



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INSUMOS ESTRATÉGICOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
Setor Comercial Norte, Quadra 02, Projeção C - Térreo
CEP: 70712-902 Brasília – DF

Parecer Técnico n.º 47/2015/CGFPS/DECIT/SCTIE-MS

Brasília, 11 de agosto de 2015.

Assunto: Parecer Técnico sobre o Projeto “Retratos da Mama”.

1. Trata-se da análise do projeto “Retratos da Mama”, SIPAR 25000.069252/2015-79, submetido no âmbito do PRONON pela Fundação Faculdade de Medicina – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, CNPJ 56.577.059/0006-06, com valor total de R\$ 4.620.000,00 (quatro milhões, seiscentos e vinte mil reais) e prazo de execução previsto de 36 meses. A proposta encontra-se em consonância com as áreas prioritárias do PRONON definidas pelo Ministério da Saúde no artigo 6º da Portaria GM/MS nº 1.550/2014, enquadrando-se no item “VII - realização de pesquisa e desenvolvimento de inovações, tecnologias e/ou produtos para prevenção, diagnóstico e/ou tratamento de câncer”.
2. De acordo com a proposta apresentada, estão definidos os seguintes objetivos: a) Analisar as alterações moleculares do câncer de mama através de sequenciamento do exoma completo; b) Correlacionar os achados moleculares com os dados clínicos, epidemiológicos, características histológicas e imunohistoquímicas; c) Estudar e selecionar potenciais marcadores moleculares com relevância prognóstica (evolução clínica) ou preditiva (resposta ao tratamento); d) Estabelecer a padronização de metodologia (pouco invasiva) no plasma (CTCs, VEs e ctDNA); e) Analisar os potenciais marcadores moleculares encontrados no exoma no plasma para monitoramento do câncer de mama; f) Desenvolver um sistema informatizado que integre os diferentes bancos de dados dos pacientes com câncer de mama (molecular, clínico, anatomopatológico e de imagem) para análises integradas.
3. Após análise inicial, foi solicitada a instituição proponente a adequação da proposta ao anexo III da Portaria citada. O projeto com as alterações foi submetido à avaliação de dois consultores ad hoc, que assinaram termo de confidencialidade e declaração de isenção de interesses. Além dessa avaliação, também foi realizada uma análise financeira.
4. Com base nas observações, a proposta foi colocada em diligência, solicitando-se adequação orçamentária e metodológica. A resposta da instituição, com as alterações no projeto e os esclarecimentos, foi anexada a este processo.
5. Os consultores *ad hoc* avaliaram positivamente o Projeto “Retratos da Mama”, reconhecendo o mérito e a relevância científica. Destacaram como pontos positivos “a abrangência, a integração de dados clínicos e laboratoriais, o entendimento da biologia tumoral, a análise sem hipóteses *a priori* (varredura exômica) para identificação de potenciais biomarcadores de diagnóstico e o prognóstico”.

6. Apesar da avaliação positiva, foram questionados alguns aspectos metodológicos da proposta, os quais se recomenda que sejam observados pelos executores. A primeira questão levantada refere-se à adequação dos objetivos gerais ao cronograma, portanto foi recomendado que o recrutamento de pacientes e o processamento de materiais deverá ocorrer sem quaisquer intercorrências para garantir que as metas sejam cumpridas nos prazos previstos no estudo. Ressalta-se ainda a necessidade da descrição clara sobre o processo filtragem dos dados do exoma e de seleção de variantes relevantes para validação posterior. Além das observações citadas, no parecer *ad hoc* foi destacado como aspecto negativo o fato do projeto não esclarecer o tamanho da equipe, pois entende-se que um único bioinformata não será suficiente para analisar os dados gerados a partir de 200 exomas de tumor e 200 exomas de sangue periférico. Em síntese, considera-se que as recomendações apresentadas poderão contribuir para o aperfeiçoamento da proposta.

7. Com relação ao orçamento, após as adequações solicitadas, o valor final foi alterado para R\$ 4.510.000,00, dos quais estão previstos 14% para recursos humanos de apoio (R\$ 660.000,00), 30% para serviços de terceiro-pessoa Jurídica (R\$ 1.290.000,00), 29% para material de consumo (R\$1.350.000,00), 25% para equipamento e material permanente (R\$ 1.135.000,00), 1% para equipamentos de informática (R\$ 25.000,00) e 1% com despesas para captação de recursos.

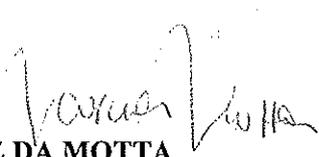
8. Diante do exposto, o Departamento de Ciência e Tecnologia **APROVA** o projeto “**Retratos da Mama**”, baseado nos termos dispostos na legislação vigente e fixando o montante de **R\$ 4.510.000,00** para sua execução.

É o parecer.


GILIANA BETINI
Consultor técnico

De acordo.

Encaminhe-se ao Gabinete SCTIE/MS para avaliação e assinatura.

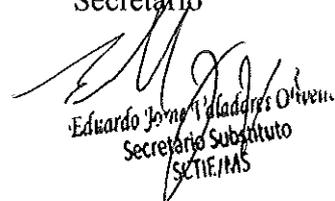

MÁRCIA LUZ DA MOTTA

Diretora Substituta do Departamento de Ciência e Tecnologia

Ciente.

Encaminhe-se ao Gabinete DESID/SE/MS para providências cabíveis.


ADRIANO MASSUDA
Secretário


Eduardo Jorge Valadres Oliveira
Secretário Substituto
SCTIE/MS

MINISTÉRIO DA SAÚDE

PARECER TÉCNICO Nº 5/2018-CGFPATS/DECIT/SCTIE/MS

Assunto: Parecer técnico referente à proposta de readequação do projeto “Retratos da Mama”, SIPAR 25000.069252/2015-79, submetido ao PRONON pela Fundação Faculdade de Medicina – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

1. Trata-se de resposta ao despacho 0930878/CPCN/CGPC/DESID/SE/MS com pedido de análise e emissão de parecer técnico conclusivo sobre a proposta de readequação apresentada no âmbito do projeto “**Retratos da Mama**”, SIPAR 25000.069252/2015-79, submetido ao PRONON pela Fundação Faculdade de Medicina – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, CNPJ 56.577.059/0006-06. O projeto de pesquisa com prazo de execução previsto de 36 meses, apresentado no exercício de 2015, foi aprovado no valor de R\$ 4.500.000,00.

2. A proposta tem como objetivos gerais: a) Analisar as alterações moleculares do câncer de mama através de sequenciamento do exoma completo; b) Correlacionar os achados moleculares com os dados clínicos, epidemiológicos, características histológicas e imunohistoquímicas; c) Estudar e selecionar potenciais marcadores moleculares com relevância na tumorigênese; d) Estabelecer a padronização de metodologia (pouco invasiva) no plasma (VEs e ctDNA); e) Desenvolver um sistema informatizado que integre os diferentes bancos de dados dos pacientes com câncer de mama (molecular, clínico, anatomopatológico e de imagem) para análises integradas.

3. A instituição solicitou a readequação do Plano de Trabalho em virtude do processo de captação de recursos ter superado as expectativas e alcançado o valor de R\$5.331.629,54, o que representou um acréscimo de 18,5% (R\$ 831.629,54), diferença prevista na portaria GM/MS 1550/2014.

4. Após análise técnica se identificaram as seguintes alterações:

Orçamento

- Mudança no item “análises estatísticas”- o valor passou de R\$ 100.000,00 para R\$ 245.495,00. Além disso, foi alterada essa rubrica - na versão anterior apresentada como serviço de terceiro e na readequação como Recursos Humanos de apoio;

- O item “consumíveis / insumos / amostras”, antes dividido entre “terceiros” e “material de consumo”, passou a uma única rubrica na readequação, “material de consumo”, e teve o valor alterado de R\$ 1.850.000,00 para R\$ 2.749.059,00;

- Redução dos valores do item “pessoal/RH” nos serviços de “monitoramento e registro”;

- Inclusão de bens no item “equipamentos/material permanente” e alteração dos valores aprovados na proposta inicial;

- Exclusão dos exames de imagem, antes previstos no valor de R\$ 90.000,00;

- O item “contratação de empresa para captação de doações” apresentou redução de 88%, caindo de R\$ 50.000,00 para R\$ 6.000,00, sendo que a diferença será utilizada para o pagamento de auditoria independente.

Metodologia/objetivo

- Verificaram-se mudanças no objetivo e na metodologia - antes estava prevista a inclusão de 200 pacientes com diagnóstico confirmado de câncer de mama de qualquer idade. Na adequação foi alterada para 50 pacientes com triplo negativo e idade inferior a 40 anos.

5.Com a finalidade de garantir maior transparência ao processo, foi solicitado que a instituição esclarecesse e justificasse adequadamente as alterações apresentadas no novo plano de trabalho. Também que apresentasse uma planilha discriminando e comparando as etapas e suas respectivas atividades (proposta inicial e na readequação), os equipamentos previstos (quantidades) e os valores necessários para sua execução.

6.Após análise da resposta recebida, também foi pedido à instituição um detalhamento do item “Consumíveis” no Plano de Trabalho no valor de R\$ 2.207.059,44 e a justificativa técnica para a o tamanho da amostra.

7.Em resposta às diligências, a instituição fez os seguintes esclarecimentos:

- O valor e a rubrica das “análises estatísticas” foram alterados, pois será contratado um especialista com bolsa científica TT5 da FAPESP (<http://www.fapesp.br/3162>). O valor inserido no projeto foi baseado na tabela FAPESP de dezembro/2016;

- O item “consumíveis”, registrado como material de custeio no valor de R\$ 2.207.059,44, será utilizado para a realização do sequenciamento das amostras das pacientes selecionadas participantes do estudo e estão detalhados conforme Quadro 1 apresentado a seguir.

Quadro 1: Descrição por grupos dos Consumíveis

TIPO DE CONSUMÍVEIS	Valor – R\$
Material para Coleta de Amostras	4.634,82
Plásticos e Reagentes para Processamento, Controle de Qualidade e Extração de Ácidos Nucleicos de Tecido	5.076,24
Plásticos e Reagentes para Processamento, Controle de Qualidade e Extração de Ácidos Nucleicos de Sangue	10.373,18
Plásticos e Reagentes para Preparação dos Ácidos Nucleicos para Análise por Exoma	1.918.817,48
Plásticos e Reagentes para Preparação dos Ácidos Nucleicos para Análise de Painel Por NGS	60.032,02
Plásticos e Reagentes para Análise de DNA Circulante (Digital PCR)	90.268,73
Plásticos e Reagentes para Padronização de Microvesículas	117.856,97
TOTAL	2.207.059,44

- A redução dos valores do item “pessoal/RH” ocorrerá em função da contratação de um profissional para atuação exclusiva no projeto nos serviços de “monitoramento e registro”, portanto foi excluída a necessidade de pagamento de horas extras de profissional da Instituição;

- Os exames de imagem antes previstos no valor de R\$ 90.000,00, caso necessário, serão realizados na própria Instituição, razão pela qual o valor foi retirado do projeto na readequação;

- Não foi necessária a contratação do serviço para captação de doações, porém no cálculo do serviço de auditoria, a instituição considerou apenas 12 meses. Visto que a

Portaria nº 1550/2014 prevê que os rendimentos financeiros podem ser utilizados no projeto, foi proposto que o recurso para complementar o valor para 36 meses seja utilizado dessa fonte;

- Além dos orçamentos incluídos no processo, a instituição esclareceu que a aquisição de “equipamentos/material permanente” será pautada por suas regras de compras vigentes que preza pela transparência e economicidade, conforme “Regulamento de Compras e Contratações”, publicado no DOE de 24/06/2017 (Nº SEI 2408201);

- Em relação às alterações nos objetivos e metodologia, conforme resposta anexada a este processo (Nº SEI 2408201), a instituição informou que o “principal ponto na readequação do projeto foi o enfoque dado a um subtipo de pacientes portadoras de câncer de Mama. No projeto original seria feita análise molecular em mulheres com câncer de mama, independente do seu subtipo. Na readequação, com o enfoque mais preciso em um subtipo de câncer de mama (triplo negativo), relativamente menos estudado que os demais subtipos, e focando em mulheres jovens (< 40 anos)”, acreditam “contribuir de maneira mais impactante com a geração de conhecimento original”.

