

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Marina Roberta Scheid

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE VARIANTES NO GENE
ATM EM PACIENTES COM RISCO DE CÂNCER DE MAMA
FAMILIAR

Porto Alegre

2016

Marina Roberta Scheid

**IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE VARIANTES NO GENE *ATM* EM
PACIENTES COM RISCO DE CÂNCER DE MAMA FAMILIAR**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Área de habilitação: Genética/ Biologia Molecular

Orientadora: Prof. Patricia Ashton-Prolla, MD, PhD.

Coorientadora: Bárbara Alemar B. Temes, Bsc, Msc.

Porto Alegre

2016

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE VARIANTES NO GENE *ATM* EM PACIENTES COM RISCO DE CÂNCER DE MAMA FAMILIAR

Marina Roberta Scheid

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: 05 de dezembro de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Marialva Sinigaglia, PhD – Instituto do Câncer Infantil

Prof. Fernanda Sales Luiz Vianna, PhD - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ORIENTAÇÃO

Orientadora: Prof. Patricia Ashton-Prolla, MD, PhD
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Coorientadora: Bárbara Alemar B. Temes, BSc, MSc
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Agradeço imensamente a todos que estiveram comigo nesses cinco anos de faculdade.

À minha família

Meus pais, a cima de tudo, pelo amor incondicional e por permitirem que meu sonho se tornasse realidade.

A Melsinha, pelo carinho e amizade.

Ao meu namorado, Leonardo, por todo o amor e atenção nos momentos difíceis.

As minhas orientadoras

Patricia, por me aceitar no seu grupo de pesquisa, pelo suporte e por todo o conhecimento obtido nesses últimos anos.

Bárbara, por toda a dedicação e apoio durante a elaboração e execução desse trabalho.

Aos meus colegas

Do Laboratório de Medicina Genômica, Clévia, Ivaine, Larissa, Gustavo, Igor, Liliane, Cleandra e Tiago, e às minhas amigas de curso, Lívia, Cristina, Caroline, Renata, Celina e Gabriela, pela descontração nos momentos difíceis.

Aos bioinformatas, Rodrigo e Marcus, pelo auxílio e suporte para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos os professores do curso de Biomedicina, que tiveram um papel muito importante na minha formação.

E finalmente, às agências de fomento a pesquisa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Resumo

O câncer de mama (CM) é a neoplasia mais frequente em mulheres, e pode ser causado por mutações em genes de alta penetrância (*BRCA1* e *BRCA2*), caracterizando a síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC). No entanto, sabe-se que genes de penetrância moderada estão envolvidos no risco de desenvolvimento de câncer. Entre esses encontra-se *ATM*, com risco relativo de 2,3 para desenvolvimento de CM. *ATM* é composto por 62 éxons, codificando uma proteína envolvida no monitoramento e reparo de DNA. Considerando a dificuldade em sequenciar todo o gene, devido ao seu tamanho, esse trabalho tem por objetivo fazer um rastreamento de mutações em regiões *hotspot* de *ATM*, estimando a prevalência de mutações patogênicas e elucidando o significado de variantes de significado incerto (VUS) encontradas através de análises *in silico*. Regiões *hotspot* foram identificadas através de uma revisão na literatura e de casos com sequenciamento completo de *ATM*. Pacientes não relacionados com critérios clínicos HBOC foram recrutados após consentimento livre e esclarecido. DNA genômico foi obtido através de sangue periférico e os éxons 26, 37, 41 e 49 foram amplificados por PCR, seguido por sequenciamento por eletroforese capilar (Sanger). A análise *in silico* foi realizada através de preditores de efeito mutacional e modelagem comparativa. Nesse estudo, foram incluídos 111 pacientes, dos quais 101 possuíam histórico pessoal de CM, e os demais possuíam diagnóstico de outra neoplasia ou eram não afetados por câncer. A idade média do primeiro e do segundo diagnóstico (quando presente) foi 41,22 e 46,47 anos, respectivamente. Foram encontradas 13 variantes nas regiões sequenciadas: cinco intrônicas e oito contidas nos éxons 26, 37, 41 e 49. Entre as variantes exônicas, três mutações eram VUS, duas variantes ainda não descritas na literatura e três variantes eram benignas, sendo c.5557G>A a variante de maior prevalência. Variantes não descritas e VUS foram avaliadas em preditores de patogenicidade e por modelagem comparativa, e c.6025C>T apresentou um possível significado patogênico. Esse foi o primeiro estudo no Brasil avaliando o espectro mutacional de *ATM* em paciente com câncer de mama e ovário hereditário. Embora não tenha sido encontrado nenhuma variante patogênica, foi observado uma alta prevalência de VUS, e análises adicionais são necessárias para estabelecer a patogenicidade destas variantes.

Abstract

Breast cancer (BC) is the most common neoplasia in women, and it can be caused by mutations in high penetrance genes (*BRCA1* and *BRCA2*), characterizing the Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC) Syndrome. However, genes with moderate penetrance also contribute for the development of cancer, such as *ATM*, with a relative risk of 2.3 for the development of BC. *ATM* is compound by 62 exons translated, coding a protein involved in monitoring and DNA repair of double-strand breaks. Considering the difficulty of sequencing the whole gene due to its size, this study aims to search *hotspots* regions in *ATM*, estimating the prevalence of pathogenic variants and elucidating the significance of variants of uncertain significance (VUS) *in silico*. *Hotspot* regions were identified through literature review and cases with complete *ATM* sequencing. Unrelated subjects with HBOC clinical criteria were selected after sign informed consent. Genomic DNA was obtained from peripheral blood and exons 26, 37, 41 and 49 were amplified by PCR, followed by sequencing by capillary electrophoresis (Sanger). Tools of mutational effect and comparative modeling were used for *in silico* analysis. We included 111 subjects in this study, of which 101 had personal history of breast cancer. The remaining presented diagnosis for other neoplasia, but family history of breast cancer. The mean age of the first diagnosis was 41.22 years-old. We found 13 variants in the four regions sequenced: five variants were intronics and eight, contained in exon 26, 37, 41 and 49. Between exonics variants, three variants were VUS, two variants not described in the literature and three variants were benign. The variant c.5557G>A presents the higher prevalence. Variants not described and VUS were evaluated by tools of mutational effect and comparative modeling, and c.6025C>T presented a possible pathogenic significance. This was the first study in Brazil to evaluate the mutational spectrum of *ATM* in subjects with hereditary breast and ovarian cancer, and additional analyses are necessary to establish the pathogenicity of these variants.

Sumário

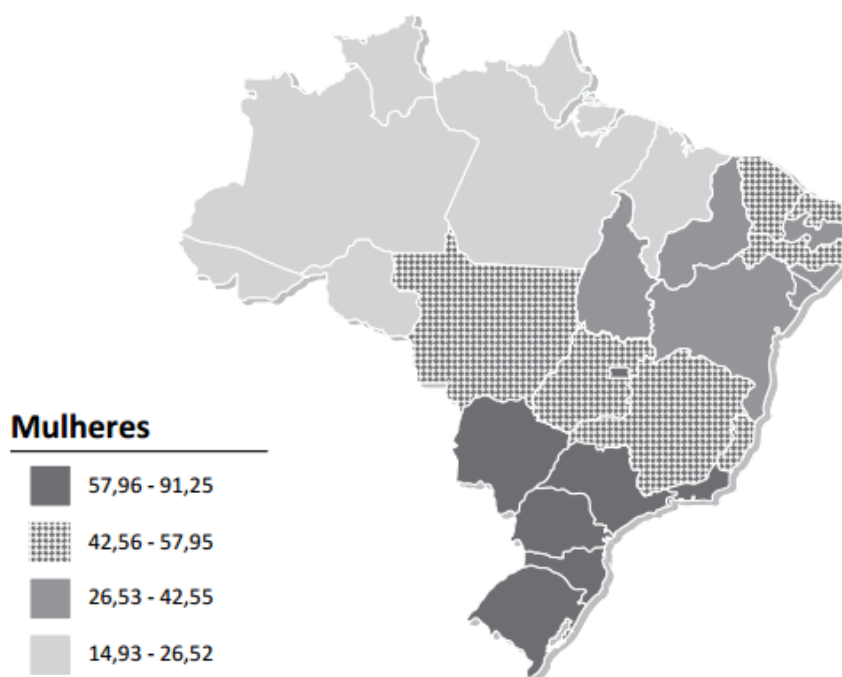
1	Introdução	7
1.1	Câncer de mama	7
1.2	Genes de predisposição hereditária ao câncer de mama	10
1.3	Estrutura e função de ATM	13
1.4	<i>ATM</i> e a predisposição ao câncer de mama.....	15
2	Justificativa	21
3	Objetivos	22
3.1	Objetivo Geral	22
3.2	Objetivos Específicos.....	22
4	Original Article	23
5	Considerações finais.....	46
	Referências	47

1 Introdução

1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é a segunda neoplasia maligna mais frequente no mundo todo e é a neoplasia mais frequente entre mulheres correspondendo a cerca de 25% dos novos casos de câncer reportados anualmente (Ferlay *et al.*, 2015). Além disso, o câncer de mama representa a maior causa de morte por câncer em mulheres no mundo todo e aproximadamente 522 mil mortes foram estimadas em 2012. No Brasil, o câncer de mama é a segunda neoplasia mais frequente em mulheres, com 57.960 novos casos estimados no ano de 2016, sendo apenas menos frequente do que os tumores de pele não-melanoma (Inca, 2016). Esta neoplasia apresenta uma alta incidência nas regiões Sul e Sudeste (Figura 1). Mais especificamente, a região Sul apresenta a maior incidência entre todas as regiões do Brasil e estima-se que no Rio Grande do Sul serão diagnosticados 5.200 novos casos de câncer de mama em 2016 (Inca, 2016). A grande incidência de câncer de mama está em mulheres acima de 55 anos, sendo raro entre homens e mulheres abaixo de 35 anos.

Figura 1. Incidência de câncer de mama no Brasil



Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer de mama (por 100 mil mulheres), estimadas para o ano de 2016, segundo Unidade da Federação (Inca, 2016).

Estima-se que 10-15% de todos os novos casos de câncer de mama tenham algum componente hereditário. A principal síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama é provocada principalmente por mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* que, quando mutados, caracterizam a Síndrome de predisposição hereditária ao Câncer de Mama e Ovário (HBOC, do inglês *Hereditary breast and ovarian cancer syndrome*) (Claus *et al.*, 1996). HBOC é uma síndrome de alta penetrância e herança autossômica dominante, e é responsável por 5-7% de todos os casos de câncer mama, e 8-13% dos casos de câncer epitelial de ovário (Roy *et al.*, 2011). No entanto, aproximadamente 10% dos pacientes com critérios clínicos dessa síndrome apresentam mutações germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2* (Walsh *et al.*, 2011), de forma que o gene responsável pela predisposição hereditária ao câncer de mama permanece desconhecido na maior parte dos pacientes. Dessa forma, passou-se a buscar outros genes de supressão tumoral que pudessem estar associados com risco de câncer de mama aumentado (Angèle e Hall, 2000).

A identificação de pacientes com predisposição a câncer de mama é feita através da análise do histórico familiar do paciente. A rede NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) desenvolveu um *guideline* com os critérios clínicos que indicam que o indivíduo pode ter a Síndrome HBOC e, portanto, deve ser testado para os genes *BRCA1* e *BRCA2*. Os critérios detalhados estão apresentados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela1. Critérios clínicos para a Síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário, de acordo com a *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)*.

NCCN *Guideline* – Critérios clínicos para testagem genética para síndrome de câncer de mama e ovário hereditário

- Indivíduo proveniente de uma família com mutação deletéria conhecida em *BRCA1* ou *BRCA2*.
- História pessoal de câncer de mama mais um dos seguintes critérios:
 - Diagnóstico ≤ 45 anos
 - Diagnóstico ≤ 50 com:
 - Outro tumor primário
 - ≥ 1 familiar próximo* com câncer de mama em qualquer idade;
 - Histórico familiar limitado ou desconhecido
 - Diagnóstico ≤ 60 anos com:
 - Câncer de mama triplo negativo
 - Diagnóstico de câncer de mama a qualquer idade com:
 - ≥ 1 familiar próximo com câncer de mama diagnosticado < 50 anos
 - ≥ 2 familiares próximos com câncer de mama a qualquer idade
 - ≥ 1 familiar próximo com câncer epitelial de ovário
 - ≥ 2 familiares próximos com câncer de pâncreas ou câncer de próstata (*Gleason score* ≥ 7) a qualquer idade
 - Familiar próximo masculino com câncer de mama
 - Um indivíduo com etnia associada a altas frequências mutacionais (ex. Judeus Ashkenazi) não requer histórico familiar
- Histórico pessoal de câncer epitelial de ovário
- Histórico pessoal de câncer de mama masculino
- Histórico pessoal de câncer de pâncreas ou próstata (*Gleason score* ≥ 7) a qualquer idade com ≥ 2 parentes próximos com câncer de mama, ovário, pâncreas ou próstata (*Gleason score* ≥ 7) a qualquer idade
 - Indivíduos com câncer de pâncreas e ancestralidade Ashkenazi, apenas um familiar afetado e necessário
- Indivíduos apenas com histórico familiar (limitações significativas interpretando os resultados dos testes devem ser discutidas para um indivíduo não-afetado):
 - Familiar de primeiro ou segundo grau com os critérios listados a cima
 - Familiar de terceiro grau com câncer de mama e/ou ovário com 2 familiares próximos com câncer de mama (um com câncer de mama < 50 anos) e/ou câncer de ovário
 - Outros critérios clínicos deve ser utilizados para determinar se o paciente tem possibilidade de carregar mutação, considerando a idade do paciente não-afetado e a idade de demais mulheres não-afetadas na família.
 - Teste de indivíduos não-afetados devem ser considerados somente se não for possível a testagem de indivíduos afetados.

