

**AVALIAÇÃO DE PAINEL MULTIGENES EM
MULHERES BRASILEIRAS COM CÂNCER DE MAMA**

DANIELE PAIXÃO PEREIRA

**Tese de Doutorado apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do grau de Doutora em Ciências**

Área de atuação: Oncologia

Orientadora: Dr^a. Dirce Maria Carraro

Co-Orientadora: Dr^a. Maria Nirvana da Cruz Formiga

São Paulo

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

P436 Pereira, Daniele Paixão

Avaliação de painel multigenes em mulheres brasileiras com câncer de mama. Daniele Paixão Pereira – São Paulo, 2020.

85p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. Neoplasias da Mama/Breast Neoplasms. 2. Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário/Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. 3. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala/High-Throughput Nucleotide Sequencing

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

DEDICATÓRIA

“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

“O potencial da humanidade é infinito e todo ser tem uma contribuição a fazer por um mundo mais grandioso. Estamos todos nele juntos. Somos UM.”

Helena P. Blavatsky

AGRADECIMENTOS

“O agradecimento é a memória do coração.”

Lao-Tse

Sou grata ao Divino Criador pela vida, por todas as oportunidades de crescimento e pelas conquistas diárias.

Agradeço aos meus queridos irmãos, especialmente ao Beto, Juliana e Marcelo, pela parceria e por trilharem comigo a minha caminhada. Aos meus pais e familiares pelo apoio sempre.

Agradeço a minha Orientadora, Dra. Dirce Maria Carraro, pela oportunidade de desenvolver esse projeto, pela orientação e pela contribuição no meu processo de aprendizado.

Agradeço a minha Co-orientadora, Dra. Maria Nirvana Formiga, pela ajuda e parceria.

À Giovana Tardin Torrezan por toda a colaboração nas análises, ensinamentos, paciência e disponibilidade, que foram essenciais para a condução desse projeto.

Minha sincera gratidão a todas as pacientes que participaram deste estudo e que o tornaram possível.

À querida equipe do Departamento de Oncogenética do A.C.Camargo Cancer Center - Gisleine Siqueira, Dra. Rima Jibli, Dr. Diogo Soares, Dr. José Claudio Casali - pelo apoio e pelo convívio sempre prazeroso e enriquecedor.

Aos meus amigos e todos aqueles que fizeram parte dessa jornada.

Aos preciosos colegas de ofício Dr. Wagner Baratella, Dr. Caio Robledo e Dr. Ismael Dale Cotrim, pelo valioso aprendizado a cada dia e pelas conversas edificantes.

Aos funcionários da Pós Graduação e do Comitê de Ética em Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center pelo auxílio e presteza.

Aos funcionários da Biblioteca do A.C.Camargo Cancer Center - em especial à Suely da área do ensino apoio ao aluno, por toda a colaboração e disponibilidade.

Minha gratidão à equipe de Estatística do A.C.Camargo Cancer Center, especialmente à Barbara, pela ajuda inestimável.

RESUMO

Pereira DP. **Avaliação de painel multigenes em mulheres brasileiras com câncer de mama.** [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

Introdução: Apenas 5-10% dos casos de câncer de mama estão relacionados a variantes genéticas herdadas e mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, relacionadas à Síndrome do câncer de mama e ovário hereditário (SMOH), são identificadas na maioria desses casos. Além dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, outros genes também estão associadas a um risco elevado e moderado para o câncer de mama, como *TP53*, *STK11*, *CDH1*, *PTEN*, *ATM*, *CHEK2* e *PALB2* e fazem parte do grupo de genes acionáveis com estratégias de manejo clínico e prevenção bem estabelecidos. A implementação do Sequenciamento de Nova Geração (NGS) vem permitindo a análise simultânea de múltiplos genes através dos painéis multigenes com maior rapidez na análise e menor custo quando comparada ao sequenciamento de um gene único e, atualmente, vem sendo amplamente utilizado em Oncologia para identificação das síndromes de predisposição hereditária ao câncer. **Objetivo:** O objetivo desse estudo é avaliar a contribuição do painel multigenes na detecção de mutações germinativas em outros genes, além de *BRCA1* e *BRCA2*, em pacientes com critérios clínicos para câncer de mama hereditário. **Pacientes e Métodos:** Um painel NGS de 94 genes foi realizado em 321 pacientes com diagnóstico atual ou prévio de câncer de mama que apresentavam critérios clínicos para SMOH, e que realizaram o teste genético para os genes *BRCA1* e *BRCA2* no Laboratório de Diagnóstico Genômico do A.C.Camargo Cancer Center, entre agosto de 2016 e maio de 2018. **Resultados:** A análise dos dados do painel das 321 pacientes resultou em um total de 84 variantes patogênicas/provavelmente patogênicas (VP/PP) que foram identificadas em 81 pacientes e a positividade do teste genético foi de 25,2% (n=81/321). Três pacientes (n=3/81 – 3,7%) apresentaram duas VP/PP em genes distintos e foram diagnosticadas com Síndrome da Neoplasia Hereditária Multialélica (MINAS). Do total de VP/PP, 42,9% (n=36/84) foram identificadas em genes de alta penetrância para câncer de mama (*BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*) e 21,4% (n=18/84) em genes de penetrância moderada (*ATM*, *PALB2* e *CHEK2*). O restante, correspondente a 35,7% (n=30/84) das VP/PP, foram identificadas em genes de baixa penetrância para câncer de mama e foram considerados como achados incidentais, uma vez que não apresentaram correlação genótipo-fenótipo. Em relação ao