8. Após análise técnica dos documentos enviados pela instituição, este Departamento se manifesta favorável às adequações solicitadas. Destaca-se que a utilização dos rendimentos para serviço de auditoria deverá ser solicitada antecipadamente.

9. Não foi identificado no processo o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa. Portanto, alerta-se que a execução da proposta está condicionada à obtenção da aprovação ética.

10. Diante do exposto, baseado nos termos dispostos na legislação vigente, o Departamento de Ciência e Tecnologia APROVA a readequação do projeto “Retratos da Mama”, SIPAR 25000.069252/2015-79, submetido ao PRONON pela Fundação Faculdade de Medicina – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, CNPJ 56.577.059/0006-06, no valor **R\$5.331.629,54**.

É o parecer.

GILIANA BETINI
Consultor Técnico

PATRÍCIA DE CAMPOS COUTO
Coordenadora-Geral de Fomento à Pesquisa e à Avaliação de Tecnologias em
Saúde- Substituta

PATRICIA DE SOUZA BOAVENTURA
Diretora do Departamento de Ciência e Tecnologia - Substituta



Documento assinado eletronicamente por **Camile Giaretta Sachetti**, **Diretor(a) do Departamento de Ciência e Tecnologia**, em 23/02/2018, às 13:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#); e art. 8º, da [Portaria nº 900 de 31 de Março de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia de Campos Couto**, **Coordenador(a)-Geral de Fomento à Pesquisa e à Avaliação de Tecnologias em Saúde, Substituto(a)**, em 22/03/2018, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#); e art. 8º, da [Portaria nº 900 de 31 de Março de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Giliana Betini**, **Consultor**, em 26/03/2018, às 11:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#); e art. 8º, da [Portaria nº 900 de 31 de Março de 2017](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.saude.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2409317** e o código CRC **E2EE50D0**.



Descrição do Projeto - PRONON



Retratos da Mama

1. Informações da Instituição

Instituição: Fundação Faculdade de Medicina – Instituto do Câncer do Estado de São Paulo

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo, 251

Bairro: Cerqueira Cesar

Município: São Paulo

CEP: 01246-000

Fone: (11) 3893-2727

Fax:

Email: direx@icesp.org.br

CNES: 6123740

CNPJ: 56.577.059/0006-06

Representante Legal: Flavio Fava de Moraes

2. Área de atuação

() Prestação de serviços médico-assistencial

() Formação, treinamento e aperfeiçoamento de recursos humanos em todos os níveis

(X) Realização de pesquisas clínicas, epidemiológicas e experimentais

3. Área Prioritária

() I - prestação de serviços médico-assistenciais voltados à atenção/cuidado da pessoa com câncer, principalmente as ações voltadas ao diagnóstico e estadiamento da doença, ao tratamento cirúrgico, quimioterápico e radioterápico, e aos cuidados paliativos;

() II - prestação de serviços desenvolvidos em casas de apoio quando estes estabelecimentos tiverem como público-alvo as pessoas com câncer;

() III - apoio à prestação de serviços de saúde por meio da adequação da ambiência dos estabelecimentos;

() IV - desenvolvimento de projetos de educação permanente e formação de recursos humanos direcionados a profissionais que atuam na área de saúde em todos os níveis de atenção, especialmente:

a) formação técnica na área de radioterapia;

b) formação de nível superior na área de radioterapia (físicomédico e radioterapeuta);

c) educação permanente na área de cuidados paliativos; e

d) educação permanente na área de oncologia pediátrica;

() V - realização de pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos custo-efetivos para

diagnóstico e terapêutica em câncer;

() VI - realização de pesquisas epidemiológicas, descritivas e analíticas, dos vários tipos de câncer existentes;

(X) VII - realização de pesquisa e desenvolvimento de inovações, tecnologias e/ou produtos para prevenção, diagnóstico e/ou tratamento de câncer;

() VIII - realização de pesquisas básicas e pré-clínicas que levem ao desenvolvimento de novos métodos diagnósticos ou terapêuticos em oncologia;

() IX - desenvolvimento de bancos de tumores;

() X - realização de pesquisas para avaliação de políticas, serviços, programas e ações de saúde em oncologia.

4. Informações Gerais do Projeto

Título do Projeto: Retratos da Mama

Pesquisador Principal

Nome: Roger Chammas

Professor Titular de Oncologia (área: Oncologia Básica)

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1B

Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6888998874990744>

Researcher Id <http://www.researcherid.com/rid/A-8004-2011>

Telefone: (11) 38932767

E-mail: rchammas@usp.br

Valor total do projeto: R\$ 5.331.629,54

Período de Execução: 36 meses

5. Introdução

O câncer de mama é a segunda neoplasia mais comum no mundo, e a primeira entre as mulheres. As estimativas do GLOBOCAN mostraram que na América Latina tem-se aproximadamente 115.000 novos casos de câncer de mama a cada ano (Ferlay, 2010) e no Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se a ocorrência de cerca de 57.120 novos casos em 2014 (INCA, 2014).

No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. A sobrevivência média mundial após cinco anos é de 61%, são relativamente raros antes da idade de 35 anos, acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente (INCA, 2014).

O câncer de mama é uma doença de grande heterogeneidade clínica e fenotípica, e seu comportamento é apenas parcialmente explicado pelos dados clínicos e anatomopatológicos usualmente utilizados para tomadas de decisão clínica como idade, antecedentes reprodutivos, tipo e grau histológico, tamanho do tumor, estádio, envolvimento do linfonodo nas axilas e outros (Curtis, 2015; Elston et al., 1999).

Os carcinomas são a maioria das neoplasias malignas da mama, representando aproximadamente 90% dos tumores malignos que acometem esse órgão. Os carcinomas da mama são divididos em carcinomas invasivos do tipo não especial (mais comum, variando entre 40% e 75% dos casos) e os tipos especiais, que compreendem mais de 15 subtipos, sendo o lobular o mais comum (5% a 15% dos casos). (Lakhani - WHO Classification, 2012).

Na prática clínica atual, na definição de tratamento do câncer de mama invasivo, além do tipo histológico, são utilizados 3 biomarcadores reconhecidos pela imunohistoquímica ou por *Fluorescent in Situ hybridization* (FISH): Receptor de Estrógeno (RE), Receptor de Progesterona (RP) e *Human Epidermal Receptor* (HER2) (Allred, 2010).

Mais recentemente, o câncer de mama passou também a ser classificado de acordo com seu perfil molecular, sendo reconhecidos 6 subtipos distintos: luminal A, luminal B, Her2+, *basal-like* e *claudin-low* e *normal-like*, que guardam alguma correlação com os marcadores imunohistoquímicos (Prat e Perou, 2011).

Embora só a classificação molecular ainda não seja aplicável na prática clínica por não estar completamente padronizada e pelo seu alto custo, tem contribuído com informações importantes referentes à biologia dos tumores e tem permitido um melhor entendimento sobre as vias de sinalização de processos da tumorigênese (Eroles et. al, 2012).

A definição de subtipos de câncer de mama têm importante implicação clínica, prognóstica e no desenvolvimento de terapias alvo (Perou et al, 2000; Munirah et al., 2011). Como um dos exemplos dessa contribuição, é o maior entendimento sobre o Câncer de Mama Triplo Negativo, subtipo caracterizado pela ausência de expressão dos receptores de estrógeno e progesterona, e ausência da hiperexpressão do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2) (Bauer, 2007; Nielsen, 2004). Esses tumores representam entre 10 e 15% de todos os casos de câncer de mama diagnosticados (Carey, 2010), ocorrem em mulheres mais jovens (Dent, 2007), apresentam com maior frequência um comportamento mais agressivo, estando relacionados a uma menor sobrevivência (Bauer, 2007; Dent, 2007).

Apesar de ser geralmente abordado como um subtipo único, trata-se de um grupo heterogêneo do ponto de vista da expressão gênica, composto em sua maioria por tumores *basal-like* e frequentemente associados à mutação do gene *Breast Cancer 1 (BRCA1)* (Heitz, 2009). Apesar da alta sensibilidade à quimioterapia, esse subtipo tem prognóstico desfavorável quando comparado a outros subtipos, o que

parece decorrer da falta de terapias específicas (hormonal e anti-HER2), além do predomínio de grau III, alto índice de proliferação e presença de metástases frequente (Heitz, 2009).

O avanço na tecnologia de análise de sequenciamento genômico de larga escala, incluindo o sequenciamento paralelo em massa (MPS), tem permitido uma caracterização detalhada de alterações somáticas de tumores esporádicos, incluindo mutações, aberrações estruturais, número de cópias, mudanças de transcrição e modificações epigenéticas (Banerji, 2012; Curtis, 2012; Curtis, 2015; Ellis, 2012; Nik-Zainal, 2012a; Nik-Zainal, 2012b; Shah, 2012; Stephens, 2012; Cancer Genome Atlas Network, 2012). A integração de perfis genéticos e transcricionais, tem levado à identificação de novos subtipos de câncer de mama, adicionando novas informações sobre a biologia da doença, resultando em uma melhor taxonomia molecular, que refina os esquemas de classificação existentes (Curtis, 2012).

Outra aplicação para o sequenciamento de larga escala utilizando MPS tem sido a busca ativa de novos genes que possam contribuir para o câncer de mama familiar, além dos genes *BRCA1* e *BRCA2* já bastante conhecidos (Miki et al., 1994; Wooster et al., 1995). Genes de penetrância elevada adicionais têm sido identificados para esta doença, tais como *TP53*, *PTEN* ou *STK11* no entanto, o seu número não é ainda tão elevada como previsto originalmente (Borresen et al., 1992; Lynch et al., 1997; Giardiello et al., 2000). O sequenciamento MPS foi utilizado para analisar 7 famílias *BRCA1 / BRCA2* negativas, cada um com pelo menos seis mulheres afetadas com câncer de mama diagnosticados com idade inferior a 60 anos de várias gerações. Após estudos de filtragem extensa, validação por *Sanger* e co-segregação, as variantes foram priorizadas, quer através de estudos de controle populacional, incluindo até 750 indivíduos saudáveis, ou ensaios de caso-controle, abrangendo 5237 amostras (2693 casos e 2544 controles de diferentes origens étnicas vindos de vários centros de *Consortium* de câncer de mama). Como resultado, um grupo de pacientes com uma variante conhecida de suscetibilidade moderada *indel* (CHEK2 1100delC) e com uma lista de 11 variantes raras apresentaram alguma associação para o risco o câncer de mama (Gracia-Aznarez et al., 2013). Todos os genes afetados estavam envolvidos em importantes mecanismos celulares tais como reparo do DNA, proliferação e sobrevivência celular ou de regulação do ciclo celular (Gracia-Aznarez et al., 2013). Esses autores sugeriram outros estudos com um número maior de famílias, utilizando a estratégia de análise de todo exoma (seqüenciamento do genoma inteiro), caso-controle, estudos de associação, incluindo milhares de amostras e resequenciamento de regiões genômicas que contenham variantes raras para a confirmação dos resultados e para definir o perfil genético de famílias negativas para *BRCA1 / BRCA2* (Gracia-Aznarez et al., 2013).

A identificação de novos biomarcadores moleculares permitirá uma escolha mais precisa dos recursos terapêuticos, aumentando os índices de resposta e evitando a exposição de pacientes que não se beneficiariam com o tratamento a medicamentos tóxicos.

Esforços estão sendo feitos para o desenvolvimento de biomarcadores prognósticos e preditivos a partir de análises do tecido tumoral. O espectro de mutações de *TP53* foi considerado de importância prognóstica em vários subgrupos, incluindo *IntClust 1* (ER-positivo, luminal B), *IntClust 4* (CNA-desprovido) e *IntClust 5* específica do subtipo (HER2-positivos), mas não em pacientes com tumores *luminal A* e *basal-*

like (Silwal et al., 2014). Foram analisados o espectro de mutações no gene *TP53* e testados 50 genes utilizados para identificar subtipos de câncer de mama baseados em risco de recidiva para este subgrupo dentro de uma coorte *Molecular Taxonomy of Breast Cancer International Consortium* (METABRIC) (Parker, 2009; Curtis, 2012; Silwal et al., 2014).