*Familiar próximo: considerado até terceiro grau (pai, mãe, filhos, irmãos, avós, tios, primos, sobrinhos, bisavó), proveniente do mesmo lado da família;

1.2 Genes de predisposição hereditária ao câncer de mama

Com o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento em larga escala (sequenciamento de nova geração – NGS, do inglês, *next generation sequencing*), foi possível analisar o perfil mutacional de diversos outros genes envolvidos na predisposição ao câncer hereditário, uma vez que esta tecnologia permite o sequenciamento de dezenas a centenas de genes simultaneamente, a um custo acessível. Com isso, diversos estudos tem investigado outros genes além de *BRCA1* e *BRCA2* (genes de alta penetrância) em pacientes com câncer de mama hereditário, utilizando painéis de diversos genes. Dessa maneira, ampliou-se o conhecimento sobre a contribuição de mutações em outros genes, especialmente os genes com penetrância moderada como *CHEK2*, *PALB2* e *ATM*, que conferem um risco de até 4 vezes para o desenvolvimento de câncer de mama (Maxwell *et al.*, 2015).

Assim, sabe-se hoje que diversos genes apresentam uma significativa importância na contribuição genética do câncer familiar. Além dessa contribuição, esses genes estão envolvidos em mecanismos semelhantes dentro da célula e, muitas vezes, interagem entre si. A Figura 2 é resultado de um trabalho que analisa vias que esses genes apresentam em comum em papéis como reparo de bases mal pareadas (*mismatch repair*), anemia de Fanconi e reparo de quebra de fita dupla de DNA (DSB - *double strand break*) (Caminsky *et al.*, 2016). Nessa figura, é possível notar que *ATM* apresenta um papel central na regulação de diversas funções no ciclo celular, como reparo de bases mal pareadas (*mismatch repair*), reparo de quebra de fita dupla (*double strand breaks*) e controle do ciclo celular.

Estudos recentes mostraram que, entre diversos genes supressores de tumor sequenciados através de sequenciamento de nova geração por painéis multiplex, o gene *ATM* apresentava uma alta prevalência de mutações patogênicas em pacientes com critérios clínicos da síndrome HBOC (Aloraifi *et al.*, 2015). Entre os diversos genes que foram incluídos nestes estudos (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *CDH1*, *STK11*, *CHEK2*, *PALB2*, *ATM*, *BRIP1*, entre outros), somente os genes *BRCA1*, *BRCA2* e *CHEK2* apresentaram uma prevalência mutacional maior que *ATM*.

Figura 2: Diagrama de Venn em genes relacionados com câncer

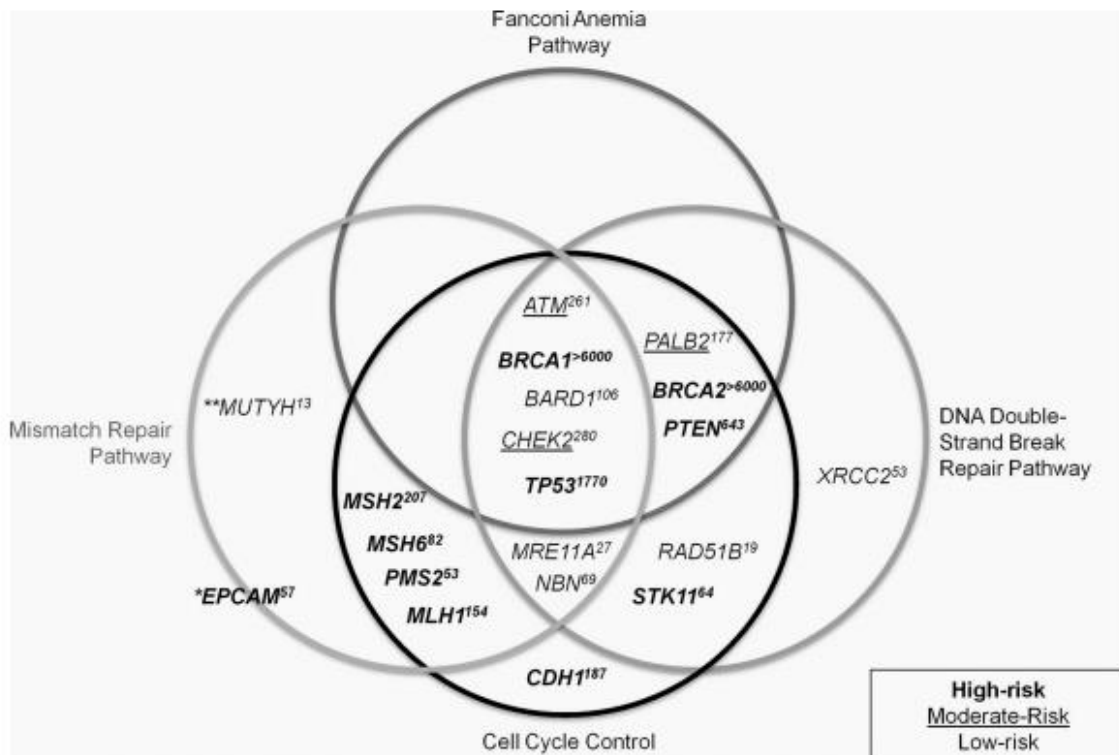
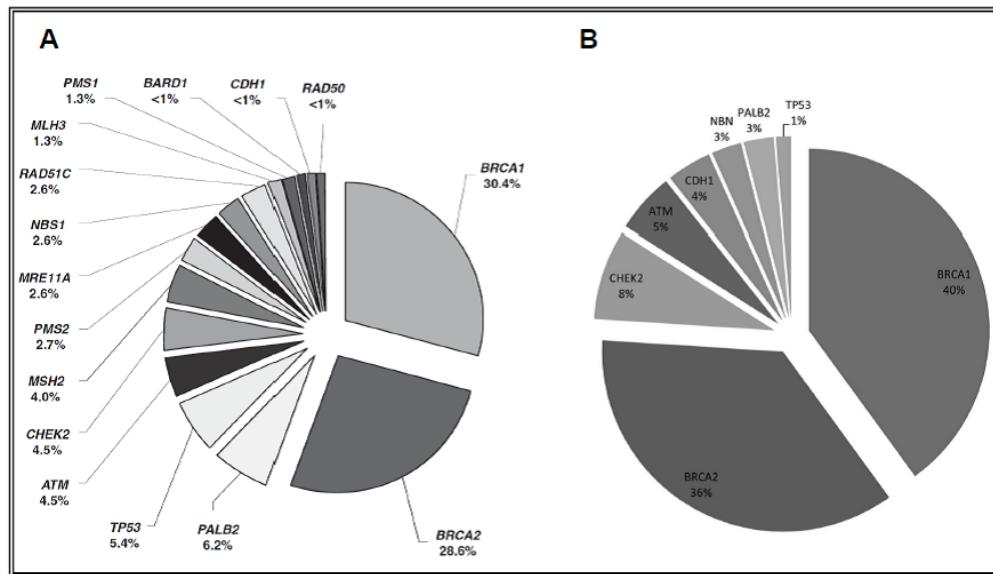


Diagrama de Venn mostrando funções compartilhadas entre oncogenes e genes supressores tumorais (Caminski *et al.*, 2016).

Estes achados também foram confirmados por outros estudos, onde *ATM* é um dos genes mais frequentemente mutados em indivíduos com critérios clínicos para a síndrome HBOC (Castéra *et al.*, 2014; Schroeder *et al.*, 2015). No primeiro estudo, *ATM* apresenta uma porcentagem de mutações de 4,5% entre os genes avaliados, sendo o quinto gene mais mutado na coorte estudada (Figura 3A) (Castéra *et al.*, 2014). No segundo estudo, *ATM* é o quarto gene mais mutado, entre genes de predisposição ao câncer (Figura 3B) (Schroeder *et al.*, 2015). Dentre esses genes, *BRCA1* e *BRCA2* mostram-se os mais frequentemente mutados, representando mais de 50% das mutações, seguido de *CHEK2*, *PALB2*, *ATM*, *TP53*, entre outros. Esses dados demonstram a importância de *ATM* no contexto do câncer hereditário e reforçam a necessidade de incluí-lo na rotina de diagnóstico clínico.

Figura 3. Distribuição de mutações em genes de predisposição ao câncer.



Percentual de mutações em genes de predisposição ao câncer. (A) porcentagem de variantes identificadas em um coorte de 620 pacientes (Castéra *et al*, 2014), (B) porcentagem identificada em uma coorte de 708 pacientes (Schroeder *et al*, 2015). Em ambos os estudos, os pacientes participantes preenchiam critérios clínicos HBOC e realizaram sequenciamento através de um painel de genes.

Em um estudo em andamento no nosso grupo, indivíduos não relacionados e que preenchem critérios clínicos da síndrome HBOC foram testados com painéis de sequenciamento de nova geração, avaliando diversos genes de penetrância alta e moderada. Os resultados mostraram que, depois de *BRCA1* e *BRCA2*, o gene *ATM* é o mais frequentemente mutado entre os diversos genes supressores de tumor analisados. Entre os 64 pacientes que haviam realizado sequenciamento completo deste, 12 (18,75%) apresentaram alteração patogênica ou variante de significado incerto. Entre as 12 variantes encontradas no gene *ATM*, duas mutações foram descritas como patogênicas e dez foram descritas como variantes de significado incerto (Alemar B, 2016; comunicação pessoal).

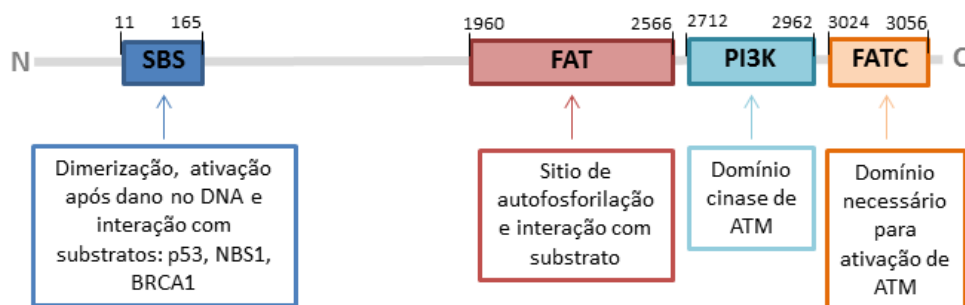
A análise de sequenciamento gênico pode resultar em diferentes resultados: a) ausência de alterações de sequência, b) presença de uma variante patogênica, c) presença de polimorfismos e variantes neutras, e d) identificação de uma variante cuja patogenicidade é desconhecida, também chamada de variantes de significado incerto (VUS). Se o impacto da VUS não puder ser inferido a partir de estudos prévios, o mesmo deve ser verificado experimentalmente. Por ser um gene ainda

pouco investigado, os resultados de sequenciamento de *ATM* revelam um elevado número de VUS. A incerteza sobre a relação destas variantes com a predisposição ao desenvolvimento de tumores dificulta ainda mais o manejo clínico de pacientes com essas mutações (Kurian *et al.*, 2014; Lerner-Ellis *et al.*, 2015).

1.3 Estrutura e função de ATM

O gene *ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutado) está localizado no cromossomo 11 (11q22.3) e é composto por um total de 66 éxons, sendo somente 62 éxons transcritos (Gatti *et al.*, 1999). Esse gene apresenta uma estrutura conservada com resíduos de serina, os quais são alvos de fosfatases e possui um sítio ativo no seu domínio carboxi-terminal (Figura 4). Seu produto, a proteína ATM, possui peso molecular de 350 kDa e é composta de 3056 resíduos de aminoácidos. ATM pertence à família de cinases PIKKs (*PI3K-like protein kinases*), família de proteínas envolvidas na resposta ao stress celular (Bosotti *et al.*, 2000).

Figura 4. Proteína ATM e domínios



A proteína ATM contém três domínios clássicos da família PI3K: o domínio FAT, um domínio PI3K e um domínio FATC. Outro importante domínio presente em ATM é o sítio de ligação de substratos (SBS – *substrate binding site*), localizado na região amino terminal, sítio responsável pela interação de ATM com outras proteínas supressoras de tumores, como P53 e BRCA1. Deleções nesse domínio acabam inativando a proteína (Lavin, 2008; Khalil *et al.*, 2012).

Entre as funções deste gene, *ATM* desempenha diversos papéis no ciclo celular, sendo considerado um gene de supressão tumoral essencial para o desenvolvimento. A proteína ATM interage com proteínas envolvidas no processo de

supressão tumoral, tais como BRCA1, p53 (Khanna *et al.*, 1998) e CHK2 (Matsuoka *et al.*, 1998), com as proteínas de checagem RAD17, RAD9 e com a cinase PI3K (Khanna, 2000). Assim como os genes *BRCA1* e *BRCA2*, *ATM* também apresenta um importante papel no reparo por recombinação homóloga.

A ativação de ATM para o combate à carcinogênese celular está intimamente relacionada ao reparo de dano ao DNA por quebra de fita dupla (Smith *et al.*, 2010). Mais especificamente, ATM se encontra inativado na forma de homodímeros em célula nas quais não há dano no DNA. Quando a quebra de fita dupla ocorre, ATM inativo rapidamente induz a autofosforilação dos sítios S367, S1893 e S1981, dissociando-se em monômeros ativos (Lavin e Kozlov, 2007; Shiloh e Ziv, 2013). Após o dano no DNA, ATM é recrutado em conjunto com outras proteínas como o complexo MRN (MRE11-RAD50-NBS1) (Lee e Paull, 2007), iniciando uma via que ativa proteína Chk2, que realiza o *checkpoint* de dano ao DNA nas fases G2 e S do ciclo celular. Subsequentemente, Chk2 pode ativar p53, a qual realizará o *checkpoint* celular em G1. Além disso, ATM apresenta a capacidade de fosforilar e ativar a proteína p53 (Lavin e Kozlov, 2007) (ver Figura 5). Uma vez que o complexo foi recrutado, ATM age interagindo com múltiplos substratos no sítio do dano. Um exemplo de proteínas com as quais ATM interage são as variantes de histonas, como Gama-H2AX, o próprio complexo MRN e coenzimas, como SMC1 (Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004; Kitagawa *et al.*, 2004; Cuadrado *et al.*, 2006).

