos de rastreamento do gene *BRCA1* no Brasil foi Lourenço (2004) que identificou uma variante patogênica em 7 indivíduos de um grupo de 44 participantes. No ano seguinte, Dufloth *et al.* (2005) identificaram a mesma variante encontrada no estudo anterior em um paciente de um grupo de 31, que receberam tratamento no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, em Campinas-SP. Palmero *et al.* (2018) realizaram o rastreamento de mutações com participantes de todas as regiões do Brasil, onde identificaram 126 SNVs, nas quais, duas foram encontradas no Estado do Amazonas. Rocha *et al.* (2020) investigaram 53 pacientes atendidos na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON) e identificaram 4 variantes, sendo uma delas patogênica, sendo este o primeiro trabalho realizado com pacientes exclusivamente do Amazonas.

Pesquisas envolvendo o rastreamento e caracterização de mutações do *BRCA1* na população da Região Norte ainda são escassas. Com base nesse cenário, o presente estudo visa investigar a prevalência de mutações em parte do gene *BRCA1* em pacientes diagnosticados com CM e com suspeita de predisposição hereditária, atendidos na FCECON, a fim de contribuir com dados epidemiológicos sobre o perfil mutacional de SNVs desse gene na população do

Amazonas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar as SNVs presentes em 5 regiões do gene *BRCA1* em pacientes com suspeita de câncer de mama hereditário atendidos em Manaus-AM

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Identificar SNVs a partir do Sequenciamento de Sanger;
- Classificar as SNVs encontradas pela comparação com bancos de dados;
- Verificar se as SNVs podem estar relacionadas com o CM hereditário.

## **3 REVISÃO DA LITERATURA**

### **3.1 ASPECTOS GERAIS DO CÂNCER**

O câncer é um conjunto de doenças genéticas que compartilham um mecanismo de formação próprio, a alteração do funcionamento de dois tipos de genes, os supressores tumorais e os oncogenes (HANAHAN, 2022). Esses genes regulam o ciclo e a divisão celular de modo a reparar corretamente quaisquer erros que ocorram no material genético além de contribuir com o crescimento tecidual. Células que são afetadas por alguma alteração nesses genes adquirem a capacidade de contornar sua morte programada e se multiplicar deliberadamente gerando uma variante maligna (TURAJLIC, 2019).

A formação do câncer ocorre com a multiplicação contínua dessas células malignas e a migração para outros tecidos do corpo, conhecida como metástase, debilitando o paciente e gerando múltiplos efeitos físicos e psicológicos. Essa doença é uma das principais causas de mortes globais e estima-se que até 2030 haja um aumento de 45% desse número de óbitos com um número de casos estimados de 15,5 milhões para o mundo (WHO, 2022).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) são esperados 704 mil novos casos de câncer para cada ano do triênio 2023-2025 no Brasil, com cerca de 70% de incidência na Região Sul. Estima-se a ocorrência para 21 tipos dessa doença e dentre estes, o câncer de mama feminino é um dos mais incidentes no território Nacional com 2,3 milhões de casos novos (INCA, 2022).

### 3.2 O CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a neoplasia maligna que mais acomete a população feminina do Brasil, excluindo o câncer de pele do tipo não melanoma, e a que mais contribuiu para os casos de óbito nessa população. Essa neoplasia acomete o órgão mama, um órgão par situado no musculo peitoral maior com estratificações características dos tipos de tecidos que compõem as estruturas de ductos e ácinos, além do estroma que sustenta e dá forma ao órgão. Os sintomas mais comuns são o surgimento de nódulo, geralmente indolor, duro e irregular, edemas cutâneos semelhantes a casca de laranja, dor e alterações no mamilo, podendo surgir linfonodos palpáveis nas axilas (INCA, 2022).

Globalmente, no ano de 2020, houve cerca de 685.000 mortes para o CM e um total de 7,8 milhões de mulheres diagnosticadas com essa doença, sendo este o câncer mais temido entre elas devido as suas sequelas físicas e psicológicas (ANDERS *et al.*, 2009). No Brasil, o CM também é o mais incidente nas mulheres. Para cada ano do triênio 2023-2025, foram estimados 73.610 novos casos e um total de 16,43 óbitos a cada 100.000 mulheres (INCA, 2021).

O rastreio precoce dos sintomas pode garantir um prognóstico melhor e uma taxa de sobrevivência maior quando comparado ao CM diagnosticado de modo tardio. Alguns fatores de risco participam desse processo carcinogênico de modo extrínseco, tais como tabagismo, alcoolismo, hábitos de vida e radiação. Por outro lado, outros fatores também podem contribuir intrinsecamente com o desenvolvimento tumoral, principalmente a idade, a etnia e o histórico familiar (BAN *et al.*, 2014; KAMIŃSKA *et al.*, 2015).