No entanto, a análise do tecido tumoral, costuma estar limitada a uma coleta única, em um momento determinado, e está sujeita ao erro de seleção resultante da heterogeneidade intratumoral. Além disso, no caso das metástases, geralmente de mais difícil acesso para biópsias, essa análise fica ainda mais prejudicada. Outro desafio ainda presente da oncologia é o desenvolvimento de métodos pouco invasivos para o monitoramento do tumor de um mesmo paciente, ao longo do tempo. O estudo em amostras de sangue periférico representa uma solução ideal para esses dois problemas, apresentando-se como alternativa de fácil implementação e mínimo risco para o paciente. Assim, a obtenção do perfil genômico do sangue se tornou uma alternativa com abordagem pouco invasiva para detectar e monitorar a progressão da doença em tempo real e, portanto, poderá ter grande utilidade no tratamento do câncer de mama (De Mattos-Arruda, 2013).

Os três constituintes de derivados de plasma e/ou soro são: células tumorais circulantes (CTCs), vesículas extracelulares (VE), fragmentos de DNA livres de células (ctDNA). Os ctDNA e CTCs são os mais estudados, sendo que as VEs vêm recebendo grande atenção nas pesquisas em câncer (Bettegowda, 2014).

Os ctDNAs, fragmentos de DNA livres isentos de células, são eliminados na corrente sanguínea pelas células apoptóticas ou com necrose. Portanto, ctDNA parece compreender um pool de DNA com uma representativa heterogeneidade, sendo que os níveis de ctDNA têm sido relacionados ao estadiamento do tumor e seu prognóstico (Bettegowda, 2014). Além disso, a detecção ctDNA pode ser utilizado para prever uma recidiva antes do exame clínico e radiológico, permitindo uma avaliação da resposta ao tratamento (Bettegowda, 2014; Newman, 2014). Outra aplicação do ctDNA que vem sendo testada é no monitoramento do câncer de mama metastático e controle do aparecimento de subclones resistentes à terapia alvo (Dawson, 2013; Murtaza, 2013). Além disso, o ctDNA vem sendo avaliado como um biomarcador em diversas malignidades (Bettegowda, 2014).

Os avanços tecnológicos que permitem a detecção sensível de ctDNA em pequenas quantidades de plasma reforçam a utilidade do método na detecção e monitoramento da dinâmica clonal, em uma grande variedade de doenças malignas (Newman, 2014).

A detecção e o número de CTCs no sangue periférico de pacientes com câncer de mama metastático tem se mostrado um marcador de prognóstico independente dos ctDNA (Wallwiener, 2013). As contagens de CTCs em câncer de mama metastático confirmaram a validade clínica mas não identificaram nenhuma associação significativa com qualquer subgrupo molecular dos tumores de mama primário (Bidard, 2014).

No contexto em que uma nova biópsia não puder ser obtido, ctDNA pode fornecer informação

molecular adicional em comparação com o DNA de tecido parafinado para determinar o estado atual do câncer, por exemplo. *Gevensleben et al.* 2013, descreveram a otimização de um método de PCR digital para detecção da amplificação de HER2 em ctDNA de pacientes com câncer de mama metastático, utilizando uma coorte de análise (65 pacientes) e uma coorte de validação independente (58 pacientes). A análise do estado de HER2 foi realizado em pacientes com câncer de mama que não tinham uma biópsia de tumor recorrente como parte de sua rotina. O estudo mostrou que três pacientes com câncer de mama metastático adquiriram HER2-positivo na recidiva da doença, apesar de serem previamente classificados como HER2 negativo no tecido da biópsia (*Gevensleben*, 2013).

A avaliação do estado de HER2 é fundamental para o seguimento do paciente no câncer de mama e os métodos atuais para o avaliação do conteúdo HER2 em tumores, principalmente por imunohistoquímica e hibridização fluorescente *in situ*, tem suas limitações (*Shah*, 2010). Os pacientes com doença metastática que forem identificados como HER2-positivo podem se beneficiar da terapia anti-HER2, como o *trastuzumab* (*Shah*, 2010).

O estudo de perfis no ctDNA no mesmo paciente continua sendo um desafio. Os esforços para a identificação de biomarcadores circulantes que levem à detecção precoce da doença agressiva, incluindo o perfil molecular de VEs (exossomos e microvesículas), estruturas de membranas liberadas por vários tipos de células, que também possuem material genético, são importantes devido ao seu papel da comunicação intercelular na progressão do câncer (*Sun et al.*, 2014). Após a separação da membrana de origem, as VEs tornam-se móveis e podem se deslocar do espaço extracelular para o sangue e outros fluidos corporais (*Sun et al.*, 2014).

As VEs podem ser divididos em três classes principais: exossomos 30-a 100 nm, microvesículas (100-1000 nm), e corpos apoptóticos (1-5 μ m) (*Corrado*, 2013). Exossomos contêm uma grande variedade de moléculas bioativas, incluindo sinal de peptídeos, microRNA, lipídios e DNA. Sabe-se que, no câncer, as células tumorais secretam grandes quantidades de exossomos para transporte de sinal parácrino ou para contribuir para a interação do microambiente tumoral a distância (*Sun et al.*, 2014). Apesar do potencial como biomarcador em câncer, a identificação e quantificação de VEs em amostras clínicas continua sendo importante (*Yoshioka*, 2014). Os trabalhos que descrevem técnicas de análise de biópsia líquida para detectar sensibilidade de VEs circulantes específicos do tumor abrem novas perspectivas na medicina translacional do ponto de vista de diagnóstico e terapêutica (*Yoshioka*, 2014).

Microvesículas isoladas a partir de uma variedade de linhagens de células tumorais foram analisadas quanto ao teor de exoRNA. O estudo permitiu propor que microvesículas tumorais também transportariam DNA, além de um conjunto de proteínas seletivas e RNAs, aumentando assim o teor de ácidos nucleicos incluindo níveis elevados de codificação específica de RNA e DNA não codificante, e as sequências de oncogenes e elementos transponíveis. Assim, microvesículas tumorais contêm um repertório de informação genética para transferência horizontal de genes, com potencial utilização como biomarcadores de câncer (*Balaj et al*, 2011). *Van der Vos et al*, 2011 caracterizaram o tamanho e quantidade de microvesículas por *Nanoparticle Tracking Analysis* no modelo de tumor de cérebro (*Van der*

Vos *et al.*, 2011).

A Figura 1 mostra um exemplo de aplicação de monitoramento de alterações genéticas específicos de tumores para detectar recidiva e resistência ao tratamento utilizado em câncer colorretal utilizando a metodologia de análise não invasiva de sangue (Crowley *et al.*, 2013):

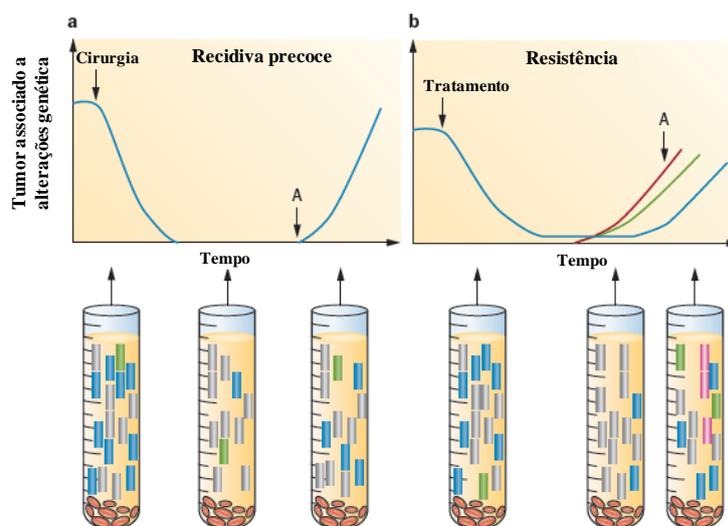


Figura 1. Monitoramento de alterações genéticas específicos de tumores para detectar recidiva e resistência ao tratamento. A Figura representa dois cenários clínicos hipotéticos em que: a) as alterações genéticas no plasma ou soro sanguíneo podem ser rastreados na sequência de uma cirurgia, para monitorar sinais de recidiva precoce e b) clones resistentes podem ser reconhecidos durante o tratamento com terapia-alvo (tais como anticorpos monoclonais anti-EGFR em câncer colorretal). "A" representa o tempo de recorrência clinicamente detectável ou recaída. A linha azul representa uma mutação "fundadora" (que ocorrem mais cedo) que está presente por toda a massa do tumor e reflete carga global do tumor. As linhas vermelhas e verdes representam aberrações genéticas associadas com o crescimento e expansão de clones resistentes (Crowley *et al.*, 2013)

A análise de sequenciamento de genoma larga escala de DNA para identificar os diferentes perfis moleculares do câncer de mama em nosso meio e a posterior análise integrada aos dados histológicos e imunoistoquímicos, achados de imagem e evolução clínica (compreendendo padrão da apresentação, estadio ao diagnóstico, evolução e resposta aos tratamentos) devem nos levar a identificação de fatores preditivos e prognósticos específicos para os diferentes subtipos de câncer de mama (van de Vijver *et al.*, 2002; Paik *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Essas informações permitirão, em um futuro próximo, estabelecermos a orientação terapêutica de cada paciente a partir da análise de seu painel molecular, além de abrir espaço para o desenvolvimento de novos e mais eficazes tratamentos (Eroles *et al.*, 2012).

Em paralelo, o desenvolvimento de técnicas altamente sensíveis e padronizados para analisar biomarcadores circulantes será importante para o melhor monitoramento da dinâmica de tumor de mama de maneira individualizada. Portanto, o desenvolvimento de um método padronizado de isolamento de VEs e

ctDNA no plasma e a análise dos genes envolvidos na tumorigênese e possíveis descobertas de potencial marcadores prognóstico e/ou preditivo de resposta a tratamento para monitoramento da evolução do tumor será importante ao paciente com câncer. A detecção de mutações associadas a tumores no sangue pode ser usado na clínica após o diagnóstico, incluindo a avaliação do prognóstico, a detecção precoce de recorrência da doença, e como substitutos para biópsias tradicionais, com o objetivo de prever a resposta aos tratamentos e o desenvolvimento de resistência adquirida (Crowley, 2013). Após a padronização destas técnicas, será preciso avaliar sua reprodutibilidade e seu custo-efetividade, bem como validá-la de forma prospectiva em ensaios clínicos.

Enquanto a análise integrada dos marcadores moleculares e dados de evolução clínica e resposta ao tratamento devem nos levar a identificação de novos possíveis biomarcadores (prognósticos e preditivos), a combinação dos dados de imagem a essas análises permitiriam correlacionar padrões radiológicos à expressão de genes específicos, com informações sobre a patofisiologia celular subjacente (Rutman e Kuo, 2009; Goyen, 2014).

A associação de padrões de expressão gênica a imagens radiológicas tem sido objeto de estudo da Radiogenômica, que busca avançar no diagnóstico das doenças de forma independente da análise tecidual. Os resultados dessa integração já começam a ser colhidos. Em estudos envolvendo hepatocarcinoma e glioblastoma multiforme, achados de imagem puderam ser correlacionados com perfis genéticos distintos, demonstrando potencial para indicação de prognóstico da doença (Rutman e Kuo, 2009), enquanto a integração de dados de expressão gênica de casos de câncer de mama a achados de ressonância nuclear magnética dessas pacientes parecem promissores (Yamamoto, 2012).

Aproximar as descobertas da biologia molecular dos achados clínicos para uma maior compreensão das doenças é o objetivo da Pesquisa Translacional. O reconhecimento do possível marcador preditivo e prognóstico nos achados moleculares, poderão permitir estabelecer estratégias de tratamento mais eficazes e menos tóxicas para cada paciente baseado em seu perfil molecular, o que se convencionou chamar de Medicina Personalizada (Tenenbaum *et al.*, 2014).

O processamento do grande volume de informações proveniente da análise do genoma vem sendo possível pelo desenvolvimento tecnológico das últimas décadas. Integrar esses dados aos achados de imagem, anatomopatológicos e clínicos vem somando esforços de vários grupos de pesquisa no mundo (Tenenbaum *et al.*, 2014).