Figura 5 – Via de ativação de ATM no reparo de quebra de fita dupla

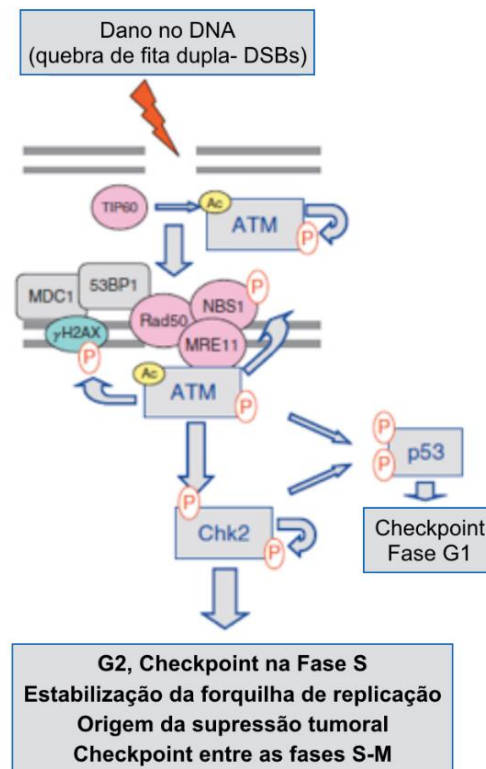


Figura 5: Ativação de ATM a partir da quebra de fita dupla do DNA. ATM fosforilado representa a forma ativa da proteína e recruta o complexo MRN (modificado de Uziel *et al.*, 2003)

1.4 *ATM* e a predisposição ao câncer de mama

Mutações germinativas em homozigose no gene *ATM* levam a um quadro clínico de Ataxia-telangectasia (AT, que deu origem ao nome do gene)(Lavin e Kozlov, 2007), doença que apresenta um fenótipo de ataxia cerebral e neurodegeneração neuronal (principalmente do cerebelo), imunodeficiência e risco aumentado de câncer (Border, 1985), incluindo câncer de mama (Thompson *et al.*, 2005). Contudo, a AT é uma doença genética recessiva, e para o desenvolvimento do quadro clínico o gene *ATM* precisa estar mutado em homozigose (Peto *et al.*, 1999). As demais mutações em heterozigose, principalmente mutações de sentido trocado (*missense*) onde há apenas a troca de um aminoácido, acabam não resultando em um fenótipo clínico de AT, mas podem provocar uma susceptibilidade ao desenvolvimento de câncer de mama (Sherry *et al.*, 2001).

Devido à função desse gene no reparo na quebra de fita dupla do DNA por recombinação homóloga, *ATM* apresenta um importante papel na carcinogênese

(Khanna e Lavin, 1993). Diversos estudos analisaram a presença de mutações em *ATM* em pacientes com câncer de mama. No entanto, poucos estudos tem sido feitos envolvendo este gene, de forma que a relação clínica genótipo-fenótipo ainda não está bem definida o que, somado ao fato de este ser um gene de penetrância moderada, dificulta sua aplicação na clínica.

Diversos estudos encontraram associação entre mutações no gene *ATM* e risco aumentado de câncer de mama (Tabela 2). Renwick e colaboradores (2006) analisaram 443 famílias com câncer de mama hereditário e 512 controles. Desta coorte, foram identificadas 12 mutações patogênicas. O risco relativo de câncer de mama encontrado através da análise de segregação dos casos com mutações em *ATM* foi 2,37 (95% IC= 1,51 – 3,78; p=0,0003)(Renwick *et al.*, 2006). Muitos estudos realizaram sequenciamento do gene em coortes de pacientes com câncer de mama esporádico e familiar (Dörk *et al.*, 2001; Sommer *et al.*, 2002), já outros estudos realizaram testes de prevalência de mutações específicas, que possuíam alta prevalência entre pacientes com diagnóstico clínico de ataxia-telangectasia (Bretsky *et al.*, 2003; Lindeman *et al.*, 2004). Entre as mutações mais estudadas encontram-se a mutação intrônica c.1066-6T>G e a mutação fundadora c.7271T>G (Chenevix-Trench *et al.*, 2002; Bernstein *et al.*, 2003; Szabo *et al.*, 2004). É importante ressaltar que muitas variantes reportadas em *ATM* não foram classificadas quanto ao significado clínico. No entanto, de acordo com os bancos de dados atuais (dbSNP) (Sherry *et al.*, 2001) é possível classificar as mutações descritas, sendo mutações maioria variantes benignas, e a minoria patogênicas ou de significado incerto.

A mutação c.7271T>G é conhecida por ser uma mutação fundadora patogênica, e quando em homozigose resulta em um quadro clínico de Ataxia-Telangectasia (AT). Essa mutação foi originalmente detectada em uma família escocesa e pacientes AT com essa mutação apresentavam risco aumentado de câncer de mama (Stankovic *et al.*, 1998). Diversos estudos foram realizados a fim de estabelecer uma relação entre esta mutação e a susceptibilidade ao câncer de mama (Chenevix-Trench *et al.*, 2002; Lei *et al.*, 2002; Bernstein *et al.*, 2003; Szabo *et al.*, 2004), destacando-se o estudo conduzido por Stankovic (1998) e colaboradores, que identificou essa mutação em duas famílias, com risco aumentado de câncer de mama em 13 vezes (Stankovic *et al.*, 1998).

A mutação c.1066-6T>G também foi amplamente estudada por diversos autores. Embora a mutação se mostre em alta prevalência em diversas populações, sua frequência não diferencia entre casos e controles (Bernstein *et al.*, 2003; Szabo *et al.*, 2004). Entre as populações estudadas, encontram-se as populações europeia, australiana e americana (Bernstein *et al.*, 2003; Lindeman *et al.*, 2004; Szabo *et al.*, 2004; Bernstein *et al.*, 2006). A frequência encontrada na população Europeia, por exemplo, foi de 0,7% nos casos e 0,6% nos controles, não diferindo significativamente. Embora esta variante esteja classificada como “provavelmente benigna” em bancos de dados, alguns estudos mostram que há uma associação entre a variante e um risco aumentado de câncer de mama (Bernstein *et al.*, 2006). Finalmente, em uma metanálise realizada por Ding e colaboradores mostrou-se que essa variante não resulta em risco aumentado para câncer de mama. Além disso, o banco de dados ClinVar, o qual recebe informações de centros especializados em genética médica, classificou a mutação c.1066-6G>T como provavelmente benigna (Ding *et al.*, 2011).

Tabela 2. Principais estudos avaliando variantes em ATM no contexto do câncer de mama esporádico ou hereditário.

Referência	Variante encontradas	Contexto	Etnia	Resultados
(Broeks <i>et al.</i> , 2000)	c.3114A>T, IVS10-6T>G, IVS142T>G, c.1660delA, c.1562delAG	CM esporádico	Alemã	IVS10-6T>G pode contribuir para o risco de câncer de mama;
(Dörk <i>et al.</i> , 2001)	c.1066-6T>G, c.146C>G, c.1648A>G, c.1810C>T, c.2119T>C, c.2572T>C, c.3161C>G, c.4258C>T, c.4709T>C, c.5071A>C, c.5557G>A, c.5558A>T, c.6820G>A, c.6860G>C, c.7390T>C, c.7775C>G, c.8316G>A, c.3801delG	CM esporádico	Alemã	S707P (c.2119T>C) teve associação com câncer de mama, sendo mais prevalente na população do que nos controles.
(Chenevix-Trench <i>et al.</i> , 2002)	c.7271T>G, c.1066-6T>G	CM familiar	Australiana	c.7271T>G, c.1066-6T>G são as variantes mais comuns em pacientes com histórico de mama familiar.
(Sommer <i>et al.</i> , 2002)	c.378 T>A, c.1744 T>C, c.1880 T>G, c.2119 T>C, c.2572 T>C, c.2614 C>T, c.3161 C>G, c.3383 A>G, c.3630 G>A, c.4138C>T, c.4258C>T, c.5557G>A, c.5558A>T. IVS 285G>T **	CM esporádico	Americana (EUA)	Descrição de novas mutações em pacientes com câncer de mama. Não encontraram associação entre nenhuma das mutações e câncer de mama.
(Lei <i>et al.</i> , 2002)	c.7271T>G, c.1066-6T>G	CM esporádico	Sueca e Checa	Não encontraram associação das mutações c.7271T>G, c.1066-6T>G com câncer de mama.
(Thorstenson <i>et al.</i> , 2003)	c.687delA (p.229L>fs), c.1802G>T, c.2465T>G, c.6095G>A IVS10-6 T>G, c.8734A>G, c.9031A>G	CM familiar	Austríaca	Descrição de novas mutações em pacientes com câncer de mama familiar. Não foi realizado um estudo de prevalência caso controle.
(Angèle <i>et al.</i> , 2003)	IVS22-77T>C and IVS48 -238C>G,	CM esporádico	Europeia	IVS22-77T>C e IVS48-238C>G apresentavam maior frequência em casos que controles.
(Bernstein <i>et al.</i> , 2003)	c.7271T>G, c.1066-6T>G	CM familiar	Europeia	T7271G, IVS10-6T>G -> nenhuma das mutações parece ter associação com câncer de mama familiar.

(Bretsky <i>et al.</i> , 2003)	Descrever os 20 SNPs.	CM esporádico	Multietnica	L546V estava mais presente em casos que controles na população afro-americana e latino-americana e S49C mais presente em casos que controles considerando todas as populações.
(Buchholz <i>et al.</i> , 2004)	S49C, Asp1853Asn, Pro1954Arg	CM esporádico	Americana (EUA)	A mutação mais prevalente em pacientes com câncer de mama foi Ser49Cys
(Szabo <i>et al.</i> , 2004)	c.7271T>G, c.1066-6T>G	CM familiar	Europeia (Holanda, França e Austria)	c.7271T>G não apresentou significância clínica, pois não foi encontrada entre os casos. c.1066-6T>G foi encontrada na mesma frequência entre população (0,7%) e controles (0,6%)
(Lindeman <i>et al.</i> , 2004)	c.1066-6T>G	CM familiar	Australiana	c.1066-6T>G mais prevalente em pacientes com câncer de mama familiar
(Thompson <i>et al.</i> , 2005)	c.1066-6T>G e c.4258C>T	CM familiar	Australiana	Não há evidências que a mutação c.4258C>T aumente o risco para câncer de mama. Há pouca evidência para a mutação c.1066-6T>G
(Bernstein <i>et al.</i> , 2006)	c.7271T>G, c.1066-6T>G	CM esporádico	Americana (EUA), Australiana Canadense	c.1066-6T>G mais prevalente em pacientes com câncer de mama.
(Pykäs <i>et al.</i> , 2007)	c.6903insA, c.7570G>C, c.8734A>G	CM familiar	Finlandesa	Foi encontrada associação com as mutações 6903insA, 7570G>c e 8734A>G com susceptibilidade para câncer de mama.
(Brunet <i>et al.</i> , 2008)	c.3802delG, c.3763T>G, c.7187C>G, c.7187C>G, c.6199-57insG, c.5479-186T>C, c.6314G>C, c.7653T>C, c.6573-22A>G, c.7653T>C, c.8156G>A, c.11686T>A.	CM esporádico	Espanhola	Foi encontrado 12 novas mutações em pacientes com câncer de mama, e sugere-se que há associação entre ATM e câncer de mama em idade jovens.

(Hirsch <i>et al.</i> , 2008)	c.2685A>G, c.1254A>G, c.1541G>A, c.4939C>T, c.378T>A, c.3383A>G, c.2289T>A, c.320G>A, c.334G>A, c.7313C>T, c.2614C>T, c.2614C>T, c.5557G>A, c.6995T>C, c.6235G>A, c.370A>G, c.1810C>T, c.6176C>T, c.1595G>A, c.1744T>C, c.2610C>T, c.4279G>A, c.2572T>C, c.4042T>C, c.1176C>G, c.2362A>C, c.8757C>T, c.5793T>C, c.2096A>G, c.4424A>G.	CM esporádico	Afro-americana	Não foram encontradas evidências de que ATM aumente o risco para câncer de mama.
(Wang <i>et al.</i> , 2010)	c.2839-657G>A e c.5674+1518T>A	CM esporádico	Chinesa	Interação entre os dois SNPs de ATM com SNPs em <i>BRCA1</i> .
(Paglia <i>et al.</i> , 2010)	c.1952T>C, c.2119T>C, c.2254C>G, c.2289T>A, c.4556T>C, c.4802G>A, c.4975A>G, c.5018G>C, c.6844A>C, c.6919C>T	CM familiar	Europeia	Foi encontrada uma frequência maior de heterozigotos nos casos. Entre os casos, não houve diferença de pacientes com câncer de mama com ou sem histórico familiar de neoplasias hematológicas.

CM: Câncer de Mama

SNP: Single Nucleotide Polimorphism

*mutações encontradas em pacientes com câncer de mama.

**não incluídas mutações silenciosas e intrônicas que não afetam o sítio de splicing.

2 Justificativa

A maioria dos tumores é resultado de interações complexas entre os componentes genéticos do indivíduo e o ambiente, mas estima-se que até 15% de todos os tumores estejam associados à predisposição hereditária. No contexto da Genética Médica, mutações germinativas em genes de alta penetrância são rotineiramente investigadas. No entanto, aproximadamente 85% dos indivíduos testados permanece sem um diagnóstico molecular, revelando a importância da testagem de genes de penetrância moderada. A inclusão destes genes em painéis multigênicos tem sido viabilizada pelo sequenciamento de nova geração, e estes resultados revelam um grande benefício para os pacientes que tiveram acesso a estas análises, já que a identificação de indivíduos em risco para câncer hereditário é importante porque os portadores de mutação apresentam risco cumulativo vital superior ao da população para o desenvolvimento de outros tumores primários, e porque os familiares também podem estar em risco, já que o padrão de herança é autossômico dominante.