O histórico familiar para o CM pode indicar a herança de alterações nas sequências nucleotídicas de genes envolvidos na supressão tumoral e no ciclo celular (VAZ, 2022). Cerca de 10% dos casos de CM são hereditários, sendo o principal responsável por estes casos o gene denominado *BRCA1* (MEHRGOU e AKOUCHEKIAN, 2016).

### 3.3 O GENE *BRCA1*

O *BRCA1* foi o primeiro gene descrito de susceptibilidade para o CM, o qual foi descoberto a partir de um estudo envolvendo 126 famílias afetadas por esta neoplasia, sendo posteriormente caracterizado e tendo sua estrutura e função elucidada. Este supressor tumoral possui cerca de 81 Kb e 23 éxons que codificam uma proteína pleiotrópica com 1863 aminoácidos. A principal função dessa proteína é a manutenção da quebra da dupla fita de DNA por meio do mecanismo de Recombinação Homóloga (RH) (HALL *et al.*, 1990; MIKI *et al.*,

1994).

A proteína BRCA1 é dotada de vários domínios funcionais que interagem com outras proteínas do ciclo celular. O domínio *Ring Finger* (RF) possui relação intrínseca com a proteína BARD1 e juntos formam um heterodímero capaz de sinalizar processos importantes dentro da célula. A jusante de RF se encontra um domínio duplicado, caracterizado por repetições em tandem, que possibilita a interação com proteínas de reparo de danos ao DNA denominado BRCA1 C-Terminal (BRCT). Outro domínio importante na proteína é o *Coiled Coil* (CC) capaz de se associar com a proteína BRCA2, que também desempenha um papel relevante nos casos de CM (CLARK *et al.*, 2012; TARSOUNAS e SUNG, 2020; DAI *et al.*, 2021).

Mutações no DNA podem afetar a integridade da proteína BRCA1 e ocasionar o aumento da predisposição ao CM. A presença de um histórico familiar é um indicativo de que as mutações estejam na linhagem de células germinativas (GOLUBEVA *et al.*, 2019).

As principais mutações no gene *BRCA1* são as SNVs, as quais podem ser de diferentes tipos moleculares (*missense*, *nonsense* e *frameshift*). Mutações do tipo *missense* ocorrem quando a troca de uma base nitrogenada acomete a proteína com a mudança de um aminoácido. As mutações do tipo *nonsense* são causadas após a troca de uma base nitrogenada acarretar o surgimento de um códon de parada prematura, causando assim uma proteína truncada. Enquanto que as mutações do tipo *frameshift* são causadas a partir da inserção ou deleção de bases que alterem o quadro de leitura. As SNVs do *BRCA1* são classificadas de acordo com o seu significado clínico, podendo ser benignas, provavelmente benignas, patogênicas, provavelmente patogênicas e Variantes de Significado Incerto (VUS, do inglês) (BROOKES, 1999).

De acordo com os bancos de dados de variantes *Clinvar do National Center for Biotechnology Information* (NCBI) e *Varsome*, foram encontradas cerca de 12.000 SNVs para o gene *BRCA1* até o momento, sendo que as VUS correspondem a mais da metade desse total, seguidas pelas variantes patogênicas (NCBI, 2023).

O risco de desenvolver o CM em portadores de mutações patogênicas no gene *BRCA1* é de 60 a 70%. A incidência dessas mutações é variável em diferentes grupos étnicos ao redor do mundo (NYBERG *et al.*, 2022). Essa característica está fortemente associada ao efeito fundador de algumas variantes possuem em determinadas populações, como por exemplo a mutação *frameshift* presente no éxon 20 do gene *BRCA1*, a qual possui um efeito fundador na população judia Ashkenazi e também é a mutação mais comum na população brasileira (TONIN *et al.*, 1996).

### 3.4 PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA

O histórico familiar é um forte indicador da presença de mutações associadas ao CM hereditário, assim como a história do paciente quanto ao acometimento de outros tipos de câncer, tais como Câncer de Ovário (CO). As abordagens que visam identificar indivíduos com alto risco de portarem uma variante patogênica levam em consideração esses aspectos descritos anteriormente, tendo como base o parentesco com familiares que foram acometidos com outros tipos de câncer (ESCOBAR, 2011).