O primeiro desafio a ser vencido é a coleta padronizada e o registro estruturado dos dados. Apesar da progressiva adoção de sistemas eletrônicos de informação, o registro estruturado de dados clínicos se mantém como rara exceção nos serviços de saúde em nosso país (TIC Saúde 2013).

No Brasil, mesmo os prontuários eletrônicos de última geração oferecem apenas campos livres para o registro de dados anatomopatológicos e clínicos relevantes, o que costuma exigir registro complementar (acessório) de informações para o desenvolvimento de pesquisas clínicas. Na busca de correlações moleculares e clínicas, a estruturação dessas informações se mostra fundamental para permitir as análises

futuras (McDonald *et al.*, 2014).

O passo seguinte é a integração das diferentes bases de dados e análise exploratória desse grande volume de informação. Fundamentais para esse processo é a combinação de recursos computacionais aos conhecimentos em bioinformática, que tem permitido o processamento em larga escala e a aplicação de técnicas analíticas de forma custo-efetiva (O'Driscoll *et al.*, 2013).

Em resumo, o presente projeto tem como objetivos principais: a) analisar as alterações moleculares do câncer de mama através de sequenciamento do exoma completo; b) correlacionar os achados moleculares aos elementos de imagem, características histológicas e imunoistoquímicas, dados epidemiológicos e evolução clínica de cada paciente; c) estabelecer a padronização de metodologia (pouco invasiva) no plasma (VEs e ctDNA), d) desenvolver ferramentas para análise integrada das diferentes bases de dados.

6. Justificativa

A análise de sequenciamento do exoma permitirá encontrar diferentes perfis moleculares do câncer de mama em nosso meio. A associação desses perfis aos achados de imagem, padrões histológicos e imunohistoquímicos e comportamento clínico (incluindo resposta aos tratamentos) dessas pacientes permitirá alcançar uma maior compreensão dessa doença, podendo levar à potenciais marcadores preditivos e prognósticos específicos para os diferentes subtipos de câncer de mama.

Nos últimos anos a incidência de câncer de mama em mulheres jovens (<40 anos) tem aumentado, chamando a atenção para uma população anteriormente considerada de baixo risco para desenvolvimento desse tipo tumoral. Esse projeto irá focar no estudo e busca de compreensão dessa população específica, comparando-a com a população mais idosa, com ênfase no subtipo molecular triplo-negativo.

Hoje o entendimento da formação tumoral e heterogeneidade do tumor são provenientes de amostras de biópsias ou de cirurgia. Esse é um retrato único de uma dada região do tumor. O estabelecimento de metodologia (pouco invasiva) para monitoramento do câncer pela análise molecular de material circulante no plasma (vesículas extracelulares e DNA circulante), poderá trazer informações relevantes sobre o processo da tumorigênese. Além disso, a identificação no plasma de potenciais marcadores moleculares, tanto prognósticos quanto preditivos de resposta ao tratamento, abriria espaço para um novo modelo de acompanhamento da terapia oncológica no futuro.

Para obter o painel molecular de cada paciente, neste presente estudo, serão coletadas amostras suspeitas de serem tumorais provenientes de Biópsias no Instituto de Radiologia-Hospital das Clínicas (Inrad-HC -FUMSP) e no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) e de ressecção cirúrgica tumoral no ICESP. Paralelamente serão colhidas amostras de sangue das pacientes no momento da coleta do tecido. Após análise histopatológica, os tecidos com resultados positivos para câncer de mama serão armazenados no biobanco. Será realizada então uma análise molecular para os seguintes marcadores:

Estrógeno, Progesterona e ERB-B2. Os tumores que apresentarem marcação negativa para os três marcadores (Triplonegativos) serão incluídos nesse projeto, realizando as análises moleculares do tumor/sangue e a padronização de metodologia para análise do conteúdo no plasma (vesículas extracelulares e DNA circulante), de acordo com a sequência abaixo:

a) analisar as alterações moleculares do câncer de mama através de sequenciamento do exoma completo; b) correlacionar os achados moleculares com os dados clínicos, epidemiológicos, características histológicas e imunohistoquímicas; c) estabelecer a padronização de metodologia (pouco invasiva) no plasma; e d) integrar e analisar os dados moleculares, clínicos, histológicos, imunohistoquímicos das pacientes com câncer de mama.

Os demais tumores de mama que não se encaixarem no perfil serão armazenados no biobanco para futuros estudos em outros projetos.

Além dos resultados diretos desse estudo, a coleta de material fornecerá subsídio para muitos estudos a longo prazo, uma vez que pacientes com esse tipo de câncer apresentam alta taxa de sobrevivência em comparação a outros tumores, permitindo um extenso acompanhamento.

7. Hipótese

A análise de sequenciamento do exoma permitirá identificar diferentes perfis moleculares do câncer de mama em mulheres jovens em nosso meio. A associação dessas informações aos achados de imagem, padrões histológicos e imunohistoquímicos e dados de evolução clínica, incluindo respostas aos tratamentos, trará uma compreensão única sobre a doença, podendo levar a identificação de fatores preditivos e prognósticos específicos para esse subtipo de câncer de mama.

Os painéis moleculares gerados tem potencial de se tornar no futuro, um guia importante para a orientação terapêutica, abrindo ainda espaço para o desenvolvimento de possíveis novos tratamentos.

Em paralelo, o desenvolvimento de técnicas padronizadas para análise do conteúdo no plasma abre espaço para a implementação de um novo modelo para monitoramento da dinâmica de tumor de mama individualizado. No futuro, a identificação de alvos moleculares associados ao tumor de mama na circulação vão trazer informações genéticas adicionais para o entendimento do processo de progressão tumoral em função da facilidade com que o material pode ser obtido antes e depois do tratamento.

A integração de resultados moleculares, dados clínicos, histológicos, imunohistoquímicos dos pacientes com câncer de mama exigirá a análise de um grande volume de dados, demandando investimentos em infraestrutura computacional. A coleta padronizada, a estruturação e o armazenamento dos dados em formato acessível são desafios igualmente importantes a serem vencidos no processo. Sua integração oferece uma oportunidade única para um melhor entendimento do câncer de mama, podendo ainda gerar informações relevantes para a tomada de decisão clínica.

8. Objetivo do Projeto

O objetivo da pesquisa será:

- a) Analisar as alterações moleculares do câncer de mama através de sequenciamento do exoma completo;
- b) Correlacionar os achados moleculares com os dados clínicos, epidemiológicos, características histológicas e imunohistoquímicas;
- c) Estudar e selecionar potenciais marcadores moleculares com relevância na tumorigênese
- d) Estabelecer a padronização de metodologia (pouco invasiva) no plasma (VEs e ctDNA);
- e) Desenvolver um sistema informatizado que integre os diferentes bancos de dados dos pacientes com câncer de mama (molecular, clínico, anatomopatológico e de imagem) para análises integradas.

Específico:

Os objetivos específicos são:

- 1) Coleta, congelamento e armazenamento de amostras de tumor de pacientes com alta probabilidade de ter câncer de mama (biópsia) no Instituto de Radiologia-Hospital das Clínicas (InRad-HCFUMSP) ou Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) ou de tumores já diagnosticados (ressecção do tumor primário) no ICESP obedecendo aos **critérios de inclusão (mulheres jovens <40 anos, sem tratamento prévio, em qualquer estadió ou paciente em investigação no HC, ou já admitida no ICESP, com cirurgia para ressecção primária do tumor programada)**
- 2) Coleta, processamento e armazenamento de amostras de sangue no InRad-HCFUMSP e no ICESP no início do estudo e após o tratamento para posterior análise de plasma
- 3) Após o **resultado positivo para câncer de mama triplo negativo**:
 - a) Análise de qualidade tecido coletado (percentagem do tumor, necrose, tecido normal) e uma vez aprovado a qualidade, serão extraídas DNA de tecido;
 - b) Separação de *Buffy coat* e armazenamento para posterior Extração de DNA de sangue
 - c) Processamento de plasma
- 4) Sequenciamento do exoma de DNA (tumor/sangue)
- 5) Análise dos resultados do sequenciamento (Bioinformática) e se necessário, validação
- 6) Padronização do método de análise do plasma (microvesículas e extração de ctDNA) para utilização em futuros projetos de pesquisa translacional
- 7) Armazenamento dos dados moleculares gerados na base de dados do Biobanco
- 8) Integração de dados moleculares, patológicos, imagem e clínicos, viabilizando as futuras análises
- 9) Correlação dos achados moleculares com dados clínicos das pacientes.

9. Procedimentos Metodológicos

Desenho do Estudo: Estudo translacional, observacional, analítico e prospectivo. As pacientes serão submetidas a tratamento padrão da instituição ou conforme protocolos dos estudos clínicos nas quais eventualmente forem incluídas.

Participantes de pesquisa e tamanho amostral:

Meta de inclusão:

- 50 pacientes triplo negativos ao longo dos 3 anos.
- Pacientes com câncer de mama positivo, mas que não são triplo negativo terão seu material armazenado no biobanco.

Critérios de Inclusão:

- Pacientes do sexo feminino com câncer de mama sem tratamento prévio, em qualquer estágio;
- Mulheres jovens com <40 anos
- Paciente em investigação no Hospital das Clínicas ou já admitida no ICESP;
- Paciente com cirurgia para ressecção primária do tumor programada ou possibilidade de biópsia dentro das condições do Projeto;
- Pacientes acima de 18 anos;

Critérios de Exclusão:

- Tecido sem confirmação de câncer de mama
- Qualidade do tecido coletado ruim (pouca representatividade tumoral)
- HIV, hepatite

Aproximadamente 1.300 novas pacientes com câncer de mama são atendidas no ICESP, com mais de 180 casos com resultado positivo de câncer de mama em biópsias de mama sendo realizadas aproximadamente 600 cirurgias (ressecção cirúrgica) com pré e pós-tratamento (quimioterapia/radioterapia) por ano.

Descrição do local do estudo:

- 1) Exames de imagem - Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.
- 2) Coleta de Biópsia do tumor primário e de sangue – Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (Mastologia).
- 3) Coleta de Ressecção de tumor primário em Centro Cirúrgico - Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (Mastologia).
- 4) Avaliação Anatomopatológica:
Diagnóstico histológico e imunoistoquímico do material;

Registro de tipo histológico, receptores hormonais (Estrógeno, Progesterona), Ki67, HER2 e outros;
Teste de FISH – Patologia (ICESP).

5) Análise da qualidade do material coletado – Patologia (ICESP) e Biobanco / Processamentos – Centro de Investigação Translacional em Oncologia – ICESSP.

6) Coleta de sangue – ICESSP.

7) Processamento e armazenamento de amostras coletadas – Biobanco / Centro de Investigação Translacional em Oncologia – ICESSP.

8) Pesquisa – Centro de Investigação Translacional em Oncologia – ICESSP e utilização de Rede Premium (Sequenciamento de larga escala – CTO-ICESP ou Laboratório SELA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) ou outras Instituições/empresas.

Planejamento do estudo:

I. Sequência do Estudo

1) Recrutamento e seleção de pacientes.

2) Exames de imagem complementares aos pacientes

3) Coleta, congelamento e armazenamento de amostras de tumor de pacientes com alta probabilidade de ter câncer de mama (biópsia) com os critérios de inclusão mencionados no Instituto de Radiologia-Hospital das Clínicas (InRad-HCFUMSP) ou ICESSP ou de tumores já diagnosticados (resseção do tumor primário ou nova biópsia) no ICESSP.

4) Coleta, processamento e armazenamento de amostras de sangue no InRad-HCFUMSP e/ou no ICESSP no início do estudo e ao longo do tratamento para posterior análise de plasma.

5) Após o resultado positivo para câncer de mama triplo negativo serão realizadas:

a) análise de qualidade tecido coletado (percentagem do tumor, necrose, tecido normal) e uma vez aprovado a qualidade, serão extraídas DNA de tecido tumoral;

b) Separação e armazenamento de *Buffy coat* para posterior Extração de DNA de sangue;

c) Processamento de plasma de cada coleta.

6) Sequenciamento do exoma de DNA

7) Estudar os resultados do sequenciamento (Bioinformática) e se necessário, fazer a validação

8) Padronização do método de análise do plasma (microvesículas e de ctDNA).

9) Construção de um sistema para integração os bancos de dados moleculares, patológicos, clínicos e de imagem.