No entanto, o sequenciamento de nova geração ainda não é uma metodologia amplamente utilizada, de modo que há uma quantidade limitada de informações acerca da prevalência e do repertório mutacional de genes de penetrância moderada.

Poucos estudos avaliaram a prevalência de mutações no gene *ATM*, que é um gene de penetrância moderada que confere um aumento de aproximadamente 2 vezes no risco relativo para desenvolvimento de câncer de mama. Como umas das principais limitações no sequenciamento deste gene é o seu tamanho (considerando a utilização da metodologia de sequenciamento por eletroforese capilar), este projeto propõe uma revisão abrangente da literatura a fim de identificar possíveis regiões com alta frequência mutacional (regiões *hotspot*), que então serão sequenciadas em um grupo de indivíduos não relacionados, e que preenchem critérios clínicos para a Síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Identificar possíveis regiões *hotspot* no gene *ATM* e caracterizar a variabilidade genética destas regiões em pacientes que preenchem critérios clínicos para síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC), e elucidar a patogenicidade das variantes encontradas através de ferramentas *in silico*.

3.2 Objetivos Específicos

1. Identificar regiões com alta prevalência de mutações germinativas patogênicas, através da revisão da literatura;
2. Caracterizar a variabilidade genética dessas regiões em indivíduos com critérios clínicos para a Síndrome HBOC.
3. Avaliar o possível impacto das variantes encontradas na proteína ATM, através de análises *in silico*;
4. Correlacionar os achados moleculares com características clínicas dos pacientes (correlação genótipo-fenótipo);

4 Original Article

Identification and analysis of variants in *ATM* in individuals at risk for hereditary breast cancer

Marina Roberta Scheid^{1,2}, Bárbara Alemar^{2,3}, Rodrigo Lingabue-Braun⁴, Gustavo Stumpf³, Patricia Ashton-Prolla^{2,3,5*}.

1. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
2. Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.
3. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
4. Grupo de Bioinformática Estrutural, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
5. Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

***Correspondence to:**

Patricia Ashton-Prolla
Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelo 2350
90035-903 Porto Alegre RS Brazil
pprolla@gmail.com

Running title: *ATM* variants in individuals at risk for hereditary breast cancer.

Autors e-mails:

Marina Roberta Scheid: marina.roberta.scheid@gmail.com
Barbara Alemar: barbara.alemar@gmail.com
Rodrigo Lingabue-Braun: ligabue.braun@gmail.com
Gustavo Stumpf: gustumpf@gmail.com
Patricia Ashton-Prolla: pprolla@gmail.com

Keywords: *ATM*, HBOC, Hereditary breast cancer.

Intended submission: Journal of Breast Cancer

Abstract

Breast cancer (BC) is the most common neoplasia in women, and it can be caused by mutations in high penetrance genes (*BRCA1* and *BRCA2*), characterizing Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC) Syndrome. However, genes with moderate penetrance also contribute for cancer, such as *ATM*, with a relative risk of 2.3 for the development of BC. *ATM* is composed by 62 exons translated, coding a protein involved in monitoring and DNA repair. Considering the difficulty of sequencing the whole gene, due to its size, this work aims to search *hotspots* regions in *ATM*, estimating the prevalence of pathogenic variants and elucidating the significance of variants of uncertain significance (VUS) *in silico*. *Hotspot* regions were identified through literature review. Unrelated individuals with HBOC clinical criteria were selected after sign an informed. Genomic DNA was obtained from peripheral blood and exons 26, 37, 41 and 49 were amplified by PCR, followed by sequencing by capillary electrophoresis (Sanger). *In silico* tools and comparative modeling were used for analysis of VUS. We included 111 subjects, of which 101 had personal history of BC. The remaining presented diagnosis for other neoplasia, but family history of breast cancer. The mean age of first diagnosis was 41.22. We found 13 variants in the regions sequenced: five variants were intronics and eight, contained in exon 26, 37, 41 and 49. Between exonics variants, seven variants were VUS (among them, two were never described), and three were benign. VUS were evaluated by predictors of mutational effect and comparative modeling, and c.6025C>T presents a possible pathogenic significance. This was the first study in Brazil to evaluate the mutational spectrum of *ATM* in individuals at risk of hereditary BC, and additional analyses are necessary to establish the pathogenicity of these variants.

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy in women, corresponding for 25% of all new reported cases every year (Ferlay *et al.*, 2015). Furthermore, the incidence of breast cancer is increased in Southern Brazil, when compared to the Northern regions (Inca, 2016). It is estimated that 10-15% of all cases of breast cancer present a hereditary compound, and although breast cancer is present in several autosomal dominant cancer syndromes, it is most associated with highly penetrant mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes, causing the hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome. However, only about 10% of individual with clinical criteria for HBOC syndrome present pathogenic variants in *BRCA1* and *BRCA2* (Walsh *et al.*, 2011). The need to explain this missing heritability lead to a search for other disease-causing genes related to inherited predisposition to breast cancer, and many other tumor suppressor genes were identified. High and moderated penetrance genes, such as *TP53*, *PALB2*, *CHEK2* and *ATM*, were related with this condition (Maxwell *et al.*, 2015).

ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) gene was first described causing ataxia-telangiectasia (AT), a recessive genetic disorder that results in neuronal degeneration (Mcfarlin *et al.*, 1972). Due to its genomic instability, AT patients also present increased risk of breast and hematological cancer and radiotherapy sensibility (Taylor *et al.*, 1975). *ATM* is a large gene, with 62 translated exons, coding a protein with 350kDa of molecular weight (Gatti *et al.*, 1999). It is considered a tumor suppressor gene, and its function on carcinogenesis process involves repair the double-strand breaks. It also interacts with other tumor suppressor proteins, like *BRCA1* and *p53* (Khanna *et al.*, 1998), that will lead to repair DNA damage and apoptosis, respectively.

In the past years, studies started to investigate the role of *ATM* in hereditary breast cancer, by sequencing the whole gene (Thorstenson *et al.*, 2003; Hirsch *et al.*, 2008; Paglia *et al.*, 2010) or studying the specific mutations c.7271T>G and c.1066-6T>G (Chenevix-Trench *et al.*, 2002; Lei *et al.*, 2002; Bernstein *et al.*, 2003). The relation between *ATM* and familial breast cancer remained unknown until Renwick and colleagues (2006) performed a

segregation analysis of 12 pathogenic mutations in families with clinical criteria for hereditary breast cancer. They found a relative risk of breast cancer of 2.37 (95% IC= 1.51 – 3.78; $p=0.0003$) (Renwick *et al.*, 2006).

More recently, multigene panels performed through next generation sequencing (NGS) allowed to access the mutational status of several genes in a cost-effective approach. It allows many patients suspected to have an inherited breast cancer predisposition to have the mutational status of several genes evaluated in a single reaction, and *ATM* has been found as one of the most frequent mutated genes, reinforcing its significant contribution to inherited breast cancer (Economopoulou *et al.*, 2015).

To the best of our knowledge, there is no study evaluating *ATM* mutations in Brazilian patient fulfilling clinical criteria for hereditary breast cancer syndrome. A single study involving *ATM* and breast cancer in Brazilian patients was published, evaluating somatic *ATM* mutations in breast cancer tissue (Mangone *et al.*, 2015). Considering the challenge and cost for sequencing whole *ATM* gene, we performed a literature review to evaluate if *ATM* gene shows a pattern of mutations location that allow to identify a hotspot region. Based on this review, four *ATM* exons were chosen for sequencing (exons 26, 30, 73 and 49) and here we describe all variants found in Brazilian individuals fulfilling testing criteria for HBOC syndrome.

Material and methods

Subjects and Inclusion Criteria

The subjects included in this study are at risk for hereditary breast and ovarian cancer syndrome, according to the National Comprehensive Cancer Network criteria (www.nccn.org). All subjects signed an informed consent and the study was approved by the Ethics and Research Committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, under the numbers 04/170, 03/018, 11/0427 and 10/0521. Also, all included patients tested negative for the three most prevalent *BRCA1* and *BRCA2* mutations, according to the BIC database [c.5266dupC and c.68_69delAG in *BRCA1* (NM_007294.3); c.5946delT in

BRCA2 (NM_000059.3)].

Biological Material and DNA extraction

Peripheral blood were collected and genomic DNA was extracted from lymphocytes using two different methods (Gentra Purigene Blood Kit and Flexigene DNA Kit – Qiagen, CA, USA) depending on kit used by the laboratory at the sample collection time, following the manufacturer's instructions. After extraction, DNA samples were quantified by measuring the absorbance with a spectrophotometer (Nanodrop1000) in 260 to 280 nm. The sample were considered appropriated for the study when its purity (A260/A280 ratio) were equal or higher than 1.8.

PCR and DNA sequencing

The regions of interest were amplified by polymerase chain reaction (PCR). The PCR final volume was 20.0 μ L per reaction containing: 12.55 μ L of water, 2.0 μ L of PCR buffer, 1.6 μ L of MgSO₄ (50 mM), 0.8 μ L of dNTP (5 mM of each nucleotide), 0.5 μ L of each primer (10 mM), 0.05 μ L of Taq Platinum DNA Polimerase (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) and 2.0 μ L of DNA (20 μ M). The reactions were performed using Proflex PCR System (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) as follow: 94 °C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 30s, 54°C - 56°C for 60s, and 72°C for 90 s. Primer sequences and the specific annealing temperature for each exon are described in Table 1. PCR products were checked by electrophoresis in an agarose gel and subsequently purified using ExoSAP (Affymetrix, Santa Clara, CA) according to the manufacturer's instructions. Samples were sequenced at the *Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas* (Centro de Pesquisa Experimental, HCPA) using ABI 3500 Genetic Analyzer with 50 cm capillaries and POP7 polymer (Applied Biosystems). PCR products were labeled with 5.0 pmol of the primer 5'-NNNNNNNNNNNNN-3' and 1 μ L of BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) in a final volume of 10 μ L. Labeling reactions were performed in a Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) termocycler with an initial denaturing step of 96°C for 1 min followed by 35 cycles of 96°C for 15 sec, 50°C for 15 sec and 60°C for 4 min. Labeled samples

were purified using BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems) and electroinjected in the automatic sequencer.

All sequencing reactions were unidirectional, and the complement strand was sequenced only to confirm identified variants. Final sequences were revised manually using the *FinchTV* software and aligned to the reference (NM_000051.3) using *CLC Work Bench* software.

Variant classification and in silico analysis

To verify its significance, all variants found were checked in ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>). Those variants which were not described or variants of uncertain significance were analyzed using the following *in silico* predictors of mutational effects: Mutation Taster (Schwarz *et al.*, 2014), align GVGD (Tavtigian *et al.*, 2008), PolyPhen 2 (Adzhubei *et al.*, 2013), SIFT - *Sorting Intolerant From Tolerant* (Kumar *et al.*, 2009), PhD-SNP (Capriotti *et al.*, 2006), PredictSNP (Bendl *et al.*, 2014), SNPs3D (Yue *et al.*, 2006), PONP2 (Niroula *et al.*, 2015), SNPs&GO (Calabrese *et al.*, 2009) and *Alamut* software.

In silico structural modeling

The ATM (NCBI NP_000042.3) structural modeling was carried out with the I-TASSER server (Yang *et al.*, 2015; Roy *et al.*, 2010; Zhang, 2008). By sequential steps of template structure identification, fragmentation, incremental model building and evaluation, this tool was able to deliver a high quality model for a long protein segment (residues 1559-3051). The initial portion of the protein was modeled with low confidence, mainly due to the lack of adequate templates, and is not shown here. The structures were visualized with PyMol (Schrödinger LLC). The model quality was 0.43, in a scale of -5 to 2.

Statistical analysis

Genotypic and allelic frequencies were calculated as simple frequency. Hardy-Weinberg equilibrium and the difference in the frequency of ATM variants between patients and the population of 1000G and ExAC were

statistically analyzed by the Chi-squared test using the SPSS software (v.19, IBM Company).

Results

In this study, it was analyzed four (26, 37, 41 and 49) out of 62 exons of *ATM* gene. These exons were chosen based on an extensive analysis of the literature, selecting regions with higher prevalence of pathogenic variants. It was analyzed studies from the following populations: European (German, Spanish, French and Austrian), Australian, American, British and Chinese. In total, it was analyzed 20 studies. From our cohort, it was included 111 subjects with personal and/or familial history of breast and/or ovarian cancer, fulfilling NCCN criteria for HBOC syndrome. The majority of the patients included presented personal history of breast cancer (n=101), including contralateral breast cancer. The average age of the first diagnosis of cancer was 41.22 years. Fourteen subjects had more than one diagnosis of cancer, being nine contralateral breast cancer and five another types, like colorectal cancer, melanoma, leukemia and uterine cancer. The clinical characterization of the subjects included in this study is described in the Table 2.

After sequencing and alignment of all electropherograms using the reference sequence (NCBI NM_000051.3), it was found 13 variants, as depicted in Table 3. Six variants are classified as benign (c.3747-34A>G, c.5497-15G>C, c.5497-8T>C, c.5557G>A, c.5558A>T and c.6060C>T), three are variants of uncertain significance [VUS; (c.5612C>T, c.6025T>C and c.7187C>G)] and four are not described in ClinVar database (c.3967A>G, c.3993+40G>A, c.5650A>C, and c.6095+3A>T). The variant c.5557G>A presented the highest frequency (with 24 carriers) and the intronic variant c.5497-8T>C, the second highest (with 7 carriers). All individuals with c.5497-8T>C also carried the c.5557G>A variant. Nonsense variants, insertions, duplications and deletions were not identified in this study. Besides, this study reports a high prevalence of variants of uncertain significance (53.8% - 7/13, including variants not described in the literature). The British founder mutation c.7271T>G was not identified in our cohort.