Um dos principais métodos de seleção foram publicados pela National Comprehensive Cancer Network (NCCN) em seu Guia de Práticas Clínicas em Oncologia para Acesso a Pacientes de Alto Risco Genético/Familiar para CM e CO. Seus critérios de inclusão são: CM diagnosticados precocemente (<45 anos); diagnóstico antes dos 50 anos com parente diagnosticado com CM antes dos 50 ou um parente próximo com CO; dois CMs primários, onde um destes tenha sido diagnosticado antes dos 50 anos; histórico familiar envolvendo dois parentes com CM ou CO; parente próximo do sexo masculino com CM; e história pessoal para CO (NCCN, 2023).

Assim como os métodos de seleção dos pacientes é variável, os métodos de rastreamento das variantes também são, sendo que nenhum método particular garante a identificação de todas as possíveis mutações (sejam SNVs ou rearranjos no gene BRCA1). Dentre os métodos utilizados mundialmente, o sequenciamento direto ainda é um dos principais (KWON et al., 2019).

### 3.5 ESTUDOS DE RASTREIO DE SNVS NO BRASIL]

No Brasil, o estudo pioneiro na identificação de variantes no gene BRCA1 em pacientes com histórico familiar de CM foi o de LOURENÇO (2004), que conduziu um estudo de sequenciamento de todo o gene BRCA1 em 47 pacientes da Região Sudeste do Brasil, identificando mutações patogênicas em 15% destes pacientes. Em seguida, DUFLOTH et al. (2005) sequenciou parcialmente o gene BRCA1 em 31 pacientes dessa mesma região e identificou uma mutação patogênica em um deles. PALMERO (2007) realizou o primeiro estudo mais amplo, com 9234 mulheres da Região Sul do Brasil, a partir de uma investigação no gene BRCA1 para avaliação do risco hereditário para o câncer. Posteriormente, ESTEVES (2009) analisou a prevalência de mutações no BRCA1 em 612 pacientes de três regiões, Sul, Sudeste e Nordeste.

A primeira citação de mutações no BRCA1 em pacientes da Região Norte do Brasil foi no trabalho de PALMERO (2018), que fez uma compilação de dados de centros de saúde públicos ao longo de todo o território Nacional, a fim de obter um panorama das mutações germinativas no Brasil. Nesse estudo, foram obtidos laudos com a descrição de mutações patogênicas em 649 indivíduos, sendo duas destas em pacientes do Amazonas. Mais recentemente, ROCHA, BENZAQUEN e FANTIN (2020) foram pioneiros ao investigar mutações no gene BRCA1 especificamente no Estado do Amazonas, no qual esse gene foi sequenciado parcialmente em 53 pacientes.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 COLETA DAS AMOSTRAS**

O presente trabalho foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), sob o parecer de número 16360913.0.0000.0004. Este estudo é uma continuação do trabalho de ROCHA, BENZAQUEN e FANTIN (2020). O recrutamento dos pacientes foi realizado no ano de 2014. Para a seleção dos participantes foram utilizados os seguintes parâmetros fornecidos pela National Comprehensive Cancer Network (NCCN):

- CM diagnosticado em idade precoce (< 45 anos);
- Um parente de primeiro grau diagnosticado com CM precoce ou parente de primeiro grau diagnosticado com Câncer de Ovário (CO);
- Dois parentes de primeiro grau com CM, sendo um deles de maneira precoce;
- Ao menos dois parentes de primeiro grau com CM ou CO;
- Parente do sexo masculino com CM;
- Histórico pessoal de CO.

Os pacientes preencheram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e ficaram cientes das finalidades científicas do estudo e de que não haveria a emissão de laudos. O sangue periférico foi coletado em tubo com EDTA e armazenado a -20°C nas dependências do Laboratório de Genética Humana da UEA para a extração de DNA e os testes genéticos posteriores.



## 4.2 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA genômico de 48 pacientes foi extraído através do protocolo de CTAB (Brometo de Cetrimônio) 2%, adaptado de DOYLE e DOYLE (1991) para a extração a partir de amostras de sangue. Foram transferidos 250  $\mu$ L da amostra para um microtubo de 1,5 mL e o mesmo volume de etanol 100% foi adicionado para a coagulação do sangue. Após a secagem do etanol, foram adicionados 500  $\mu$ L da solução de CTAB 2% para o rompimento das membranas celulares e, conseqüentemente, para a liberação do DNA. As etapas seguintes seguiram o protocolo padrão.