10) Armazenamento dos dados moleculares gerados no Biobanco do Centro de Investigação Translacional em Oncologia- CTO – ICESSP.

11) Análise dos bancos de dados integrados, buscando estabelecer correlações entre os achados moleculares e as demais informações das pacientes.

II. Casuística e Métodos

1) Casuística

Serão selecionados 50 pacientes com diagnóstico confirmado de câncer de mama triplo negativo, durante 3 anos. Serão coletados, congelados em N₂ líquido e armazenados amostras de tumor de pacientes com alta probabilidade de ter câncer de mama (biópsia), tendo como critérios de inclusão: estarem sem tratamento prévio, em qualquer estadiu ou em investigação no Hospital das Clínicas (HC), ou já admitida no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), com cirurgia para ressecção primária do tumor programada ou possibilidade de biópsia dentro das condições do projeto no Instituto de Radiologia-Hospital das Clínicas (InRad-HCFUMSP) ou no ICESSP. Serão coletados também tumores já diagnosticados (ressecção do tumor primário) no ICESSP. Após assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) do Biobanco e terem respondido o Questionário Epidemiológico do Biobanco, serão coletadas amostras de Tumor primário fresco através de biópsia ou de ressecção cirúrgica, e sangue. As amostras tumorais e de sangue de pacientes que confirmarem o diagnóstico de câncer de mama serão incluídas no estudo. Para manter o anonimato das pacientes, as amostras serão identificadas por números arábicos. No entanto, não haverá dissociação irreversível dos dados. Será cadastrado no Módulo Tasy chamado Biobanco, que tem como objetivo o cadastro e controle de material biológico humano dos participantes do Biobanco integrando com os dados clínicos para os Projetos de pesquisa com acesso restrito. O sistema permitirá o cadastro de participantes do Biobanco que terão suas amostras coletadas para estudos e cada participante terá um código identificador único no sistema. Além disso, o material que sobrar será armazenado por tempo indeterminado no Biobanco da Rede Acadêmica de Pesquisa do Câncer da Universidade de São Paulo localizado no CTO-ICESP.

2) Coleta

a) Sangue Periférico

O participante é convidado a fazer parte do projeto através da obtenção de TCLE e um Questionário Epidemiológico do Biobanco. Após obtenção do TCLE, a amostra de sangue (15mL) é coletada por meio de punção de veia periférica e processada (plasma) podendo ter coletas e processamento de plasma ao longo do tratamento .

b) Tumor Primário

Serão coletadas fragmentos de tumor provenientes do procedimento de biópsia ou de ressecção cirúrgica que serão congeladas imediatamente no N₂ líquido. Os setores do InRad -HC-FMUSP, Centro Cirúrgico e Patologia do ICESSP serão comunicados e orientados quanto à coleta do Biobanco e o Formulário correspondente será entregue para preenchimento do controle dos tempos (primeira e última ligação, congelamento e chegada na Patologia). Os fragmentos de tecidos congelados em N₂ líquido de tecido tumoral são armazenados em freezer a -80°C.

Todo o tecido coletado passará por análise de qualidade de tecido tumoral coletado de acordo

Procedimento Operacional Padrão (POP) de Análise de qualidade de material coletado do Biobanco da Rede Acadêmica de Pesquisa do Câncer da Universidade de São Paulo localizado no CTO-ICESP. Resumidamente, a qualidade de amostras de tecidos coletados será analisada através de confecção de lâminas Hematoxilina-Eosina (HE) de tecido congelado seguindo os critérios de qualidade estabelecidos pelo Patologista e pesquisadores responsáveis. O armazenamento só será realizado se as amostras preencherem os critérios de qualidade estabelecidos. Todos os detalhes de coleta, armazenamento e qualidade serão registrados no Módulo Tasy Biobanco Processamentos. Todas as coletas e processamentos serão realizados seguindo a padronização de materiais plásticos e POPs e adotado identificação numérica ou alfanumérica para manter o sigilo e confidencialidade do participante do estudo. O processamento de amostras é realizado de acordo com os POPs do Biobanco.

3) Extração de DNA

a) Sangue Periférico

O DNA de leucócitos periféricos será extraído pelo método de *Salting Out Procedure* (Miller et al, 1988). Serão extraídos DNA somente de casos que necessitem de confirmação se a mutação é germinativa ou somática.

Para a eluição do DNA, serão utilizadas o tampão Tris-EDTA (TE-4). Uma alíquota de cada amostra será avaliada qualitativamente pelo Equipamento 2200 *TapeStation* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA EUA) e quantitativamente utilizando *NanoPhotometer® P-Class* (Implen, Alemanha) e as amostras serão armazenadas a -20°C.

b) Tecido tumoral

Para a extração do DNA de tecido tumoral de biópsias, será utilizado o All Prep DNA/RNA *Mini Kit* (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Uma alíquota de cada amostra será avaliada qualitativamente pelo Equipamento 2200 *TapeStation* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA EUA) e quantitativamente utilizando *NanoPhotometer® P-Class* (Implen, Alemanha), também utilizado para avaliar a pureza da amostra em relação às proteínas (a relação 260/280 nm deve estar em torno de 1,8). Este mesmo controle será utilizado nas amostras de DNA de sangue destas pacientes. As amostras de DNA serão armazenadas no freezer -20°C até o sequenciamento.

4) Sequenciamento do Exoma

Será realizado sequenciamento do exoma do DNA de tecidos tumorais de Biópsias coletadas e de sangue periférico dos pacientes confirmados com câncer de mama de acordo com os subtipos escolhidos.

Para o sequenciamento completo do exoma de DNA de tecidos tumorais de Biópsias e de leucócitos periféricos, utilizaremos o *Nextera Rapid Capture Expanded Exome* (Illumina). Este kit nos permite sequenciar todos os exons, regiões 5' e 3' UTR e mRNAs. Este Kit consiste nas seguintes etapas:

a) Fragmentação do gDNA

A primeira etapa desta reação consiste na fragmentação do DNA e a ligação de adaptadores nas extremidades. Para isso, serão utilizados 10 µl de gDNA a 5 ng/µl de cada amostra em uma placa de 96

poços. Serão adicionados 25 μ l de *Tagment DNA Buffer* e 15 μ l *Tagment DNA Enxime 1* em cada amostra. A placa será colocada no shaker a 1800 rpm por um minuto, centrifugada a 280 g por um minuto e incubada a 58°C por 10 minutos. Em seguida, serão adicionados 15 μ l de *Stop Targment Buffer*. A placa será colocada no shaker a 1800 rpm por um minuto, centrifugada a 280 g por um minuto e incubada a temperatura ambiente por 4 minutos.

b) Purificação da fragmentação do gDNA

Serão adicionados 65 μ l de *Sample Purification Beads*, a placa será colocada no shaker a 1800 rpm por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 8 minutos, centrifugada a 280 g por um minuto e colocada na estante magnética por 2 minutos. Cuidadosamente 130 μ l do sobrenadante serão descartados e em seguida serão adicionados 200 μ l de etanol 80%, no qual será removido após 2 minutos. Novamente serão adicionados 200 μ l de etanol 80% e removido após 2 minutos. A placa será incubada a temperatura ambiente por 10 minutos e, em seguida, retirada da estante magnética. Serão adicionados 22.5 μ l de *Ressuspension Buffer*, a placa será colocada no shaker a 1800 rpm por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugada a 280 g por um minuto. A placa será colocada novamente na estante magnética e serão transferidos 20 μ l do sobrenadante para outra placa.

c) Primeira amplificação

Esta etapa consiste na amplificação dos fragmentos de DNA purificados. Antes disso, são utilizados index 1 (i7) e index 2 (i5), para possibilitar a formação de pools, e adaptadores (P5 e P7) necessários para a geração de clusters e sequenciamento. Inicialmente serão adicionados 5 μ l de *Index primer 1* (A) e 5 μ l de *Index primer 2* (B) em cada amostra (Figura 1). Serão adicionados 20 μ l de *Nextera Library Amplification Mix*, a placa será colocada no shaker a 1200 rpm por um minuto, centrifugada a 280 g por um minuto e levada ao termociclador e submetida a 72°C por 3 minutos; 98°C por 30 segundos, 10 ciclos com variação de temperatura: 98°C por 10 segundos; 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando em 72°C por 5 minutos e a 10°C por tempo indeterminado.

d) Purificação da primeira PCR

A placa será centrifugada a 280g por um minuto e, em seguida, 50 μ l do sobrenadante serão transferidos para outra placa. Serão adicionados 90 μ l de *Sample Purification Beads*, a placa será colocada no shaker a 1800 rpm por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugada a 280 g por um minuto e colocada na estante magnética por 2 minutos. O sobrenadante será descartado cuidadosamente e em seguida serão adicionados 200 μ l de etanol 80%, no qual será removido após 30 segundos. Novamente serão adicionados 200 μ l de etanol 80% e removido após 30 segundos. A placa será incubada a temperatura ambiente por 10 e, em seguida, retirada da estante magnética. Serão adicionados 27 μ l de *Ressuspension Buffer*, a placa será colocada no shaker a 1800 rpm por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugada a 280 g por um minuto. A placa será colocada novamente na estante magnética e serão transferidos 25 μ l do sobrenadante para outra placa. Após esta etapa, todas as amostras serão quantificadas no *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Invitrogen).

e) Primeira Hibridização

Nesta etapa ocorre à formação do pool de amostras e a utilização de sondas, desenhadas nas regiões de interesse. Serão formados dois pools com oito amostras cada. Inicialmente todas as amostras serão diluídas para 500 ng, dos quais 5ul de cada amostra serão utilizadas. Serão adicionados em cada pool 40 µl de *DNA library sample or library pool from NLS plate*, 50 µl de *Enrichment Hybridization Buffer* e 10 µl de *Expanded Exome Oligos*. A placa será colocada no shaker a 1200 rpm por um minuto, centrifugada a 280 g por um minuto e levada ao termociclador e submetida a 95°C por 10 minutos; 18 ciclos de 1 minuto, começando a 94°C e diminuindo 2°C por ciclo; 58°C de 90 minutos a 24 horas.

f) Primeira Captura

Este processo utiliza estreptavidina para capturar as sondas hibridizadas com as regiões de interesse. Esta etapa consiste em períodos de ligação, lavagem e eluição.

Na primeira ligação a placa será centrifugada a 280 g por um minuto e, em seguida, 100 µl do sobrenadante serão transferidos para outra placa. Serão adicionados 250 µl de *Streptavidin Magnetic Beads*, a placa será colocada no shaker a 1200 rpm por 5 minutos, incubada a temperatura ambiente por 25 minutos, centrifugada a 280 g por um minuto, colocada na estante magnética por 2 minutos, cuidadosamente será descartado o sobrenadante e em seguida a placa será retirada da estante magnética.

Na primeira lavagem serão adicionados 200 µl de *Enrichment Wash Buffer*, a placa será colocada no shaker a 1800 rpm por 4 minutos e os "pools" serão ressuspensos com o auxílio da pipeta. Em seguida serão incubados a 50°C por 30 minutos, e imediatamente colocados na estante magnética por 2 minutos, cuidadosamente todo o sobrenadante será descartado. A placa será removida da estante magnética e todo este processo será repetido.

Na primeira eluição serão adicionados em tubos de 1,7 ml 28.5 µl de *Enrichment Elution Buffer 1* e 1,5 µl de 2N NaOH, no qual serão vortexados e utilizados 23 µl para ser adicionado em cada pool. A placa será colocada no shaker a 1800 rpm por 2 minutos, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugada a 280 g por um minuto, colocada na estante magnética por 2 minutos e serão transferidos 21 µl do sobrenadante para outra placa. Serão adicionados 4 µl de *Elute Targuet Buffer*, a placa será colocada no shaker a 1200 rpm por um minuto e centrifugada a 280 g por um minuto.

g) Segunda Hibridização

Esta etapa é necessária para assegurar elevada especificidade das regiões capturadas. Para isso, serão adicionados 15 µl de *Resuspension Buffer*, 50 µl de *Enrichment Hybridization Buffer* e 10 µl de *Expanded Exome Oligos*. A placa será colocada no shaker a 1200 rpm por um minuto, centrifugada a 280 g por um minuto e incubada a 58°C de 14,5 a 24 horas.

h) Segunda Captura

Conforme a primeira captura, este processo também utiliza estreptavidina e consiste em etapas de ligação, lavagem e eluição.