Genotypic frequency and allelic frequency found in our cohort are also described in Table 3. Our variants have been tested for Hardy-Weinberg equilibrium and there was no statistical significance in the Chi-square test. Also, our variants frequencies were compared with 1000Genome and ExAC, databases which contains a large number of genomes and exomes sequenced, respectively. A statistical significance was found in four variants: c.5612C>T, c.6025T>C, c.6060C>T and c.7187C>G. The variants c.5612C>T, c.6060C>T and c.7187C>G present a slightly statistical difference, and it can be explained due to our small sample size. However, the variant c.6025T>C, which was classified as VUS, presented a p-value highly significant ($p < 0.001$).

All variants classified as VUS, including variants still not described in ClinVar database, were analyzed by *in silico* prediction tools. We chose ten tools for the analysis, and the results can be seen in Table 4. All five analyzed variants, c.3967A>G, c.5612C>T, c.5650A>C, c.6025T>C, and c.7187C>G are missense mutations. The results of the *in silico* predictors are in favor of a possible pathogenicity of the variant c.6025T>C, which was identified in three individuals in our cohort (genotypic frequency: 0.036). The variants c.3967A>G and c.5612C>T presented contradictory results. The variants c.5650A>C and c.7187C>G were classified as possibly benign by predictors.

Due to methodological limitations, two variant still should to be confirmed by sequencing of the reverse strand: c.6025T>C and c.5650A>C. These variants are located in regions difficult to amplify, resulting in a low quality sequencing. Electropherograms of the variant c.6025T>C are showed in the Figure 1. Right next to this variant, the sequencing showed another peak, common to all electropherograms, which was considered as a sequencing error. Other variants in this and other exons were confirmed accordingly.

We next sought to evaluate the impact of four variants, c.5612C>T (T1871I), c.5650A>C (T1884P), c.6025T>C (Y2009H) and c.7187C>G (T2396S), in the protein structure, by analyzing the protein *in silico*. Figure 2 illustrates the location of these four variants in the protein and also three carboxi-terminal end domains of ATM: FAT (FRAP-ATM-TRRAP), kinase and FATC (FAT C-terminal) domain. The variant c.7187C>G is located on the inner

side of FAT domain, and it does not change the secondary structure of alpha helix of the protein. The variants c.5612C>T, c.5650A>C and c.6025T>C are not located in functional domains. However, 6025T>C is located near to FAT domain and the mutation changes tyrosine, a neutral polar amino acid, to histidine, a positively charged amino acid. This alteration could explain the possible pathogenic meaning of the variant (according to *in silico* predictors). We could not evaluate the variant c.3967A>G (K1323E) because it is located in a region of low quality of the model.

The pedigree of carriers of the VUS c.6025C>T is represented in the Figure 3. Carriers of this variant present a strong history of cancer in the family. As showed in the figure 2, families A and B present a high incidence of breast cancer and other types of cancer. Family B also presents an incidence of skin cancer. Besides family C did not present great history of cancer, the individual carrier of the variant present a strong indicative due to the low age of diagnosis, 37 years-old. The supplementary material we also show the pedigrees of individual carriers of VUS c.3967A>G, c.5612C>T, c.5650A>C and c.7187C>G (Figure S1).

Discussion

Studies elucidating the role of *ATM* mutation and its relation with breast cancer risk are usually limited by the large size of the gene and the number of variants of uncertain significance. In this study, it was selected regions described in the literature as regions of high prevalence of pathogenic variants, and it was analyzed this regions in individuals fulfilling HBOC testing criteria (according to NCCN guidelines). Despite our inclusion criteria, is important to highlight that although there is evidence that *ATM* mutation carriers present an increased risk for developing breast cancer (2.7%), there are no evidence that ovarian cancer is predisposed by mutations in *ATM* (Tung et al., 2016). A successful way of selection was used by Paglia and colleagues (2010), who found a high prevalence of deleterious variants among individuals selected by their personal history of breast cancer and familial history of haematological malignancy, which is frequently found in AT patients (Paglia *et al.*, 2010).

Between all variant identified here, the benign variants c.5557G>A and c.5558A>T has been extensively described by other studies (Sommer *et al.*, 2002; Angèle *et al.*, 2003), and its variants frequency do not vary between cases and controls (Bretsky *et al.*, 2003), supporting the evidence that these variants do not present risk to breast cancer. Although c.5557G>A is considered a benign variant by ClinVar database, a recent meta-analysis has shown that breast cancer individuals carrying this variant and undergoing to radiotherapy presented increased toxicity for the treatment compared with cases without the variant (Andreassen *et al.*, 2016). An interesting finding of our study is that we found that all carriers of the variant c.5497-8T>C also carried the variant c.5557G>A.

It is well described that great part of *ATM* pathogenic mutations is located in the carboxi-terminal end (Brunet *et al.*, 2008; Graña *et al.*, 2011). We amplified exon 49 because it covers part of FAT domain and the British founder mutation, c.7271T>G, is included in this region and it was frequently described by other studies (Angèle *et al.*, 2003; Young *et al.*, 2016). However, this variant was not found in our cohort.

More recently, multigene panels have been an interesting tool for analyze genes with moderate penetrance (Economopoulou *et al.*, 2015). In familial breast cancer patients tested with multigene panel, *ATM* has been found one of the most frequent mutated genes (Castéra *et al.*, 2014; Aloraifi *et al.*, 2015; Schroeder *et al.*, 2015). Schroeder and colleagues analyzed a cohort of 780 patient with HBOC testing criteria and *ATM* was the fourth most mutated gene, preceded only by *BRCA1*, *BRCA2* and *CHEK2* genes (Schroeder *et al.*, 2015). In an undergoing study develop by our group, Southern Brazilian individuals fulfilling HBOC testing criteria were tested by NGS, and *ATM* was the most frequently mutated gene, after *BRCA1* and *BRCA2*. Between 64 individuals with complete *ATM* sequencing, two (3.1%) individuals present a pathogenic variant and ten (15.6%) were carriers of VUS (Alemar *et al.*, personal communication).

Indeed, the present study also reveals a high frequency of VUS. The variant c.7187C>G has already been described in one patient with familial breast cancer in Spanish population (Brunet *et al.*, 2008). This variant

generates an alteration of a threonine to isoleucine, that changes the normal residue for a hydrophobic residue and it can lead for the loss of hydrogen bounds. The other four variants have not been reported in the literature yet. The variant c.5612C>T have already been identified in another Southern Brazilian individual tested for *ATM* by multigene panels (Aleamar *et al*, personal communication).

The evaluation of the VUS using *in silico* predictors revealed a significant discordance among them. In fact, the discordance between *in silico* prediction tools has been noted by many studies (Gnad *et al.*, 2013; Miosge *et al.*, 2015), and even though we use all tools together, the accuracy of this method does not exceed 81% (Gnad *et al.*, 2013). One explanation for this discordance is that these tools are based on different methods to analyze the pathogenicity of missense variants. Align-GVGD, PON-P2 and SIFT based the analysis on the conservation of the residue between species (Tavtigian *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2009; Niroula *et al.*, 2015), PolyPhen and SNPs3D takes in count the structure and protein function (Yue *et al.*, 2006; Adzhubei *et al.*, 2013) and PhD-SNP, Mutation Taster and PON-P2 analyze SNPs database, such as 1000G (Capriotti *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2014; Niroula *et al.*, 2015). Finally, PredictSNP is based in the tools results (Bendl *et al.*, 2014). Although *in silico* tools present discordant results, it is still a possible cost-effective implement in the analysis of missense variants. Nevertheless, is crucial to emphasize that the *in silico* result alone cannot be used to define the pathogenicity of a variant (Richards *et al.*, 2015), and that this results should not be taken into account to clinically manage the patient.

This study has important limitations, as the small sample size and the limited regions analyzed. In the other hand, this is the first study evaluating *ATM* mutations in Brazilian patient fulfilling clinical criteria for hereditary breast cancer syndrome. Finally, this study reveals the *in silico* structure of *ATM* carboxi-terminal end, once as from our knowledge there is no report in the literature and only a small part in the Protein Data Bank. This is the first study in Brazil evaluating the mutational spectrum of *ATM* in subjects with hereditary breast and ovarian cancer. It was found a high prevalence of polymorphism and

variants of uncertain significance. In this context, additional analyses are necessary to establish the pathogenicity of these variants.

Acknowledgements

This project was supported by grants from Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE) from Hospital de Clinicas de Porto Alegre. Patricia Ashton-Prolla is investigator from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Marina R. Scheid is funded by CNPq. Barbara Alemar is funded by CNPq. Gustavo Stumpf is funded by Instituto Nacional do Cancer (INCa). Funding agencies had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript

Table 1. Primer sequences used to amplify *ATM* exons 26, 37, 41 and 49.

Exon	Primer Forward (5' > 3')	Primer Reverse (5' > 3')	AT*
26	TGGATAAAGTATGATACTTTAATGCTG	ATAATGATTACCACAAGCTAAGTTTCA	55°C
37	GCAGTATGTTGAGTTTATGGCAGA	GCAACTTTTATCTCCATTCCATAGA	56°C
41	ACATAACATTTAGAGTTGGGAGTTACA	ATAGCTTTGGGTTTACACACACA	56°C
49	ACCTTAATTTGAGTGATTCTTTAGATG	TTTCTATGCAAAAACACTCACTCAG	54°C

*AT: Annealing temperature

Table 2. Clinical characterization of 111 subjects with HBOC syndrome criteria

Characteristic		N (%) (N= 111)
Gender	Female	107
	Male	4
Diagnosis	Breast cancer	101
	Contralateral breast cancer	9
	Ovarian cancer	3
	Colorectal cancer	2
	Melanoma	2
	Leukemia	1
Unaffected*	Uterine cancer	1
		4
Age of diagnosis		Mean (min – max)
	All diagnosis	41.22 (24 – 66)
	Breast cancer	40.6 (24 – 66)
	Ovarian cancer	49.75 (37 – 56)
	Others**	41.3 (34 – 67)

*Subjects only with family history;; **corresponding to colorectal cancer, melanoma, leukemia and uterine cancer.

Table 3. Variants found in 111 subjects fulfilling HBOC testing criteria according to NCCN.

Position	Variant (HGVS)	Protein	Reference	ClinVar	Subjects (N=111)	Genotypic Frequency	Allelic Frequency ^a	1000 Genomes ^b	ExAC ^c	p ^{ab}	p ^{ac}
Intron 25	c.3747-34A>G	-	rs3092840	Benign	1	0.009	A= 0.9954 G= 0.0045	A=0.995828 G= 0.004172	A= 0.9900 G= 0.0100	0.746	1.00
Exon 26	c.3967A>G	p.(Lys1323Glu)	-	Not found	1	0.009	A= 0.9954 G= 0.0045	Not found	Not found	-	-
Intron 26	c.3993+40G>A	-	-	Not found	1	0.009	G= 0.9954 A= 0.0045	Not found	Not found	-	-
Intron 36	c.5497-15G>C	-	rs3092828	Benign	2	0.018	G= 0.991 C= 0.009	G=0.9959 C= 0.0041	G= 0.9978 C= 0.0022	0.732	0.434
Intron 36	c.5497-8T>C	-	rs3092829	Benign	7	0.063	T= 0.9685 C= 0.0315	T=0.9868 C=0.0132	T=0.977 C= 0.023	0.120	0.505
Exon 37	c.5557G>A	p.(Asp1853Asn)	rs1801516	Benign	24	0.2162	G= 0.891 C= 0.108	G=0.8899 A=0.1101	G= 0.9331 A= 0,0669	1.00	0.136
Exon 37	c.5558A>T	p.(Asp1853Val)	rs1801673	Benign	2	0.009	G= 0.991 C= 0.009	A=0.9982 T=0.0018	A=0.994814 T= 0.005186	0.363	0.879
Exon 37	c.5612C>T	p.(Thr1871Ile)	rs538452060	VUS	1	0.009	G= 0.9954 A= 0.0045	C= 0.9998 T=0.0002	C= 0.99998 T= 0.00002	0.044	0.022
Exon 37	c.5650A>C	p.(Thr1884Pro)	-	Not found	1	0.009	A= 0.9954 T=0.0045	Not found	Not found	-	-
Exon 41	c.6025T>C	p.(Tyr2009His)	rs199586999	VUS	3	0.027	T= 0.9865 C= 0.0135	Not found	T= 0.999983 C= 0.000016	-	<0.001
Exon 41	c.6060C>T	silent	rs370091178	Benign	1	0.009	C=0.9954 T= 0.0045	Not found	C=0.99985 T= 0.00015	-	0.022

Intron 41	c.6095+3A>T	-	-	Not found	1	0.009	A=0.9954 T= 0.0045	Not found	Not found	-	-
Exon 49	c.7187C>G	p.(Thr2396Ser)	rs370559102	VUS	1	0.009	C= 0.9954 G= 0.0045	Not found	C= 0,999818 G= 0.00018	-	0.044

VUS: Variant of uncertain significance;

Table 4. Classification of variants of uncertain significance and variants not described in the literature, according to predictors of mutational effect.