A avaliação da concentração e qualidade das amostras de DNA foi feita no espectrofotômetro Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific) ao pipetar 1 $\mu$ L de uma substância controle e, em seguida, 1 $\mu$ l das amostras. Observou-se as medidas de quantificação de comprimentos de onda de 260 e 280 nanômetros onde, se o quociente for maior que 2 a amostra é considerada livre de contaminantes. A integridade do DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

## 4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

A reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi utilizada para amplificar cinco éxons do gene *BRCA1*. Esses éxons foram escolhidos por estarem dentro ou próximos aos domínios da proteína, uma vez que SNVs nessas posições teriam riscos maiores de afetar o funcionamento da proteína.

Para a amplificação desses éxons, foram selecionados *primers* nas regiões flangeadoras, cobrindo parcialmente os íntrons a montante e a jusante de cada éxon estudado (Tabela 1).

Tabela 1 Primers utilizados nesse estudo

Éxon	Primers	Temperatura de Anelamento (°C)	Tamanho (pb)
5*	F:GCTTGTAATTCACCTGCCAT R:TTCCTACTGTGGTTGCTTCC	58	269
6**	F:AGGTTTTCTACTGTTGCTGACT R:AAAAGGTCTTATCACCACGTCA	66	308
12*	F:GTCCTGCCAATGAGAAGAAAAAG R:TGTCAGCAAACCTAAGAATGT	54	356
17*	F:GTGTAGAACGTGCAG R:TCGCCTCATGTGGTT	58	324
18*	F:GGCTCTTTAGCTTCTTAGGAC R:GAGACCCATTTCCAGCATC	62	354

\*GROSS *et al* (2000)

\*\*ESCOBAR (2011)

A reação foi realizada com os seguintes reagentes e suas respectivas concentrações finais: Tampão (1 X), Cloreto de Magnésio (2 mM), dNTPs (0,2 mM), *Primers* F e R (0,2 mM), DNA (50 ng ao todo) e Taq DNA Polimerase (0,5 U) (*Invitrogen*). As condições de ciclagem estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2 Condições de ciclagem para a PCR

Etapa	Tempo	Ciclos	Temperatura (°C)
<b>Desnaturação Inicial</b>	5 minutos	-	94
<b>Desnaturação</b>	35 segundos		94
<b>Anelamento</b>	40 segundos	40	TA*
<b>Extensão</b>	40 segundos		72
<b>Extensão Final</b>	5 minutos	-	72

\*As temperaturas de anelamento específicas para cada par de *primers* estão descritas na tabela 1.

#### 4.4 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR

Os produtos de PCR foram purificados com a solução de PEG (Polietilenoglicol 8000) 20%, para a eliminação do excesso de reagentes (SAMBROOK e GREEN, 1989). Posteriormente, foi realizada a lavagem com Etanol 80% e o DNA precipitado foi ressuspendido em Água Ultra Pura (*Invitrogen*).

#### 4.5 ELETROFORESE

A fim de se confirmar o tamanho dos fragmentos obtidos durante a PCR e purificação, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com *GelRed* (*Biotium*). O marcador de peso molecular 100pb (*Invitrogen*) foi utilizado para a estimativa dotamanho desses produtos.

#### 4.6 SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento dos éxons foi feito pelo método de Sanger de forma bidirecional (*primers* F e R, separadamente). A reação de sequenciamento foi realizada em microplacas do tipo meia borda (*Kasvi*) com o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*), seguindo-se o protocolo do fabricante. As condições de ciclagem utilizadas estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 Condições de ciclagem para o sequenciamento

<b>Etapa</b>	<b>Tempo</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura (°C)</b>
<b>Desnaturação Inicial</b>	2 minutos	-	96
<b>Desnaturação</b>	30 segundos		96
<b>Anelamento</b>	20 segundos	40	50
<b>Extensão</b>	4 minutos		60

Após a reação de sequenciamento, foi realizada a precipitação dos produtos na microplaca com uma solução de EDTA 125 mM e Etanol Absoluto, seguida da lavagem do

DNA precipitado com Etanol 70 %. Ao término, foram adicionados 10  $\mu$ L de formamida *HiDi* para a ressuspensão do DNA.

A leitura das sequências foi realizada por eletroforese capilar no analisador genético ABI 3130xl (*Applied Biosystems*), localizado no Laboratório Temático de Biologia Molecular do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LTBM-INPA).

#### 4.7 ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS

A qualidade das sequências obtidas e a presença de variantes foi verificada por meio da análise dos eletroferogramas no programa *BioEdit* 7.2.6. As sequências obtidas foram comparadas com a sequência referência depositada no GenBank do NCBI (NG\_012772.3) para a identificação das variantes.