Na segunda ligação a placa será centrifugada a 280 g por um minuto e, em seguida, 100 µl do

sobrenadante serão transferidos para outra placa. Serão adicionados 250 μ l de *Streptavidin Magnetic Beads*, a placa será colocada no shaker a 1200 rpm por 5 minutos, incubada a temperatura ambiente por 25 minutos, centrifugada a 280 g por um minuto, colocada na estante magnética por 2 minutos, cuidadosamente será descartado o sobrenadante e em seguida a placa será retirada da estante magnética.

Na segunda lavagem serão adicionados 200 μ l de *Enrichment Wash Buffer*, a placa será colocada no shaker a 1800 rpm por 4 minutos e os pools serão ressuspensos utilizando a pipeta. Em seguida serão incubados a 50°C por 30 minutos, imediatamente colocados na estante magnética por 2 minutos e cuidadosamente será descartado todo sobrenadante. A placa será removida da estante magnética e todo este processo será repetido novamente.

Na segunda eluição serão adicionados em tubos de 1,7 ml 28,5 μ l de *Enrichment Elution Buffer 1* e 1,5 μ l de 2N NaOH, no qual serão vortexados e utilizados 23 μ l para ser adicionado em cada pool. A placa será colocada no shaker a 1800 rpm por 2 minutos, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugada a 280 g por um minuto, colocada na estante magnética por 2 minutos e serão transferidos 21 μ l do sobrenadante para outra placa. Serão adicionados 4 μ l de *Elute Target Buffer*, a placa será colocada no shaker a 1200 rpm por um minuto e centrifugada a 280 g por um minuto.

i) Purificação captura

Esta etapa envolve a purificação das etapas de capturas. Serão adicionados 45 μ l *Purification Beads* em cada pool, a placa será colocada no shaker a 1800 rpm por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugada a 280 g por um minuto e colocada na estante magnética por 2 minutos, cuidadosamente será descartado o sobrenadante e em seguida serão adicionados 200 μ l de etanol 80%, no qual será removido após 30 segundos. Novamente serão adicionados 200 μ l de etanol 80% e removido após 30 segundos. A placa será incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida, retirada da estante magnética. Serão adicionados 27,5 μ l de *Ressuspension Buffer*, a placa será colocada no shaker a 1800 rpm por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugada a 280 g por um minuto. A placa será colocada novamente na estante magnética e serão transferidos 25 μ l do sobrenadante para outra placa.

j) Segunda amplificação PCR

Esta etapa amplifica toda etapa anterior. Serão adicionados 5 μ l de *PCR Primer Cocktail* e 20 μ l de *Nextera Enrichment Amplification Mix* em cada pool, a placa será colocada no shaker a 1200 rpm por um minuto, centrifugada a 280 g por um minuto e levada ao termociclador e submetida a 98°C por 30 segundos; 10 ciclos com variação de temperatura: 98°C por 10 segundos; 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, finalizando em 72°C por 5 minutos e a 10°C por tempo indeterminado.

k) Purificação da Segunda PCR

Este processo utiliza beads para purificar a biblioteca removendo produtos não utilizados. A placa será centrifugada a 280 g por um minuto e, em seguida, 50 μ l do sobrenadante serão transferidos para outra placa. Serão adicionados 90 μ l de *Sample Purification Beads*, a placa será colocada no shaker a 1800 rpm

por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 10 minutos, centrifugada a 280 g por um minuto e colocada na estante magnética por 2 minutos. Cuidadosamente será descartado o sobrenadante e em seguida serão adicionados 200 µl de etanol 80%, no qual será removido após 30 segundos. Novamente serão adicionados 200 µl de etanol 80% e removido após 30 segundos. A placa será incubada a temperatura ambiente por 10 min, em seguida, retirada da estante magnética. Serão adicionados 32 µl de *Ressuspension Buffer*, a placa será colocada no shaker a 1800 rpm por um minuto, incubada a temperatura ambiente por 2 minutos e centrifugada a 280 g por um minuto. A placa será colocada novamente na estante magnética e serão transferidos 30 µl do sobrenadante para outra placa. As amostras serão armazenadas em tubos de 0,2 µl, identificadas e armazenadas a -20°C.

Os produtos dessa reação será analisado no aparelho de sequenciamento *HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, CA, EUA)* do Laboratório de Sequenciamento SELA, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ou em outras Instituições e/ou empresas que fazem o serviço de sequenciamento.

Para a validação das principais mutações encontradas no sequenciamento do exoma utilizaremos o sequenciamento de *Sanger* ou *AmpliconSeq* na plataforma *MiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA)* do Laboratório de Sequenciamento do Centro de Investigação Translacional em Oncologia – ICESP ou em outras Instituições e/ou empresas que fazem o serviço de sequenciamento .

l) Quantificação das bibliotecas de DNA

A quantificação das bibliotecas de DNA será realizada por qRT-PCR e o controle de qualidade e determinação do tamanho médio pelo equipamento 2200 TapeStation (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA*) utilizando o Kit *High Sensitivity* diluindo a Biblioteca 1/10, a fim alcançar a mais alta qualidade de dados na plataforma de sequenciamento *Illumina*, criando densidades de *cluster* ideais através de cada *lane* de cada *flow cell*. A qRT-PCR será realizado utilizando o equipamento *StepOne Plus (Applied Biosystems, Foster City, EUA)*, seguindo as instruções do Kit de Quantificação de Bibliotecas (*Kapa Library Quantification Kit - Illumina, KAPA Biosystems, Woburn, EUA*). Resumidamente, triplicatas de diluições de 1/16:000, 1/ 32:000, 1/ 64:000 com TrisHCl 10mM 0,05% Tween20 de cada biblioteca serão aplicadas na placa de 96 poços em paralelo com os seis padrões de concentração do Kit (20pM; 2pM; 0,2pM; 0,02pM; 0,002pM; 0,0002pM). A reação será desnaturado a 95°C durante 5 min seguido por condições de amplificação durante 35 ciclos a 95°C para 30s e 45s para 60°C. A concentração do DNA ligado adaptador foi calculada utilizando a seguinte fórmula: [quantidade em pM obtida pela curva padrão] × [tamanho padrão DNA 452bp] × [fator de diluição] / tamanho de fragmento amplificado verificado obtido a partir de eletroforese em gel de agarose a 2%. Os valores de concentração obtidos a partir de qRT-PCR serão selecionados para determinar o volume de cada amostra para a misturas ou *pool* de bibliotecas para obter 2nM a 4 nM equimolar de concentração. Em seguida será adicionado 0,1N NaOH fresco em volumes iguais das bibliotecas de DNA para a denaturação do DNA, seguido de diluição com tampão de hibridização pré-HT1 gelada para se obter bibliotecas de DNA na concentração de 20pM. Depois foram ainda diluídos para a concentração ótima através do tampão pré-HT1 refrigeradas de acordo com a padronização (para MiSeq 13pM e HiSeq 16pM). Será adicionado um por cento *Phix Control v3*, que é uma biblioteca ligado ao

adaptador que é utilizado como um controle de corridas de sequenciamento. Esta biblioteca *Phix Control v3* é derivado da pequeno genoma *Phix* bem caracterizado, que oferece vários benefícios para sequenciamento e alinhamento. *Phix* desnaturado foi utilizado como controle interno, adicionada na solução de biblioteca de DNA denaturado para observar a eficácia de incorporação do DNA durante o sequenciamento de DNA. As bibliotecas serão colocados dentro do cartucho adequado, e sequenciados como multiplex com ciclos de acordo com o protocolo do fabricante e carregado em Sequenciador *HiSeq* (*Illumina, San Diego, CA, EUA*).

m) Validação

Será realizada análise do exoma, e as alterações genéticas encontradas poderão ser validadas pelo sequenciamento de *Sanger* ou pelo sequenciamento de larga escala no equipamento *MiSeq* (*Illumina, San Diego, CA, EUA*).

n) Acompanhamento das alterações genéticas

As alterações genéticas identificadas no exoma mais relevantes poderão ser utilizadas quanto a presença no conteúdo do plasma uma vez padronizado a metodologia, contribuindo para as pesquisas posteriores futuras

o) Correlação

As principais alterações genéticas identificadas que possam estar relacionadas a tumorigênese de câncer de mama serão correlacionadas com os dados de imagem, clínicos, histológicos, imunohistoquímicos, idade ao diagnóstico, sobrevida livre de doença, sobrevida global, estadiamento inicial e resposta a quimioterapia neoadjuvante e outros.

5) Padronização de método para análise genômica em cultura de células

Cultura de linhagens estabelecidas de tumores serão utilizadas para padronização dos métodos (será escolhido uma linhagem estabelecida de tumor) e cultivadas de acordo com os protocolos estabelecidos na literatura.

a) Isolamento de microvesículas de cultura

Após o procedimento de cultura de células, é retirado o sobrenadante da cultura de células e transferido para o tubo de centrífuga, depois é centrifugado a 300 g por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, retirar o sobrenadante, transferi-lo para um novo tubo de centrífuga e descartar o pellet, centrifugar a 2000 g por 10 minutos a temperatura ambiente.

Retirar o sobrenadante, transferi-lo em novo tubo de centrífuga e centrifugar a 10.000 g por 30 minutos a 4°C. Retirar o sobrenadante, transferir para o tubo de ultracentrífuga e descartar o pellet.

Ultracentrifugar a 100.000 g por 2 horas a 4°C, descartar o sobrenadante, ressuspender o *pellet* em PBS filtrado e ultracentrifugar a 100.000 g por 2 horas a 4°C. Descartar o sobrenadante e armazenar o pellet em PBS ou em meio de cultura a -70°C até o momento do uso.

b) Caracterização do tamanho e quantidade de vesículas extracelulares utilizando *Nanoparticle Tracking*

Analysis (NTA).

A técnica de rastreamento de nanopartículas observa diretamente o ponto de luz, que é a sua nanoestrutura "aumentada" pela iluminação, e acompanha o movimento browniano destas partículas. O cálculo do tamanho é feito pela equação de Stokes-Einstein, na qual o diâmetro hidrodinâmico é calculado, uma vez que se obtenha a informação do Coeficiente de Difusão por meio do NTA e temperatura e viscosidade (normalmente da água) do meio são parâmetros conhecidos. A concentração e distribuição de tamanho de partículas coletadas em frações serão medidas com NTA, equipado com câmara EMCCD e um laser 488 nm. *Silica beads* (100 nm diâmetro; Microspheres-Nanospheres, Cold Spring, NY) serão utilizadas para configurar e calibrar o instrumento.

As alíquotas serão diluídas em PBS para reduzir o número de partículas no campo de visão abaixo de 200 por imagem, e a cada fração, 10 vídeos, cada um com duração de 30 segundos, serão capturados com o obturador da câmera fixada em 33,31 ms e o ganho da câmera fixada em 400. Todas as frações serão analisadas utilizando o mesmo limiar, o qual será calculado pelo software de medida (MATLAB v.7.9.0.529). A análise será realizada pelo software do instrumento (NTA 2.3.0.15).

c) Padronização de método de isolamento de microvesículas sendo que os exossomos tem 40-100nm e microvesículas 50-1000 nm possuem um tamanho menor que uma célula

Após padronização em cultura de célula prosseguiremos com:

6) Padronização do método de análise do conteúdo em plasma (vesículas extracelulares e DNA livre circulante)

a) Caracterização do tamanho e quantidade de vesículas extracelulares utilizando *Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)*.

b) Padronização de método de isolamento de microvesículas para utilização por pesquisadores em projetos de pesquisa translacional futuros

7) Estruturação da informação para integração dos dados moleculares e clínicos

7.1. Dados Clínicos

a) Perfil das pacientes

Idade

Peso

Altura

Naturalidade

Antecedentes reprodutivos

Contraceção

Terapia de reposição hormonal

Quimioprofilaxia

Outros antecedentes pessoais relevantes

Antecedentes familiares de câncer de mama ou ovário

b) Diagnósticos

Data do diagnóstico do câncer de mama

TNM / Estadio

Sítios de metástases

Comorbidades

c) Características da Imagem

Aspecto mamográfico

Apresentação USG

Apresentação RNM

d) Intervenções ou Tratamentos

Cirurgia

Tipo

Data

Quimioterapia

Objetivos: Neoadjuvante / Adjuvante / Paliativo

Protocolos

Linhas de Tratamento

Períodos

Terapia Hormonal

Objetivos: Neoadjuvante / Adjuvante / Paliativo

Medicamento

Período

Radioterapia

Área Irradiada

Período

Tratamento de suporte (paliativo) exclusivo

e) Resultados

Resposta tumoral

Tempo para progressão da doença

Sobrevida

Dor

Performance Status (ECOG / Karnofsky)

Parâmetros laboratoriais

Toxicidades

Complicações

7.2. Características do Tumor (Anatomopatológico)

Tipo histológico

Imunoistoquímica (Receptor de Estrógeno, Receptor de Progesterona, HER2, Ki67 e outros)

FISH

7.3. Achados moleculares

Exoma

8) Análise de dados

Análises exploratórias das bases de dados integradas

Materiais e equipamentos:

Todas as coletas de biópsia/ressecção cirúrgica e sangue serão realizadas no Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina (FMUSP) e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e o processamento das amostras no Biobanco Processamentos do Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO), Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP).