Variant		Predictor of mutacional effect									
HGVS name	Protein abbreviation	Mutation Taster	AlignGVGD (Human to frog)	SNPs3D	PolyPhen2	PON-P2	PredictSNP	SNPs&Go	PhD-SNP	Alamut	SIFT 4.0.4
c.3967A>G	K1323E	Pathogenic	Neutral (C0)	Neutral	Pathogenic	Pathogenic	Neutral	Neutral	Neutral	Not classified	Neutral
c.5612C>T	T1871I	Neutral	Pathogenic (C65)	Neutral	Pathogenic	Unknown	Neutral	Neutral	Neutral	VUS	Pathogenic
c.5650A>C	T1884P	Neutral	Neutral (C0)	Neutral	Neutral	Unknown	Neutral	Neutral	Neutral	Not classified	Neutral
c.6025T>C	Y2009H	Pathogenic	Pathogenic (C65)	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Pathogenic	Neutral	Pathogenic	VUS	Pathogenic
c.7187C>G	T2396S	Neutral	Neutral (C0)	Neutral	Pathogenic	Unknown	Neutral	Neutral	Neutral	VUS	Neutral

Pathogenic: variants possibly pathogenic; Neutral: variants possibly benign or polymorphism; VUS: Variants of uncertain significance

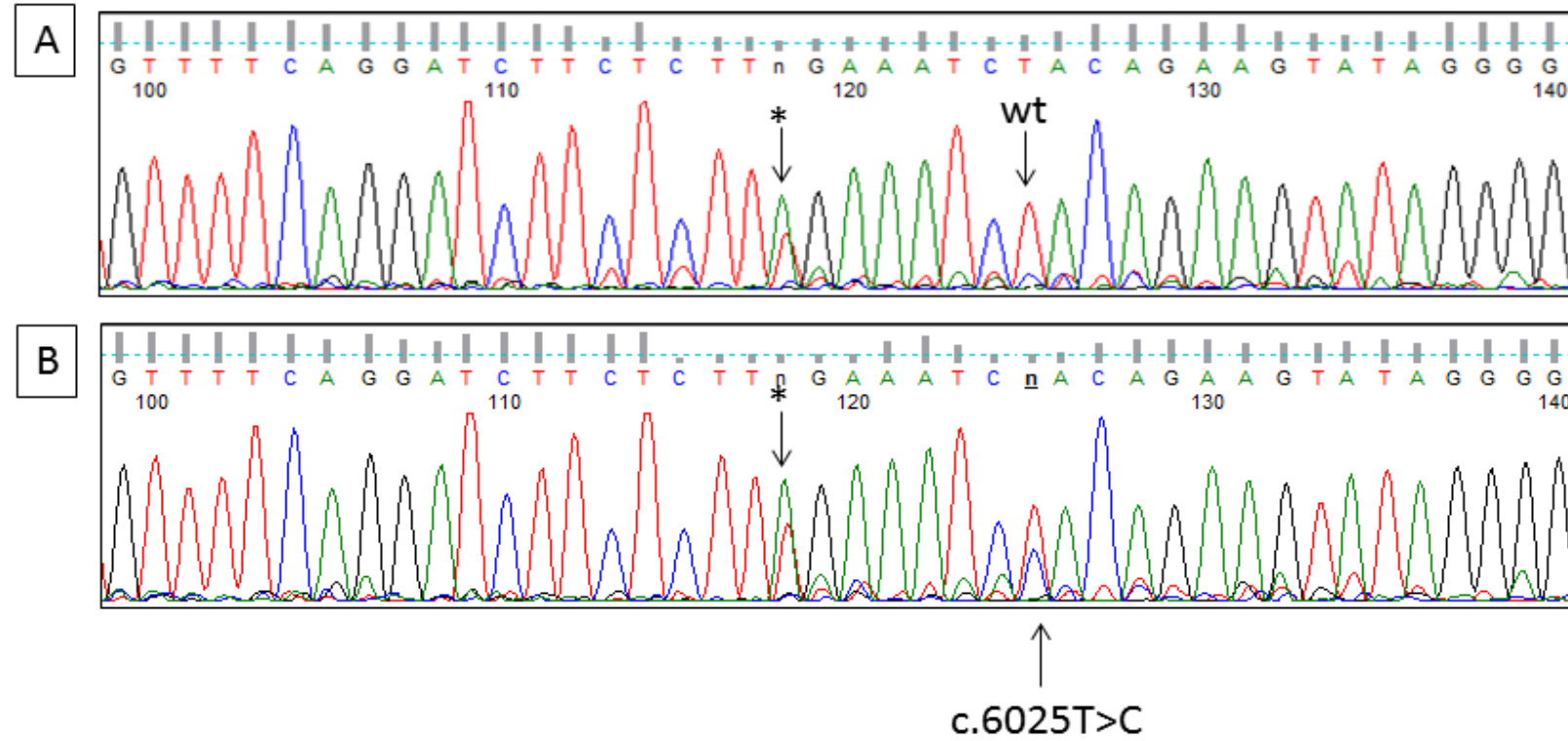


Figure 1. (A) shows a electropherogram of a wild type individual and (B), the variant c.6025T>C. This sequencing shows a region of lower quality and a common peak for all of our sequencing (*).

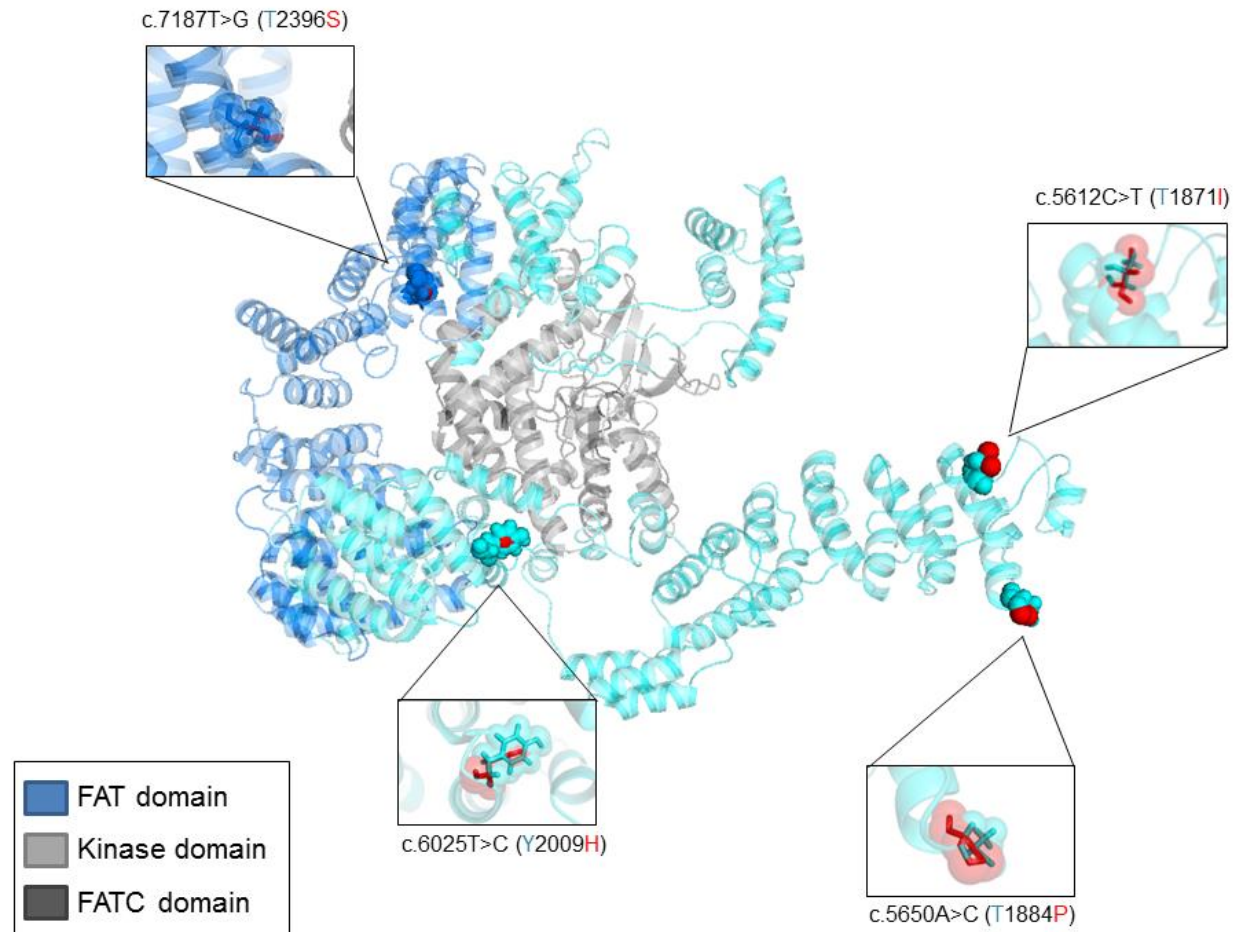


Figure 2. *In silico* illustration of four variants described in our cohort: c.5612C>T, c.5650A>C, c.6025T>C and c.7187C>G; and three ATM functional domains: FAT, kinase and FATC domain. Wild-type amino acid is represented in blue, and the mutated, in red.

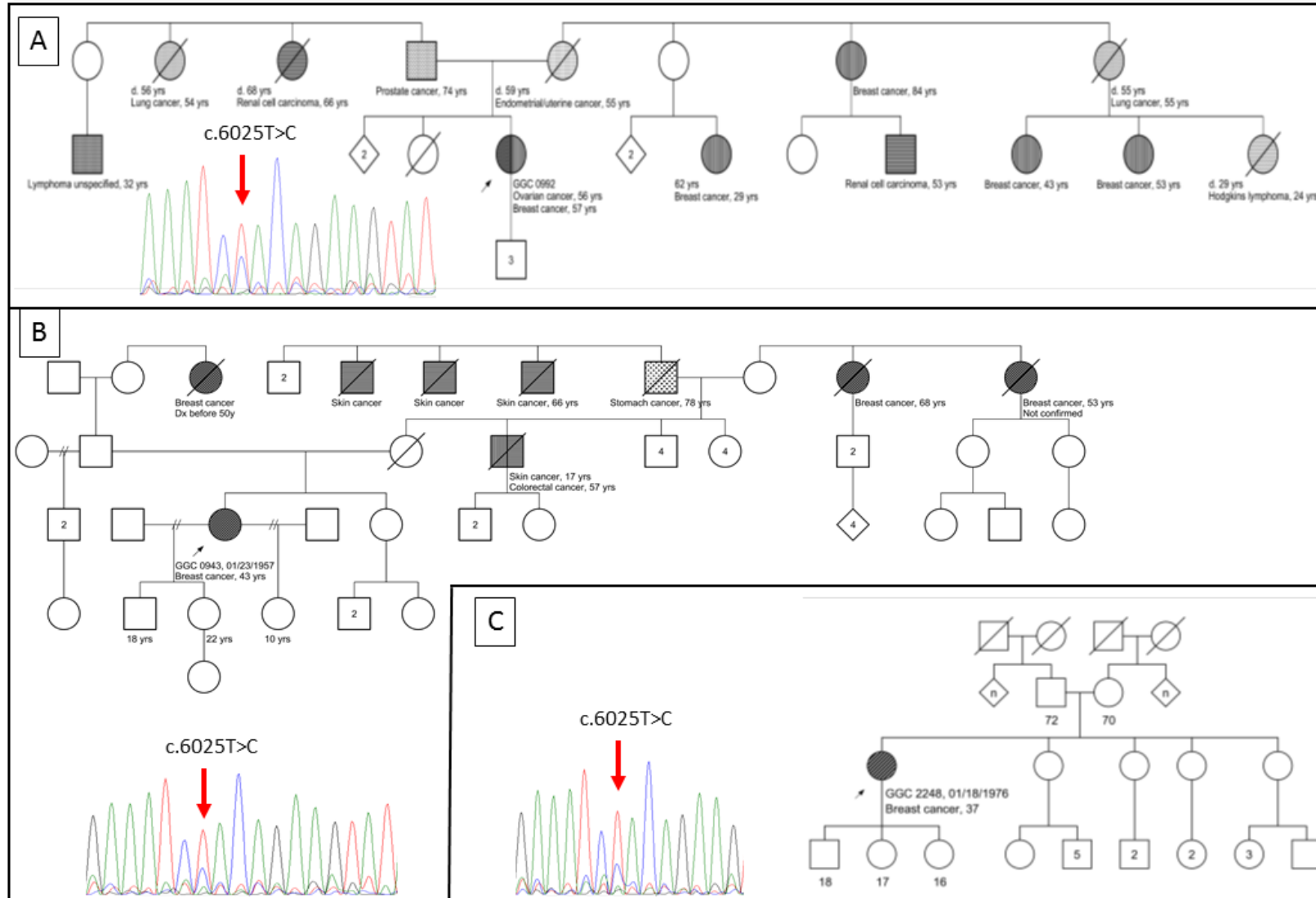


Figure 3. Pedigree of carriers of the variant of uncertain significance c.6025T>C

References:

- Adzhubei, I., Jordan, D.M., and Sunyaev, S.R. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet Chapter 7, Unit7.20*.
- Aloraifi, F., McDevitt, T., Martiniano, R., McGreevy, J., McLaughlin, R., Egan, C.M., Cody, N., Meany, M., Kenny, E., Green, A.J., *et al.* (2015). Detection of novel germline mutations for breast cancer in non-BRCA1/2 families. *FEBS J* 282, 3424-3437.
- Andreassen, C.N., Rosenstein, B.S., Kerns, S.L., Ostrer, H., De Ruyscher, D., Cesaretti, J.A., Barnett, G.C., Dunning, A.M., Dorling, L., West, C.M., *et al.* (2016). Individual patient data meta-analysis shows a significant association between the ATM rs1801516 SNP and toxicity after radiotherapy in 5456 breast and prostate cancer patients. *Radiother Oncol*.
- Angèle, S., Romestaing, P., Moullan, N., Vuillaume, M., Chapot, B., Friesen, M., Jongmans, W., Cox, D.G., Pisani, P., Gérard, J.P., *et al.* (2003). ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity. *Cancer Res* 63, 8717-8725.
- Bendl, J., Stourac, J., Salanda, O., Pavelka, A., Wieben, E.D., Zendulka, J., Brezovsky, J., and Damborsky, J. (2014). PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations. *PLoS Comput Biol* 10, e1003440.
- Bernstein, J.L., Bernstein, L., Thompson, W.D., Lynch, C.F., Malone, K.E., Teitelbaum, S.L., Olsen, J.H., Anton-Culver, H., Boice, J.D., Rosenstein, B.S., *et al.* (2003). ATM variants 7271T>G and IVS10-6T>G among women with unilateral and bilateral breast cancer. *Br J Cancer* 89, 1513-1516.
- Bretsky, P., Haiman, C.A., Gilad, S., Yahalom, J., Grossman, A., Paglin, S., Van Den Berg, D., Kolonel, L.N., Skaliter, R., and Henderson, B.E. (2003). The relationship between twenty missense ATM variants and breast cancer risk: the Multiethnic Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12, 733-738.
- Brunet, J., Gutiérrez-Enríquez, S., Torres, A., Bérez, V., Sanjosé, S., Galceran, J., Izquierdo, A., Menéndez, J.A., Gumà, J., and Borràs, J. (2008). ATM germline mutations in Spanish early-onset breast cancer patients negative for BRCA1/BRCA2 mutations. *Clin Genet* 73, 465-473.
- Calabrese, R., Capriotti, E., Fariselli, P., Martelli, P.L., and Casadio, R. (2009). Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum Mutat* 30, 1237-1244.
- Capriotti, E., Calabrese, R., and Casadio, R. (2006). Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics* 22, 2729-2734.
- Castéra, L., Krieger, S., Rousselin, A., Legros, A., Baumann, J.J., Bruet, O., Brault, B., Fouillet, R., Goardon, N., Letac, O., *et al.* (2014). Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Eur J Hum Genet* 22, 1305-1313.