Os bancos de dados *Clinvar* (NCBI) e *Varsome* foram utilizados para classificar as variantes de acordo com seu significado clínico: benigno, provavelmente benigno, patogênica, provavelmente patogênica ou VUS, e seu tipo molecular: *missense*, *nonsense* e *frameshift*.

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As extrações de DNA resultaram em amostras íntegras e de boa qualidade. A amplificação por PCR teve seu êxito verificado por meio da visualização de fragmentos do tamanho esperado na análise por eletroforese em gel de agarose (Figura 1).

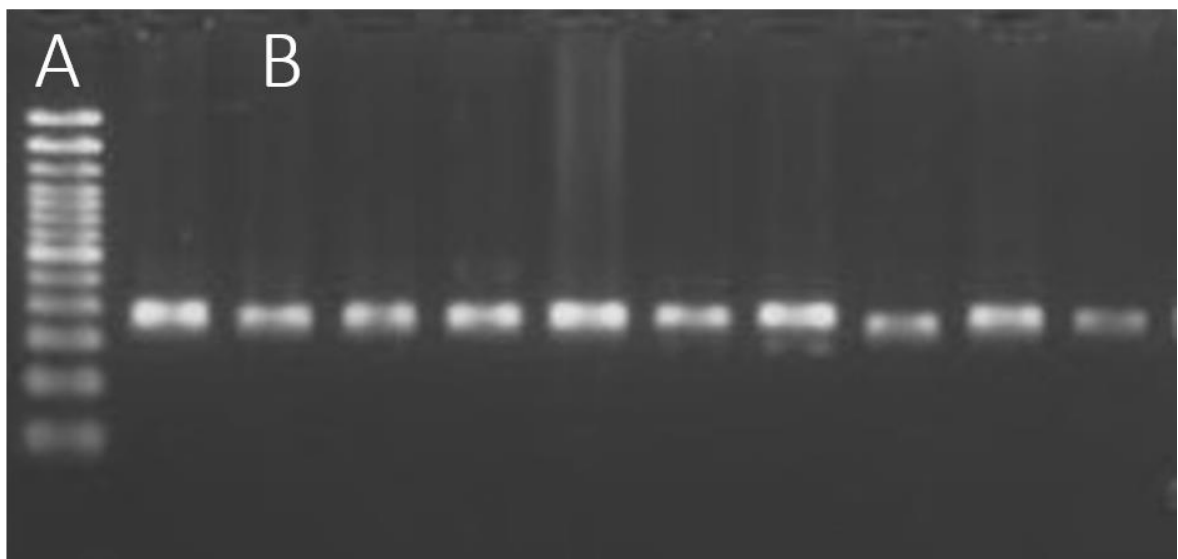


Figura 1 Gel de agarose 1,5%. A comparação com o marcador de peso molecular (A) demonstra a amplificação de um produto de PCR com tamanho entre 300 e 400 pares de base (B), conforme o esperado nesse caso.

As sequências dos cinco éxons de interesse foram obtidas para todos os 48 pacientes. Por meio da análise dos eletroferogramas das sequências obtidas e da comparação com a sequência referência para o gene *BRCA1*, nenhuma variante foi identificada nas regiões estudadas (Figura 2). Os éxons estudados neste trabalho se situam próximos ou internamente aos domínios funcionais da proteína. Os éxons 5 e 6 se situam imediatamente a jusante do principal domínio de interação, o domínio RF. O éxon 12, por sua vez, codifica o domínio CC. Por fim, os éxons 17 e 18 codificam a porção final do primeiro domínio BRCT. Mutações nessas regiões são capazes de alterar a função desses domínios e, conseqüentemente, comprometer a integridade e função da proteína (HUYTON, 2000; BRZOVIC, 2001).

A24 F17	TGTGTGCTAGAGGTAACCTCATGATAAATGGAATATTTGA TTTAA TTT CAGATGCTCGTGTA CAGTTT GCCAGAAAA CACCACA
A25 F17	TGTGTGCTAGAGGTAACCTCATGATAAATGGAATATTTGA TTTAA TTT CAGATGCTCGTGTA CAGTTT GCCAGAAAA CACCACA
A26 F17	TGTGTGCTAGAGGTAACCTCATGATAAATGGAATATTTGA TTTAA TTT CAGATGCTCGTGTA CAGTTT GCCAGAAAA CACCACA
A28 F17	TGTGTGCTAGAGGTAACCTCATGATAAATGGAATATTTGA TTTAA TTT CAGATGCTCGTGTA CAGTTT GCCAGAAAA CACCACA
A31 F17	TGTGTGCTAGAGGTAACCTCATGATAAATGGAATATTTGA TTTAA TTT CAGATGCTCGTGTA CAGTTT GCCAGAAAA CACCACA
A32 F17	TGTGTGCTAGAGGTAACCTCATGATAAATGGAATATTTGA TTTAA TTT CAGATGCTCGTGTA CAGTTT GCCAGAAAA CACCACA
Ref_seq_WT	TGTGTGCTAGAGGTAACCTCATGATAAATGGAATATTTGA TTTAA TTT CAGATGCTCGTGTA CAGTTT GCCAGAAAA CACCACA