Inaugurado em 2008, o Instituto do Câncer do Estado de São Paulo possui atualmente 414 leitos de internação, 85 de UTIs e 16 salas cirúrgicas. Além disso, conta com 103 consultórios médicos e 107 poltronas para atendimento ambulatorial.

Nesse espaço, médicos de diferentes especialidades clínicas e cirúrgicas trabalham de forma cooperada com equipes multiprofissionais especializadas na atenção oncológica.

O Biobanco de tumores do ICESP está equipado com:

05 Freezers -80C Thermo Scientific Revco Value PLUS

01 QIACube

01 Nanofotômetro P-Class P330 - IMPLN

01 Centrífuga Thermo Scientific - Sorvall 16R1

01 Criostato Hyrax c 25 - Zeiss

01 Centrífuga Fanem 2410

01 Centrífuga 5415R Eppendorf

01 Thermostat Plus 2mL Eppendorf

01 Agitador Vortex Vixar

01 Balança Eletrônica Toledo

01 Centrífuga Mini Spin Prism de centrífuga

01 *StepOne Plus Real Time*

01 2200 TapeStation

A corrida de sequenciamento em larga escala será realizada nos equipamentos *MiSeq* e *HiSeq 2500*, no Serviço de sequenciamento de DNA (CTO-ICESP), Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA) da FMUSP, respectivamente ou em outras Instituições / empresas. As análises do sequenciamento serão realizadas por bioinformatas.

Esse projeto prevê a compra de dois novos equipamentos essenciais para a execução do mesmo:

- Ultracentrífuga
- Sistema de Caracterização de Nanopartículas

A descrição técnica dos equipamentos encontram-se no anexo 2.

Todos os reagentes necessários para coleta e processamento das amostras extração de DNA, Kit para sequenciamento, cartuchos, reagentes para quantificação de Biblioteca, materiais plásticos para ultracentrifugação, materiais plásticos e reagentes para análise de genoma, reagentes para cultura, análise de qualidade de DNA serão adquiridos neste projeto.

Análise dos dados:

- a) Os resultados do sequenciamento do exoma serão analisados pelo **Bioinformata**.
- b) Os dados de PCR em tempo real será analisado pelo próprio programa de análise do equipamento.
- c) Integração de Bancos de Dados:
 - Patologia;
 - Centro de Investigação Translacional em Oncologia;
 - Oncologia Clínica / Mastologia / Radioterapia;
 - HC/MED.
- d) Integração dos bancos de dados moleculares, anatomopatológicos, de imagem e clínicos.

Análises de correlação dos dados moleculares com os dados clínicos, realizadas por um bioinformata/**estatístico**.

10. Resultados esperados

A geração de grandes quantidades de dados possibilitada pelo sequenciamento do exoma completo ajudará no maior entendimento quanto à natureza e formas de apresentação do câncer de mama, bem como sua evolução clínica, de acordo com seu perfil molecular.

O sequenciamento do exoma ajudará a reconhecer diferentes perfis moleculares do câncer de mama, enquanto a análise integrada desses dados com os achados de imagem, padrões histológicos e imunohistoquímicos e dados de evolução clínica poderão contribuir para a identificação de fatores preditivos e/ou prognósticos específicos para os diferentes subtipos de câncer de mama.

Esses novos conhecimentos deverão contribuir no futuro para a construção de novos guias para melhor orientação ao paciente. Além disso, o projeto poderá abrir espaço para pesquisas de susceptibilidade genética para resposta aos tratamentos no futuro.

Em paralelo, a padronização de técnicas de análise do conteúdo no plasma poderá ser utilizado em estudos futuros de biomarcadores circulantes de monitoramento da dinâmica de tumor de mama ou em outros tipos de tumores. Os projetos futuros de identificação de **alvos moleculares** associados ao tumor em plasma poderão contribuir trazendo informações genéticas adicionais quanto ao entendimento da evolução do processo de tumorigênese principalmente da evolução, uma vez que o acesso ao material é facilitado e pode ser extraído em diferentes tempos, promovendo mudanças no cuidado aos pacientes.

Será desenvolvido um sistema para integração e análise dos dados moleculares e clínicos.

11. Aspectos éticos

O Biobanco do Instituto do Câncer do estado de São Paulo possui aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e Comitê nacional em Pesquisa (CONEP) de outubro de 2014 e seguirá a regulamentação para o uso de materiais biológicos humanos para pesquisa, especialmente a Resolução do Conselho Nacional de Saúde no. 441 de 12 de maio de 2011, e a Portaria do Ministério da Saúde no. 2.201 de 14 de setembro de 2011 que estabelecem as Diretrizes Nacionais para Biorrepositório e Biobanco de Material Biológico Humano com Finalidade de Pesquisa. Toda a coleta e Processamento seguirá os Procedimentos Operacionais Padrão do Biobanco. O Projeto passará para aprovação do CEP.

12. Cronograma das atividades

Anexo 1

13. Referências

Abreu E, Koifman S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. *Revista Brasileira de Cancerologia*, inca.gov.br, 2002.

Allred DC, Issues and updates: evaluating estrogen receptor-a, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Modern Pathology*, n. 23, S52–S59, 2010.

Balko JM, Giltane JM, Wang K, *et al.*, Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. *Cancer Discov* n. 4, p.

232–245, 2014.

Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho Y-J, *et al.*, Tumor microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences, *Nature Communications*, 2011.

Banerji S, Cibulskis K, Rangel-Escareno C, *et al.*, Sequence analysis of mutations and translocations across breast cancer subtypes. *Nature*, n. 486, p. 405–409, 2012.

Bauer KR, Brown M, Cress RD, *et al.*, Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* n. 109, p. 1721-8, 2007.

Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, *et al.*, Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*, n. 6, p. 224-24, 2014.

Bidard F-C, Peeters DJ, Fehm T, *et al.*, Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol* n. 15, p. 406–414, 2014.

Borresen AL, Andersen TI, Garber J, Barbier-Piroux N, Thorlacius S, *et al.*, Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients. *Cancer Res.* n. 52, p. 3234–3236, 1992.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, n. 490, p. 61–70, 2012.

Caldas C, Cancer sequencing unravels clonal evolution. *Nat Biotechnol*, n. 30, p. 408–410, 2012.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, *et al.*, Breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study, *JAMA*, v. 295, n. 21, p.2492–2502, 2006.

Carey L, Winer E, Viale G, *et al.*, Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol* n. 7, p. 683-92, 2010.

Corrado C, Raimondo S, Chiesi A, *et al.*, Exosomes as intercellular signaling organelles involved in health and disease: basic science and clinical applications. *Int J Mol Sci*, n. 14, p. 5338–5366, 2013.

Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nat Rev Clin Oncol.* v. 10, n. 8, p. 472-84, 2013.

Curtis C, Shah SP, Chin SF, *et al.*, The genomic and transcriptomic architecture of 2000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*, n. 486, p. 346–352, 2012.

Curtis C. Genomic profiling of breast cancers. *Curr Opin Obstet Gynecol.* v. 27 n. 1 p. 34-9, 2015.

Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, *et al.* Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast

cancer. *N Engl J Med*, n. 368, p. 1199–1209, 2013.

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, *et al.*, Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* n. 13, p. 4429-34, 2007.

De Mattos-Arruda L, Cortes J, Santarpia L, *et al.*, Circulating tumour cells and cell-free DNA as tools for managing breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol* v. 1, n. 10, p. 377–389, 2013.

Elston CW, Ellis IO, Pinder SE Pathological prognostic factors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* n. 31, p. 209–223, 1999.

Ellis MJ, Ding L, Shen D, *et al.*, Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. *Nature*, n. 486, p.353–360, 2012.

Eroles P, Bosch A, Pérez-Fidalgo A and Lluch Ana. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, n. 38: p. 698-707, 2012.

Ferlay J, DM Parkin, E Steliarova-Foucher Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*, n. 46, p. 765–781, 2010.

Gevensleben, H. *et al.*, Non-invasive detection of HER2 amplification with plasma DNA digital PCR. *Clin. Cancer Res.* N. 19, p. 3276–3284, 2013.

Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, *et al.*, Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology* n. 119, p. 1447–1453, 2000.

Goyen M. Radiogenomic imaging-linking diagnostic imaging and molecular diagnostics. *World J Radiol*, n. 6(8): p 519-522, 2014.

Gracia-Aznarez FJ1, Fernandez V, Pita G, Peterlongo P, *et al.*, Whole exome sequencing suggests much of non-BRCA1/BRCA2 familial breast cancer is due to moderate and low penetrance susceptibility alleles. *PLoS One*, v. 8 n. 2 p. 55681, 2013.

Heitz F, Harter P, Lueck HJ, *et al.*: Triple-negative and HER2-overexpressing breast cancers exhibit an elevated risk and an earlier occurrence of cerebral metastases. *Eur J Cancer* n. 45, p. 2792-8, 2009.

INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, 2014.

Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH and van de Vijver MJ (Eds.). WHO Classification of Tumours of the Breast. IARC: Lyon 2012.

Lynch ED, Ostermeyer EA, Lee MK, Arena JF, Ji H, *et al.*, Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, cowden disease, and juvenile polyposis. *Am J Hum Genet* n. 61, p. 1254–1260, 1997.

McDonald CJ, Tang PC and Hripcsak G. Electronic Health Record Systems – Chapter 12 in *Biomedical Informatics*. Shortliffe EH and Cimino JJ, Ed. 4th Ed., Springer 2014.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, *et al.*, A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, n. 266, p. 66–71, 1994.

Murtaza M, Dawson S-J, Tsui DWY, *et al.*, Noninvasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. *Nature*, n. 497, p. 108–112, 2013.

Munirah MA1, Siti-Aishah MA, Reena MZ, Sharifah NA, Rohaizak M, *et al.*, Das S. Identification of different subtypes of breast cancer using tissue microarray. *Rom J Morphol Embryol.*; v. 52 n.2, p. 669-77, 2011.

Newman AM, Bratman SV, To J, *et al.*, An ultrasensitive method for quantitating circulating tumor DNA with broad patient coverage. *Nat Med*. n. 20, p. 548–554, 2014.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, *et al.*, Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma, *Clin Cancer Res*, v. 10 n. 16, p. 5367–5374, 2004.

Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, *et al.*, Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell*, n. 149: p. 979–993, 2012a.

Nik-Zainal S, Van Loo P, Wedge DC, *et al.*, The life history of 21 breast cancers. *Cell*; n. 149: p. 994–1007, 2012b.

O'Driscoll A, Daugelaite J and Sleator RD, 'Big Data', Hadoop and cloud computing in genomics. *Journal of Biomedical Informatics*, n. 46: p. 774-781, 2013.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, *et al.*, Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, n. 406: p. 747-52, 2000.

Paik S, Shak S, Tang G, *et al.*, A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. n. 351: p. 2817-26, 2004.

Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, *et al.* Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. n. 27, p. 1160–1167, 2009.

Prat A and Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular Oncology*, n. 5(1): p 5-23, 2011.

Rutman AM and Kuo MD. Radiogenomics: Creating a link between molecular diagnostics and diagnostic imaging. *European Journal of Radiology*, n. 70: p. 232-241, 2009.