Chenevix-Trench, G., Spurdle, A.B., Gatei, M., Kelly, H., Marsh, A., Chen, X., Donn, K., Cummings, M., Nyholt, D., Jenkins, M.A., *et al.* (2002). Dominant negative ATM mutations in breast cancer families. *J Natl Cancer Inst* *94*, 205-215.

Economopoulou, P., Dimitriadis, G., and Psyrris, A. (2015). Beyond BRCA: new hereditary breast cancer susceptibility genes. *Cancer Treat Rev* *41*, 1-8.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* *136*, E359-386.

Gatti, R.A., Tward, A., and Concannon, P. (1999). Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. *Mol Genet Metab* *68*, 419-423.

Gnad, F., Baucom, A., Mukhyala, K., Manning, G., and Zhang, Z. (2013). Assessment of computational methods for predicting the effects of missense mutations in human cancers. *BMC Genomics* *14 Suppl 3*, S7.

Graña, B., Fachal, L., Darder, E., Balmaña, J., Ramón Y Cajal, T., Blanco, I., Torres, A., Lázaro, C., Diez, O., Alonso, C., *et al.* (2011). Germline ATM mutational analysis in BRCA1/BRCA2 negative hereditary breast cancer families by MALDI-TOF mass spectrometry. *Breast Cancer Res Treat* *128*, 573-579.

Hirsch, A.E., Atencio, D.P., and Rosenstein, B.S. (2008). Screening for ATM sequence alterations in African-American women diagnosed with breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* *107*, 139-144.

INCa (2016). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil (Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer (INCa)).

Khanna, K.K., Keating, K.E., Kozlov, S., Scott, S., Gatei, M., Hobson, K., Taya, Y., Gabrielli, B., Chan, D., Lees-Miller, S.P., *et al.* (1998). ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. *Nat Genet* *20*, 398-400.

Kumar, P., Henikoff, S., and Ng, P.C. (2009). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc* *4*, 1073-1081.

Lei, H., Pospisilova, D., Lindblom, A., and Vorechovsky, I. (2002). Re: Dominant negative ATM mutations in breast cancer families. *J Natl Cancer Inst* *94*, 951-952; author reply 952.

Mangone, F.R., Miracca, E.C., Feilotter, H.E., Mulligan, L.M., and Nagai, M.A. (2015). ATM gene mutations in sporadic breast cancer patients from Brazil. *Springerplus* *4*, 23.

Maxwell, K.N., Wubbenhorst, B., D'Andrea, K., Garman, B., Long, J.M., Powers, J., Rathbun, K., Stopfer, J.E., Zhu, J., Bradbury, A.R., *et al.* (2015). Prevalence of mutations in a panel of breast cancer susceptibility genes in BRCA1/2-negative patients with early-onset breast cancer. *Genet Med* *17*, 630-638.

- McFarlin, D.E., Strober, W., and Waldmann, T.A. (1972). Ataxia-telangiectasia. *Medicine (Baltimore)* *51*, 281-314.
- Miosge, L.A., Field, M.A., Sontani, Y., Cho, V., Johnson, S., Palkova, A., Balakishnan, B., Liang, R., Zhang, Y., Lyon, S., *et al.* (2015). Comparison of predicted and actual consequences of missense mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, E5189-5198.
- Niroula, A., Urolagin, S., and Vihinen, M. (2015). PON-P2: prediction method for fast and reliable identification of harmful variants. *PLoS One* *10*, e0117380.
- Paglia, L.L., Laugé, A., Weber, J., Champ, J., Cavaciuti, E., Russo, A., Viovy, J.L., and Stoppa-Lyonnet, D. (2010). ATM germline mutations in women with familial breast cancer and a relative with haematological malignancy. *Breast Cancer Res Treat* *119*, 443-452.
- Renwick, A., Thompson, D., Seal, S., Kelly, P., Chagtai, T., Ahmed, M., North, B., Jayatilake, H., Barfoot, R., Spanova, K., *et al.* (2006). ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet* *38*, 873-875.
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., Grody, W.W., Hegde, M., Lyon, E., Spector, E., *et al.* (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. *Genet Med* *17*, 405-424.
- Schroeder, C., Faust, U., Sturm, M., Hackmann, K., Grundmann, K., Harmuth, F., Bosse, K., Kehrer, M., Benkert, T., Klink, B., *et al.* (2015). HBOC multi-gene panel testing: comparison of two sequencing centers. *Breast Cancer Res Treat* *152*, 129-136.
- Schwarz, J.M., Cooper, D.N., Schuelke, M., and Seelow, D. (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* *11*, 361-362.
- Sommer, S.S., Buzin, C.H., Jung, M., Zheng, J., Liu, Q., Jeong, S.J., Moulds, J., Nguyen, V.Q., Feng, J., Bennett, W.P., *et al.* (2002). Elevated frequency of ATM gene missense mutations in breast cancer relative to ethnically matched controls. *Cancer Genet Cytogenet* *134*, 25-32.
- Tavtigian, S.V., Byrnes, G.B., Goldgar, D.E., and Thomas, A. (2008). Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic- and molecular-epidemiology applications. *Hum Mutat* *29*, 1342-1354.
- Taylor, A.M., Harnden, D.G., Arlett, C.F., Harcourt, S.A., Lehmann, A.R., Stevens, S., and Bridges, B.A. (1975). Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. *Nature* *258*, 427-429.
- Thorstenson, Y.R., Roxas, A., Kroiss, R., Jenkins, M.A., Yu, K.M., Bachrich, T., Muhr, D., Wayne, T.L., Chu, G., Davis, R.W., *et al.* (2003). Contributions of ATM mutations to familial breast and ovarian cancer. *Cancer Res* *63*, 3325-3333.
- Tung, N., Domchek, S.M., Stadler, Z., Nathanson, K.L., Couch, F., Garber, J.E., Offit, K., and Robson, M.E. (2016). Counselling framework for moderate-penetrance cancer-susceptibility mutations. *Nat Rev Clin Oncol* *13*, 581-588.

Walsh, T., Casadei, S., Lee, M.K., Pennil, C.C., Nord, A.S., Thornton, A.M., Roeb, W., Agnew, K.J., Stray, S.M., Wickramanayake, A., *et al.* (2011). Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 18032-18037.

Young, E.L., Feng, B.J., Stark, A.W., Damiola, F., Durand, G., Forey, N., Francy, T.C., Gammon, A., Kohlmann, W.K., Kaphingst, K.A., *et al.* (2016). Multigene testing of moderate-risk genes: be mindful of the missense. *J Med Genet* *53*, 366-376.

Yue, P., Melamud, E., and Moulton, J. (2006). SNPs3D: candidate gene and SNP selection for association studies. *BMC Bioinformatics* *7*, 166.

Supplementary:

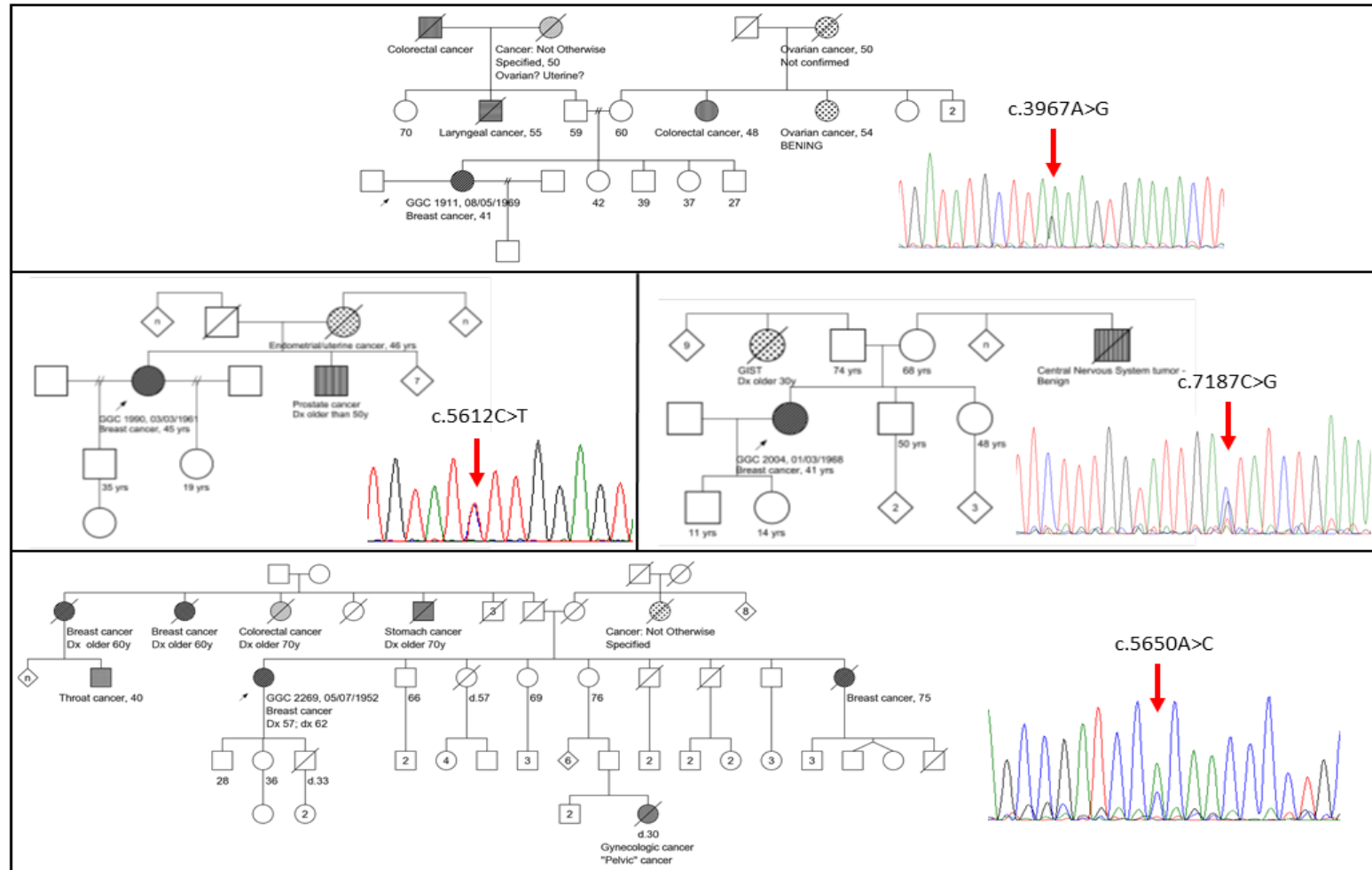


Figure S1: Family history of individuals carriers of VUS c.3967A>G, c.5612C>T, c.7187C>G and c.5650A>C.

5 Considerações finais

Nesse trabalho, foi possível realizar a caracterização molecular de regiões específicas do gene *ATM* em pacientes que preenchem critérios clínicos para síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário.

De acordo com os objetivos específicos propostos, as conclusões são:

1. Foram identificadas quatro regiões com alta prevalência de mutações germinativas patogênicas, sendo elas os éxons 26, 37, 41 e 49.
2. Foi analisada a variabilidade genética dessas regiões em indivíduos com critérios clínicos para a Síndrome HBOC, sendo encontrada uma alta prevalência de variantes de significado incerto. A mutação c.6025T>C ainda precisa ser confirmada pela fita reversa, e apresenta um possível potencial patogênico.
3. Foi possível avaliar o impacto das variantes encontradas na proteína ATM, através de preditores de efeito mutacional. A modelagem comparativa auxiliou na elucidação do impacto dessas variantes na proteína.
4. Os achados moleculares foram correlacionados com características clínicas dos pacientes (correlação genótipo-fenótipo), sendo apresentado o histórico familiar de pacientes portadores de variantes de significado incerto.

Referências

ADZHUBEI, I.; JORDAN, D. M.; SUNYAEV, S. R. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. **Curr Protoc Hum Genet**, v. Chapter 7, p. Unit7.20, Jan 2013. ISSN 1934-8258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23315928> >.

ALORAIFI, F. et al. Detection of novel germline mutations for breast cancer in non-BRCA1/2 families. **FEBS J**, v. 282, n. 17, p. 3424-37, Sep 2015. ISSN 1742-4658. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26094658> >.