Figura 2 Alinhamento de amostras juntamente com a sequência referência WT

Estudo anteriores já identificaram a presença de mutações nas regiões estudadas neste trabalho, evidenciando sua importância para os casos de CM hereditário. PALMERO (2018) em um estudo envolvendo múltiplos centros especializados em todas as regiões do Brasil, com exceção da Região Centro-Oeste, identificou uma série de mutações patogênicas nesses éxons: quatro mutações *missense* e duas variantes *frameshift* no éxon 5; três variantes *missense* e uma *frameshift* no éxon 12; duas *missense* no éxon 17; e duas *missense* e uma *frameshift* no éxon 18, todas patogênicas. Neste estudo foram identificadas duas mutações na região do Amazonas, entretanto não foram especificadas. FERNANDES *et al.* (2016) identificou as mesmas mutações descritas acima para os éxons 5, 7, 12 e 17, em um estudo envolvendo a caracterização de 349 famílias com histórico positivo para o CM. Porém, não foram analisadas famílias da Região Norte.

Estudos anteriores também investigaram a ocorrência de mutações no gene *BRCA1* por meio do sequenciamento parcial desse gene. DUFLOTH *et al.* (2005) foram os primeiros a sequenciar diferentes éxons do gene *BRCA1*, sendo eles o éxon 2, 3, 5, 11 e 20, onde identificaram uma mutação *frameshift* no éxon 20. Da mesma forma ESTEVES *et al.* (2009) reuniram mulheres com alto e médio risco de CM da Região Sudeste e identificaram variantes *frameshift* nos éxons 11 e 20. O sequenciamento parcial do *BRCA1* também foi realizado por GOMES *et al.* (2011) em 402 mulheres atendidas em um hospital público do

Rio de Janeiro. Foram identificadas duas mutações *frameshifts* nos éxons 11 e 20 desse gene, em mulheres com histórico familiar para CM e CO. Assim como o trabalho de ROCHA, BENZAQUEM e FANTIN (2020) que sequenciaram os éxons 2, 3, 8, 9, 13, 16, 19 e 20 identificando 2 variantes *missenses* e uma VUS nos éxons 13 e 16, e duas *frameshift* nos éxons 20. Porém, somente uma dessas mutações é patogênica, a qual foi encontrada em apenas uma paciente do estudo.

A presença de SNVs no gene *BRCA1* é substancialmente influenciada pelas características populacionais (BHASKARAN *et al.*, 2019). Diferentes etnias apresentam uma alta variabilidade na frequência de mutações associadas ao CM, podendo apresentar algumas mutações patogênicas específicas como as responsáveis pela maior parte dos casos desta neoplasia (TONIN *et al.*, 1996). A proporção desse tipo de variante em hispânicos, norte americanos e latinos é de 10% (DUTIL *et al.*, 2015). Este fato pode indicar que a ausência de mutações na população deste estudo é uma característica regional, onde o gene *BRCA1* não possui uma expressividade tão grande nos casos de CM hereditários quanto em outras populações. Entretanto, são necessários estudos de sequenciamento total do gene para averiguar essa hipótese.

Mesmo sendo o gene com maior participação nos casos de CM hereditário, outros genes desempenham funções parecidas com o *BRCA1*. Mutações patogênicas identificadas nos genes *CHEK2* e *TP53* contribuem também para essa neoplasia mamária (FELIX *et al.*, 2014; SAS, 2015). Outros genes de susceptibilidade ao CM com alta penetrância também foram identificados, tais como *PTEN*, *STK11* e *CDH1* (GONZALEZ *et al.*, 2009; TAN *et al.*, 2012). A contribuição genética para o CM pode ser observada ao realizar a investigação de variantes nesses demais genes de predisposição, uma vez que o *BRCA1* não era portador de nenhuma variante patogênica nos éxons estudados nesse estudo.