Shah SP, Roth A, Goya R, *et al.*, The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative

breast cancers. *Nature*, n. 486: p. 395–399, 2012.

Shah, S. S. *et al.*. Impact of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations on HER2 interpretation in breast cancer. *Hum. Pathol.* n. 41, p. 103–106, 2010.

Silwal-Pandit L, Vollan HKM, Chin S-F, *et al.* TP53 mutation spectrum in breast cancer is subtype specific and has distinct prognostic relevance. *Clin Cancer Res*, n. 20: p. 3569–3580, 2014.

Stephens PJ, Tarpey PS, Davies H, *et al.* The landscape of cancer genes and mutational processes in breast cancer. *Nature*, n. 486: p. 400–404, 2012.

Sun Y1, Liu J2. Potential of cancer cell-derived exosomes in clinical application: a review of recent research advances. *Clin Ther.* n. 36 v. 6, p. 863-72, 2014.

Tenenbaum JD, Shah NH and Altman RB. Translational Bioinformatics – Chapter 25 in *Biomedical Informatics*. Shortliffe EH and Cimino JJ, Ed. 4th Ed., Springer 2014.

TIC Saúde 2013: pesquisa sobre o uso das tecnologias de informação e comunicação nos estabelecimentos de saúde brasileiros = ICT in Healthcare 2013: survey on the use of information and communication technologies in Brazilian health care facilities / coordenador/coordinator Alexandre F Barbosa – Comitê Gestor da Internet no Brasil, 2014. ISBN 978-85-60062-72-0.

van der Vos K E, Balaj L, Skog J and Breakefield X O. Brain Tumor Microvesicles: Insights into Intercellular Communication in the Nervous System. *Cell Molecular Neurobiology*, v. 31 n. 6 p. 949-59, 2011.

van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, *et al.*, A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med.* n. 347, p. 1999-2009, 2002.

Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, *et al.*, Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, n. 378, p. 789–792, 1995.

Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, *et al.*: Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet*, n. 365, p. 671-9, 2005.

Wallwiener M, Hartkopf AD, Baccelli I, *et al.* The prognostic impact of circulating tumor cells in subtypes of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, n. 137, p. 503–510, 2013.

Yamamoto S, Maki DD, Korn RL and Kuo MD. Radiogenomic Analysis of Breast Cancer Using MRI: A Preliminary Study to Define the Landscape. *AJR*, n. 199: p. 654 – 663, 2012.

Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, Ohta H, *et al.*, Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat Commun.* n. 7, p. 5:3591, 2014.

14. Resultados anuais esperados

1º ano:

Aquisição dos equipamentos;

Contratação da enfermeira de pesquisa;

Inclusão de ao menos 20 casos no estudo;

Processamento de ao menos 40 amostras incluídas no estudo.

2º ano:

Inclusão de ao menos 20 casos no estudo;

Processamento de ao menos 40 amostras incluídas no estudo;

Ao menos 20 casos serão sequenciados;

Início do desenvolvimento de integração dos dados clínicos e moleculares.

3º ano

Se necessário inclusão de amostras para completar o N amostral;

Processamento de ao menos 20 amostras incluídas no estudo;

Ao menos 20 casos serão sequenciados e analisados;

Sistema integrado dos dados clínicos com os dados moleculares;

15. Produtos

Mapa de correlações genéticas vs. fenotípicas vs. clínicas.

Biomarcadores moleculares

Padronização do método de análise do conteúdo em plasma em pacientes oncológicos para os pesquisadores

Indicadores:

Número de pacientes incluídas no estudo.

Número de alterações genéticas encontradas de relevância para a tumorigênese por paciente.

Número de correlações genéticas vs. fenotípicas vs. clínicas geradas.

Metas:

Ao menos 50 casos incluídos no estudo.

Padronização da técnica de análise do conteúdo em plasma

Gerar uma metodologia para integrar os diferentes bancos de dados clínicos, histológicos, imunohistoquímicos, de imagem e moleculares.

Fornecer subsídios (amostras e dados) para futuras pesquisas submetidas ao biobanco.

16. Monitoramento e Avaliação

Monitoramento

- Equipamento e insumos
 - Solicitação mensal do status da compra para o setor de compras e importação
 - Solicitação quinzenal do status do recebimento
 - Solicitação semanal do status de instalação do equipamento
- Coletas
 - Numero de casos coletados no ano
 - Numero de casos incluídos no estudo no ano
- Processamento
 - Numero de seqüenciamentos realizados
 - Numero de seqüenciamentos analisados
- Integração do banco de dados
 - Reuniões trimestrais para acompanhamento do desenvolvimento do sistema integrado

Obs: As atividades referentes ao monitoramento e avaliação do projeto são ações internas, as quais não irão gerar custos ao Projeto.

17. Indicadores

Número de pacientes incluídas no estudo.

Número de alterações genéticas encontradas de relevância para o tumor

Número de correlações genéticas vs. fenotípicas vs. clínicas geradas.

18. Avaliação dos Resultados

Para avaliar os resultados do projeto devemos analisar o numero de pacientes que foi possível associarem um perfil molecular definido a um perfil de progressão tumoral no câncer de mama.

19. Abrangência do projeto

População e/ou Instituição beneficiada:

No curto prazo os pesquisadores que utilizarem o Biobanco-USP terão um material biológico humano de alta qualidade para desenvolvimento de novos projetos, além de já terem dados moleculares disponíveis para trabalho.

Padronização da técnica de análise de conteúdo no plasma, que poderá ser utilizado por qualquer pesquisador que utilizar o Biobanco-USP

O sucesso desse projeto pode servir de base para análises similares em outros tipos de câncer.

No longo prazo os dados gerados poderão ser utilizados para planejamento do tratamento de pacientes portadores de câncer de mama.

Dimensão geográfica: São Paulo / SP

Vagas ofertadas: não se aplica

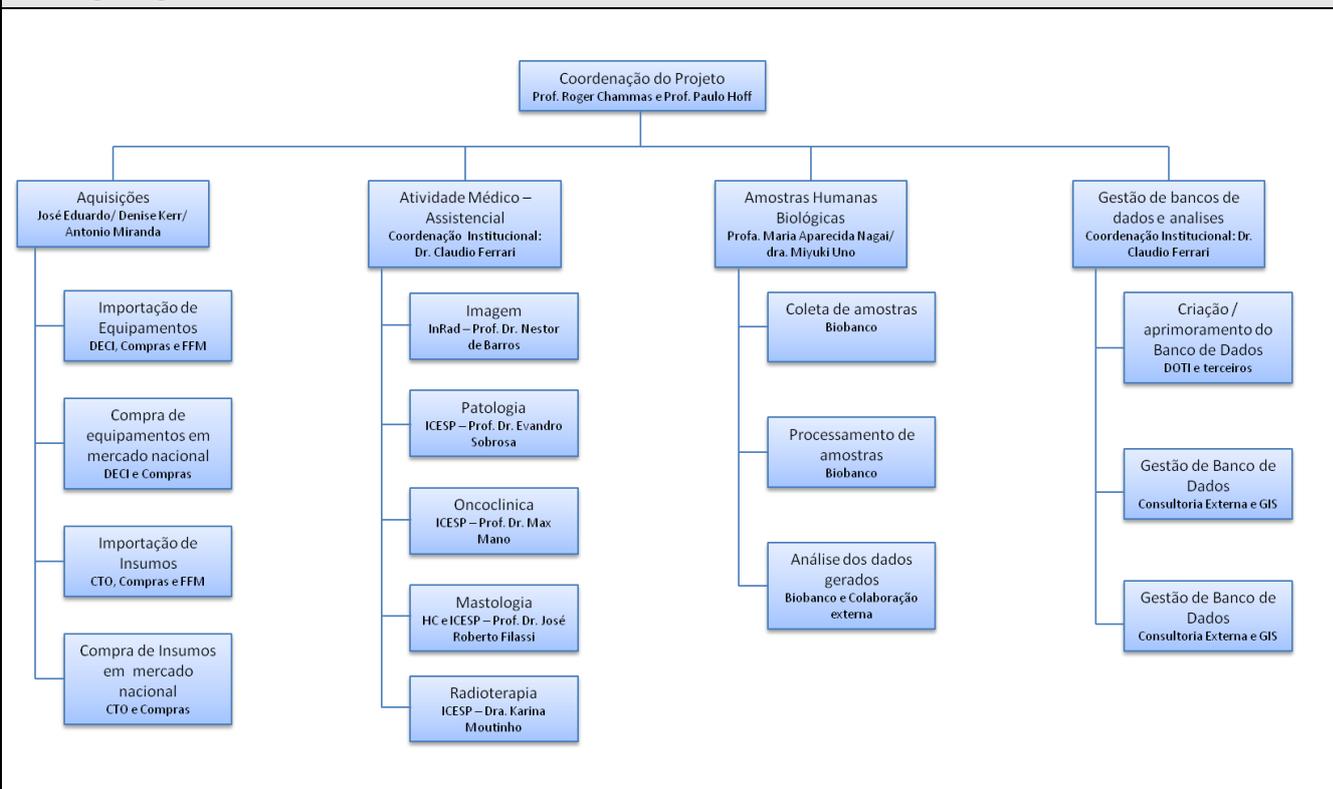
20. Disseminação dos Resultados

Os dados obtidos serão publicados como artigo científico em revistas indexada com seletiva política editorial, divulgadas em congressos e eventos.

21. Projetos multicêntricos

Não se aplica

22. Organograma



24. Plano de Atividades

Descrição da atividade	Duração	Descrição do indicador	Unidade de medida	Metas Quantitativas	Valor Estimado R\$
Captação de recursos e estruturação de pessoal	36 meses				R\$ 779.276,50
Aquisição e instalação dos equipamentos	8 meses	Avaliação de desempenho da duração em meses.	%	85	R\$ 4.552.353,04
Compra de insumos	36 meses	Avaliação de desempenho da duração em meses.	%	85	
Seleção, coleta e processamento das amostras	32 meses	Número de amostras coletadas e processadas	Numero	200	
Análise de dados	24 meses	Número de seqüências analisadas	Número	96	
Aquisição de software para gestão de banco de dados	12 meses	Avaliação de desempenho da duração em meses.	%	85	
Desenvolvimento do sistema integrado de dados	18 meses	Avaliação de desempenho da duração em meses.	%	85	
TOTAL:					

25. Observação

--



Descrição do Projeto - PRONON



Retratos da Mama

ANEXO VI

Planilha Orçamentária

DEMONSTRATIVO DA PROJEÇÃO DAS DESPESAS - PRONON

Título do Projeto: RETRATOS DA MAMA

Valor total do projeto: R\$ 5.331.629,54

CUSTOS DIRETOS DO PROJETO			
NATUREZA	DESCRIÇÃO	PREVISÃO DE DESPESAS (R\$)	% SOBRE O VALOR TOTAL DO PROJETO
CUSTEIO	Recursos humanos de apoio (Enfermeira; Monitoramento e registro complementar e Análises Estatísticas e Bioinformática)	779.276,50	15%
	Serviço de terceiros - Pessoa Jurídica (Criação Banco de Dados complementar (Desenvolvimento TI); Gestão de Banco de Dados e análises (software + operador); Auditoria Independente; Manutenção preventiva e corretiva dos equipamentos (ultracentrífuga e Nanosight))	606.000,00	11%
	Material de Consumo (Insumos)	2.749.059,44	52%
CUSTOS INDIRETOS DO PROJETO			
NATUREZA	DESCRIÇÃO	PREVISÃO DE DESPESAS (R\$)	% SOBRE O VALOR TOTAL DO PROJETO
CAPITAL	Equipamentos e Material Permanente (Detalhamento abaixo)	1.148.673,60	21%
	Equipamentos de Informática (Detalhamento abaixo)	48.602,00	1%
TOTAL		5.331.629,54	100%

Investimento	Item	Valor estimado
Equipamentos e Material Permanente	Ultracentrífuga	522.854,64
	Nanosight	555.000,00
	Canister de nitrogênio	5.083,00
	Agitador Vortex	6.143,96
	Sistema de Aspiração a Vácuo (QLAVAC)	23.270,00
	Detector O2	6.280,00
	Máquina de Gelo	30.042,00
Equipamentos de Informática	Nobreak	10.000,00
	Servidor dedicado	28.000,00
	Computadores	10.620,00