ANDREASSEN, C. N. et al. Individual patient data meta-analysis shows a significant association between the ATM rs1801516 SNP and toxicity after radiotherapy in 5456 breast and prostate cancer patients. **Radiother Oncol**, Jul 2016. ISSN 1879-0887. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27443449> >.

ANGÈLE, S.; HALL, J. The ATM gene and breast cancer: is it really a risk factor? **Mutat Res**, v. 462, n. 2-3, p. 167-78, Apr 2000. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10767628> >.

ANGÈLE, S. et al. ATM haplotypes and cellular response to DNA damage: association with breast cancer risk and clinical radiosensitivity. **Cancer Res**, v. 63, n. 24, p. 8717-25, Dec 2003. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14695186> >.

BENDL, J. et al. PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations. **PLoS Comput Biol**, v. 10, n. 1, p. e1003440, Jan 2014. ISSN 1553-7358. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24453961> >.

BERNSTEIN, J. L. et al. ATM variants 7271T>G and IVS10-6T>G among women with unilateral and bilateral breast cancer. **Br J Cancer**, v. 89, n. 8, p. 1513-6, Oct 2003. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14562025> >.

_____. Population-based estimates of breast cancer risks associated with ATM gene variants c.7271T>G and c.1066-6T>G (IVS10-6T>G) from the Breast Cancer Family Registry. **Hum Mutat**, v. 27, n. 11, p. 1122-8, Nov 2006. ISSN 1098-1004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16958054> >.

BOSOTTI, R.; ISACCHI, A.; SONNHAMMER, E. L. FAT: a novel domain in PIK-related kinases. **Trends Biochem Sci**, v. 25, n. 5, p. 225-7, May 2000. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782091> >.

BRETSKY, P. et al. The relationship between twenty missense ATM variants and breast cancer risk: the Multiethnic Cohort. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 12, n. 8, p. 733-8, Aug 2003. ISSN 1055-9965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12917204> >.

BROEKS, A. et al. ATM-heterozygous germline mutations contribute to breast cancer-susceptibility. **Am J Hum Genet**, v. 66, n. 2, p. 494-500, Feb 2000. ISSN 0002-9297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10677309> >.

BRUNET, J. et al. ATM germline mutations in Spanish early-onset breast cancer patients negative for BRCA1/BRCA2 mutations. **Clin Genet**, v. 73, n. 5, p. 465-73, May 2008. ISSN 1399-0004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18384426> >.

BUCHHOLZ, T. A. et al. A Ser49Cys variant in the ataxia telangiectasia, mutated, gene that is more common in patients with breast carcinoma compared with population controls. **Cancer**, v. 100, n. 7, p. 1345-51, Apr 2004. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15042666> >.

CALABRESE, R. et al. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. **Hum Mutat**, v. 30, n. 8, p. 1237-44, Aug 2009. ISSN 1098-1004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19514061> >.

CAMINSKY, N. G. et al. Prioritizing Variants in Complete Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC) Genes in Patients Lacking known BRCA Mutations. **Hum Mutat**, Feb 2016. ISSN 1098-1004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26898890> >.

CAPRIOTTI, E.; CALABRESE, R.; CASADIO, R. Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. **Bioinformatics**, v. 22, n. 22, p. 2729-34, Nov 2006. ISSN 1367-4811. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16895930> >.

CASTÉRA, L. et al. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. **Eur J Hum Genet**, v. 22, n. 11, p. 1305-13, Nov 2014. ISSN 1476-5438. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24549055> >.

CHENEVIX-TRENCH, G. et al. Dominant negative ATM mutations in breast cancer families. **J Natl Cancer Inst**, v. 94, n. 3, p. 205-15, Feb 2002. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11830610> >.

CLAUS, E. B. et al. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. **Cancer**, v. 77, n. 11, p. 2318-24, Jun 1996. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8635102> >.

CUADRADO, M. et al. ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks. **J Exp Med**, v. 203, n. 2, p. 297-303, Feb 2006. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16461339> >.

DING, H. et al. Lack of association between ATM C.1066-6T > G mutation and breast cancer risk: a meta-analysis of 8,831 cases and 4,957 controls. **Breast Cancer Res Treat**, v. 125, n. 2, p. 473-7, Jan 2011. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20544271> >.

DÖRK, T. et al. Spectrum of ATM gene mutations in a hospital-based series of unselected breast cancer patients. **Cancer Res**, v. 61, n. 20, p. 7608-15, Oct 2001. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606401> >.

ECONOMOPOULOU, P.; DIMITRIADIS, G.; PSYRRI, A. Beyond BRCA: new hereditary breast cancer susceptibility genes. **Cancer Treat Rev**, v. 41, n. 1, p. 1-8, Jan 2015. ISSN 1532-1967. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25467110> >.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 2015. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842> >.

FERNANDEZ-CAPETILLO, O. et al. H2AX: the histone guardian of the genome. **DNA Repair (Amst)**, v. 3, n. 8-9, p. 959-67, 2004 Aug-Sep 2004. ISSN 1568-7864. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15279782> >.

GATTI, R. A.; TWARD, A.; CONCANNON, P. Cancer risk in ATM heterozygotes: a model of phenotypic and mechanistic differences between missense and truncating mutations. **Mol Genet Metab**, v. 68, n. 4, p. 419-23, Dec 1999. ISSN 1096-7192. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10607471> >.

GNAD, F. et al. Assessment of computational methods for predicting the effects of missense mutations in human cancers. **BMC Genomics**, v. 14 Suppl 3, p. S7, 2013. ISSN 1471-2164. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23819521> >.

GRAÑA, B. et al. Germline ATM mutational analysis in BRCA1/BRCA2 negative hereditary breast cancer families by MALDI-TOF mass spectrometry. **Breast Cancer Res Treat**, v. 128, n. 2, p. 573-9, Jul 2011. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21445571> >.

HIRSCH, A. E.; ATENCIO, D. P.; ROSENSTEIN, B. S. Screening for ATM sequence alterations in African-American women diagnosed with breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 107, n. 1, p. 139-44, Jan 2008. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17333338> >.

INCA. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer (INCA) 2016.

KHALIL, H. S.; TUMMALA, H.; ZHELEV, N. **ATM in focus: A damage sensor and cancer target**. Scotland: Biodiscovery. 5 2012.

KHANNA, K. K. Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 10, p. 795-802, May 2000. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10814674> >.

KHANNA, K. K. et al. ATM associates with and phosphorylates p53: mapping the region of interaction. **Nat Genet**, v. 20, n. 4, p. 398-400, Dec 1998. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9843217> >.

KHANNA, K. K.; LAVIN, M. F. Ionizing radiation and UV induction of p53 protein by different pathways in ataxia-telangiectasia cells. **Oncogene**, v. 8, n. 12, p. 3307-12, Dec 1993. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8247533> >.

KITAGAWA, R. et al. Phosphorylation of SMC1 is a critical downstream event in the ATM-NBS1-BRCA1 pathway. **Genes Dev**, v. 18, n. 12, p. 1423-38, Jun 2004. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15175241> >.

KUMAR, P.; HENIKOFF, S.; NG, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. **Nat Protoc**, v. 4, n. 7, p. 1073-81, 2009. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19561590> >.

KURIAN, A. W. et al. Clinical evaluation of a multiple-gene sequencing panel for hereditary cancer risk assessment. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 19, p. 2001-9, Jul 2014. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24733792> >.

LAVIN, M. F. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 10, p. 759-69, Oct 2008. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18813293> >.

LAVIN, M. F.; KOZLOV, S. ATM activation and DNA damage response. **Cell Cycle**, v. 6, n. 8, p. 931-42, Apr 2007. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17457059> >.

LEE, J. H.; PAULL, T. T. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. **Oncogene**, v. 26, n. 56, p. 7741-8, Dec 2007. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18066086> >.

LEI, H. et al. Re: Dominant negative ATM mutations in breast cancer families. **J Natl Cancer Inst**, v. 94, n. 12, p. 951-2; author reply 952, Jun 2002. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072552> >.

LERNER-ELLIS, J. et al. Genetic risk assessment and prevention: the role of genetic testing panels in breast cancer. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 15, n. 11, p. 1315-26, Nov 2015. ISSN 1744-8328. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26523341> >.

LINDEMAN, G. J. et al. Frequency of the ATM IVS10-6T-->G variant in Australian multiple-case breast cancer families. **Breast Cancer Res**, v. 6, n. 4, p. R401-7, 2004. ISSN 1465-542X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15217508> >.

MANGONE, F. R. et al. ATM gene mutations in sporadic breast cancer patients from Brazil. **Springerplus**, v. 4, p. 23, 2015. ISSN 2193-1801. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25625042> >.

MATSUOKA, S.; HUANG, M.; ELLEDGE, S. J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. **Science**, v. 282, n. 5395, p. 1893-7, Dec 1998. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9836640> >.

MAXWELL, K. N. et al. Prevalence of mutations in a panel of breast cancer susceptibility genes in BRCA1/2-negative patients with early-onset breast cancer. **Genet Med**, v. 17, n. 8, p. 630-8, Aug 2015. ISSN 1530-0366. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25503501> >.

MCFARLIN, D. E.; STROBER, W.; WALDMANN, T. A. Ataxia-telangiectasia. **Medicine (Baltimore)**, v. 51, n. 4, p. 281-314, Jul 1972. ISSN 0025-7974. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5033506> >.

MIOSGE, L. A. et al. Comparison of predicted and actual consequences of missense mutations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 112, n. 37, p. E5189-98, Sep 2015. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26269570> >.

NIROULA, A.; UROLAGIN, S.; VIHINEN, M. PON-P2: prediction method for fast and reliable identification of harmful variants. **PLoS One**, v. 10, n. 2, p. e0117380, 2015. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25647319> >.

PAGLIA, L. L. et al. ATM germline mutations in women with familial breast cancer and a relative with haematological malignancy. **Breast Cancer Res Treat**, v. 119, n. 2, p. 443-52, Jan 2010. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19404735> >.

PETO, J. et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 91, n. 11, p. 943-9, Jun 1999. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10359546> >.

PYLKÄS, K. et al. Evaluation of the role of Finnish ataxia-telangiectasia mutations in hereditary predisposition to breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 5, p. 1040-5, May 2007. ISSN 0143-3334. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17166884> >.

RENEWICK, A. et al. ATM mutations that cause ataxia-telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. **Nat Genet**, v. 38, n. 8, p. 873-5, Aug 2006. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16832357> >.

RICHARDS, S. et al. 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. **Genet Med**, v. 17, n. 5, p. 405-24, May 2015. ISSN 1530-0366. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25741868> >.

ROY, R.; CHUN, J.; POWELL, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 1, p. 68-78, Dec 2011. ISSN 1474-1768. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22193408> >.

SCHROEDER, C. et al. HBOC multi-gene panel testing: comparison of two sequencing centers. **Breast Cancer Res Treat**, v. 152, n. 1, p. 129-36, Jul 2015. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26022348> >.

SCHWARZ, J. M. et al. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. **Nat Methods**, v. 11, n. 4, p. 361-2, Apr 2014. ISSN 1548-7105. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24681721> >.

SHERRY, S. T. et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 1, p. 308-11, Jan 2001. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11125122> >.

SHILOH, Y.; ZIV, Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 14, n. 4, p. 197-210, Apr 2013. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23847781> >.

SMITH, J. et al. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. **Adv Cancer Res**, v. 108, p. 73-112, 2010. ISSN 0065-230X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21034966> >.

SOMMER, S. S. et al. Elevated frequency of ATM gene missense mutations in breast cancer relative to ethnically matched controls. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 134, n. 1, p. 25-32, Apr 2002. ISSN 0165-4608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11996792> >.

STANKOVIC, T. et al. ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. **Am J Hum Genet**, v. 62, n. 2, p. 334-45, Feb 1998. ISSN 0002-9297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9463314> >.

SZABO, C. I. et al. Are ATM mutations 7271T-->G and IVS10-6T-->G really high-risk breast cancer-susceptibility alleles? **Cancer Res**, v. 64, n. 3, p. 840-3, Feb 2004. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14871810> >.

TAVTIGIAN, S. V. et al. Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic- and molecular-epidemiology applications. **Hum Mutat**, v. 29, n. 11, p. 1342-54, Nov 2008. ISSN 1098-1004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18951461> >.

TAYLOR, A. M. et al. Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity. **Nature**, v. 258, n. 5534, p. 427-9, Dec 1975. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1196376> >.

THOMPSON, D. et al. Two ATM variants and breast cancer risk. **Hum Mutat**, v. 25, n. 6, p. 594-5, Jun 2005. ISSN 1098-1004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15880680> >.

THORSTENSON, Y. R. et al. Contributions of ATM mutations to familial breast and ovarian cancer. **Cancer Res**, v. 63, n. 12, p. 3325-33, Jun 2003. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810666> >.

TUNG, N. et al. Counselling framework for moderate-penetrance cancer-susceptibility mutations. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 13, n. 9, p. 581-8, Sep 2016. ISSN 1759-4782. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27296296> >.

UZIEL, T. et al. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. **EMBO J**, v. 22, n. 20, p. 5612-21, Oct 2003. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14532133> >.

WALSH, T. et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 44, p. 18032-7, Nov 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22006311> >.

WANG, K. et al. Interaction between BRCA1/BRCA2 and ATM/ATR associate with breast cancer susceptibility in a Chinese Han population. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 200, n. 1, p. 40-6, Jul 2010. ISSN 1873-4456. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20513533> >.

YOUNG, E. L. et al. Multigene testing of moderate-risk genes: be mindful of the missense. **J Med Genet**, v. 53, n. 6, p. 366-76, Jun 2016. ISSN 1468-6244. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26787654> >.

YUE, P.; MELAMUD, E.; MOULT, J. SNPs3D: candidate gene and SNP selection for association studies. **BMC Bioinformatics**, v. 7, p. 166, Mar 2006. ISSN 1471-2105. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16551372> >.