O caráter polimórfico do gene *BRCA1* torna este um importante alvo de rastreios moleculares de variantes, uma vez que o seu funcionamento afeta diretamente o ciclo celular, devido ao protagonismo deste gene no reparo aos danos da dupla fita de DNA (DENG, 2006). Sua contribuição ao CM se reflete na alta penetrância de suas variantes patogênicas e no seu protagonismo nos casos de CM em relação a outros genes, sendo este último uma característica regional que pode variar em cada população (SZABO e KING, 1997; FOULKES, 1998).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ausência de mutações nos éxons analisados neste estudo foi inesperada, uma vez que o gene *BRCA1* é o principal gene de predisposição ao CM e já foram relatadas variantes patogênicas nesses éxons em pacientes de outras Regiões do país. Ainda é necessária a realização do sequenciamento completo do *BRCA1* em estudos posteriores, para averiguar a sua real participação dentro da população estudada, bem como a investigação da presença de variantes nos demais genes de predisposição, a fim de compreender-se melhor sobre as mutações responsáveis pelos casos de CM hereditário da população da Região Norte do Brasil.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALBERT, C. *et al.* BRCA1/BRCA2 pathogenic variant breast cancer: treatment and prevention strategies. **Annals of laboratory medicine**, v. 40, n. 2, p. 114-121, 2020.
- ANDERS, *et al.* BreastCancer Before Age 40 Years. **Seminars in Oncology**, 2009.
- ARNOLD, N. *et al.* A highly sensitive, fast, and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers. **Human mutation**, v. 14, n. 4, p. 333- 339, 1999.
- BAN, *et al.* Epidemiology of Breast Cancer. **Surgical Oncology Clinics of North America**, 2014.
- BHASKARAN, S. P. *et al.* Germline variation in BRCA1/2 is highly ethnic-specific: Evidence from over 30,000 Chinese hereditary breast and ovarian cancer patients. **International journal of cancer**, v. 145, n. 4, p. 962-973, 2019.
- BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177-186, 1999.
- BRUNONI, D. Aconselhamento genético. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 101-107, 2002.
- BRZOVIC, P. S. *et al.* BRCA1 RING domain cancer-predisposing mutations: structural consequences and effects on protein-protein interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, n. 44, p. 41399-41406, 2001.
- CASTRO, R. Câncer na mídia: uma questão de saúde pública. **Rev bras cancerol**, v. 55, n. 1, p. 41-8, 2009.
- CLARK e DOMCHEK. Clinical Management of Hereditary Breast Cancer Syndromes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, 2011.
- CLARK, S. L. *et al.* Structure-function of the tumor suppressor BRCA1. **Computational and structural biotechnology journal**, v. 1, n. 1, p. e201204005, 2012.



COSTA *et al.* Mortalidade por Câncer de Mama e Condições de Desenvolvimento Humano no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2019

DAI, L. *et al.* Structural insight into BRCA1-BARD1 complex recruitment to damaged chromatin. **Molecular Cell**, v. 81, n. 13, p. 2765-2777. e6, 2021.

DE CARVALHO, C. M. *et al.* Perfil de mutações germinativas em pacientes submetidas a aconselhamento genético para câncer hereditário de mama, ovário e endométrio, em Minas Gerais, Brasil. 2020.

DENG, C. BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 5, p. 1416-1426, 2006.

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

DUFLOTH, R. M. *et al.* Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 123, n. 4, p.192-197, 2005.

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

ESTEVES, V. F. *et al.* Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in families with medium and high risk of breast and ovarian cancer in Brazil. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 42, p. 453-457, 2009.

FELIX, G. E. S. *et al.* Germline mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population. **Human genome variation**, v. 1, n. 1, p. 1-8, 2014.

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

FOULKES, W. D. BRCA1 and BRCA2: penetrating the clinical arena. **The Lancet**, v. 352, n.9137, p. 1325-1326, 1998.

- GEBRIM e QUADROS. Editorial Rastreamento do câncer de mama no Brasil Breast cancer screening in Brazil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, 28(6), 319–323, 2010
- GOLUBEVA, V. A.; NEPOMUCENO, Thales C.; MONTEIRO, Alvaro NA. Germline missense variants in BRCA1: new trends and challenges for clinical annotation. **Cancers**, v. 11, n. 4, p. 522, 2019.
- GOMES, M. C. B. *et al.* Prevalência da mutação BRCA1 e BRCA2 em pacientes com câncer de mama em uma população do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Oncologia Clínica**, v. 8, n. 27, 2011.
- GONZALEZ, K. D. *et al.* Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1250-1256, 2009.
- GRIMES, D. A.; SCHULZ, K. F. An overview of clinical research: the lay of the land. **The lancet**, v. 359, n. 9300, p. 57-61, 2002.
- HALL *et al.* Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science**, 1990
- HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. **Cancer discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.
- HUYTON, T. *et al.* The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 460, n. 3-4, p. 319-332, 2000.
- INCA. O que causa o Câncer ?, 2021. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-caoa-cancer>>. Acesso em: 1 novembro 2021.
- INCA. Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro. 2022
- KAMIŃSKA *et al.* Breast cancer risk factors. **Menopausal Review**, 2015.
- ESCOBAR, Karina Augusto. **Determinação de mutações e polimorfismo nos genes BRCA1 e BRCA2 em pacientes com câncer de mama com indicação para teste genético**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

- KWON, Byung Su et al. Clinical and genetic characteristics of BRCA1/2 mutation in Korean ovarian cancer patients: a multicenter study and literature review. **Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association**, v. 51, n. 3, p. 941-950, 2019.
- LOURENÇO, J. J. E. A. BRCA1 mutations in Brazilian patients. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, n. 4, p. 500-504, 2004.
- MEHRGOU, A.; AKOUCHEKIAN, M. The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. **Medical journal of the Islamic Republic of Iran**, v.30, p. 369, 2016.
- MELO, T.. O aconselhamento genético na predisposição hereditária de câncer pela mutação dos genes BRCA1 e BRCA2. 2022.
- MIKI, Y. E. A. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science**, v. 266, n. 5182, p. 66-71, 1994.
- NCBI. National Center of Biotechnology Information. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>> acesso em: 26/02/2023
- NYBERG, Tommy; TISCHKOWITZ, Marc; ANTONIOU, Antonis C. BRCA1 and BRCA2 pathogenic variants and prostate cancer risk: systematic review and meta-analysis. **British journal of cancer**, v. 126, n. 7, p. 1067-1081, 2022.
- PALMERO, E. I. *et al.* Screening for germline BRCA1, BRCA2, TP53 and CHEK2 mutations in families at-risk for hereditary breast cancer identified in a population-based study from Southern Brazil. **Genetics and molecular biology**, v. 39, p. 210-222, 2016.
- PALMERO, E. I. *et al.* The germline mutational landscape of BRCA1 and BRCA 2 in Brazil. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 9188, 2018.
- PALMERO, E. I. Identificação e caracterização de pacientes em risco para câncer de mama hereditário no sul do Brasil. 2007.

- PHAROAH, P. *et al.* Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta analysis. **International journal of cancer**, v. 71, n. 5, p. 800-809, 1997.
- ROCHA, A. A.; BENZAQUEM, D. C.; FANTIN, C. Identification of Germinal Mutations in Eight Exons of the BRCA1 Gene in Breast Cancer Patients in the State of Amazonas, Using Direct Sequencing. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 352, p. 359, 2020.
- SÁS, D. M. Mutações em genes de predisposição para câncer de mama em pacientes brasileiros de risco. 2015.
- SOUZA, M. C. *et al.* Diagnóstico de Câncer de Mama por exames genéticos: Uma Revisão deLiteratura. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 2, p. 1786-1797, 2020.
- SZABO, C. I.; KING, M. Population genetics of BRCA1 and BRCA2. **American journal of human genetics**, v. 60, n. 5, p. 1013, 1997.
- TAN, M. *et al.* Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 2, p. 400-407, 2012.
- TARSOUNAS, M.; SUNG, P. The antitumorigenic roles of BRCA1–BARD1 in DNA repair and replication. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 5, p. 284-299, 2020.
- TONIN, P. *et al.* Frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer families. **Nature medicine**, v. 2, n. 11, p. 1179-1183, 1996.
- TURAJLIC, S. *et al.* Resolving genetic heterogeneity in cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 7, p. 404-416, 2019.
- VAZ, Aline Caroline. **Oncogenética: Diagnóstico de câncer de mama por sequenciamento genético**. 2022.
- VENKITARAMAN, A. R. Cancer suppression by the chromosome custodians, BRCA1 and BRCA2. **Science**, v. 343, n. 6178, p. 1470-1475, 2014.
- VENKITARAMAN, A. R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell**, v. 108, n. 2, p. 171-182, 2002.

WHO. World Health Organization. Disponível em: < <https://www.who.int/>> acesso em 26/02/2023

WILD, C. P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, B. W. World cancer report 2020. Lyon: **International Agency for Research on Cancer**, v. 199, p. 512, 2020.

1