subtipo molecular do câncer de mama, o subtipo triplo negativo apresentou frequência de VP/PP de 31,6% (n=25/79), com predomínio de mutações no gene *BRCA1* (12,6% - n=10/79). Entre o subtipo luminal, 18,7% (n=29/155) apresentavam VP/PP e destes, mutações em genes não-*BRCA1/2* predominaram com frequência de 12,2% (n=19/155). Para o subtipo Luminal B HER2, 40% (n=16/40) apresentaram uma VP/PP, com predomínio do gene *ATM* (12,5% - n=5/40). Finalmente, o subtipo hiperexpressor de HER2 apresentou frequência de VP/PP de 30,8% (n=4/13), sem predominância de genes específicos. Variantes de significado incerto foram identificadas em 77,6% (n=249/321) das pacientes e dessas, 24,5% (n=61/249) apresentaram também ao menos uma VP/PP. **Conclusão:** O painel 94 genes contribuiu para identificar VP/PP em outros genes além de *BRCA1/2*, aumentando a positividade do teste genético de 9,9% (*BRCA1/2*) para 25,2%. Considerando-se apenas os genes acionáveis, o aumento na positividade do teste em nossa coorte foi de 6,9%. Esses resultados indicam que mulheres com critérios clínicos para SMOH podem se beneficiar da realização de um painel multigenes, pois o mesmo permite identificar variantes patogênicas em outros genes de predisposição ao câncer de mama, incluindo os genes acionáveis, que impactam diretamente no acompanhamento desses pacientes e familiares, uma vez que são genes com estimativas de risco para câncer estabelecidas e estratégias de rastreamento e prevenção bem definidas.

Descritores: Neoplasias da Mama. Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário. Sequenciamento de Nucleotídeos em Larga Escala

ABSTRACT

Pereira DP. [Evaluation of a multigene panel in Brazilian women with breast cancer]. [Tese]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2020.

Introduction: Only 5-10% of breast cancer are related to inherited genetic variants and *BRCA1* and *BRCA2* mutations, associated to the Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome (HBOC), are responsible for the majority of cases. In addition to *BRCA1* and *BRCA2*, other genes are also associated with a high and moderate risk for breast cancer, such as *TP53*, *STK11*, *CDH1*, *PTEN*, *ATM*, *CHEK2* and *PALB2*, considered actionable genes, once they have well-established guidelines for clinical management and prevention. The implementation of Next Generation Sequencing (NGS) has allowed to sequence multiple genes simultaneously, faster and lower-cost when compared to the sequencing of a single gene and, currently, it has been widely used in Oncology for identification of hereditary cancer predisposition syndromes. **Objective:** The aim of this study is to evaluate the contribution of the multigene panel in detection of germline mutations in other genes besides *BRCA1/2* in patients with clinical criteria for hereditary breast cancer. **Patients and Methods:** A NGS panel of 94 cancer predisposition genes was performed on 321 patients with current or previous diagnosis of breast cancer and clinical criteria for HBOC, who were referred for *BRCA1/2* testing between August 2016 and May 2018. **Results:** Panel analysis of 321 patients resulted in a total of 84 pathogenic/likely pathogenic (P/LP) variants were identified in 81 patients and the positivity rate of the genetic test was 25.2% (n=81/321). Three patients (n=3/81 - 3.7%) had two P/LP variants in different genes and were diagnosed with the multilocus inherited neoplasia alleles syndrome (MINAS). Of the total deleterious mutations, 42.9% (n=36/84) were identified in high-risk breast cancer genes (*BRCA1/2* and *TP53*) and 21.4% (n= 8/84) in moderate-penetrance genes (*ATM*, *PALB2* and *CHEK2*). The remainder of the mutations, corresponding to 35.7% (n=30/84), were identified in low-risk genes and were considered unexpected findings, since they did not demonstrate a genotype-phenotype correlation. Regarding the molecular subtype of breast cancer, triple negative breast cancer had a mutation frequency of 31.6% (n=25/79), with a predominance in *BRCA1* (12.6% - n=10/79). Among the luminal subtype, 18.7% (n=29/155) had deleterious mutations and of these, mutations in non-*BRCA1/2* genes predominated with a frequency of 12.2% (n=19/155).

For Luminal B HER2-positive subtype, 40% (n=16/40) had a P/LP variants, with a predominance of *ATM* gene (12.5% - n=5/40). Finally, HER2-enriched subtype presented a mutation frequency of 30.8% (n=4/13). Variants of uncertain significance were identified in 77.6% (n = 249/321) of the patients and of these, 24.5% (n=61/249) also had at least one P/LP variant. **Conclusion:** The NGS panel contributed to identify P/LP variants in genes other than *BRCA1/2*, increasing the positivity of the genetic test from 9.9% (*BRCA1/2*) to 25.2%. Considering only the actionable genes, the increase in positivity in our cohort was 6.9%. These results indicate that women with clinical criteria for HBOC may benefit from a multigene panel testing, as it allows to identify P/LP variants in other breast cancer susceptibility genes, including actionable genes, that directly impact the clinical management of these patients and family members, since they are genes with established risk assessment and well-defined screening and prevention strategies.

Keywords: Breast Neoplasms. Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. High-Throughput Nucleotide Sequencing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição de resultados do painel de 94 genes nas 321 pacientes participantes do estudo.....	28
Figura 2	Distribuição das 84 mutações germinativas de acordo com o gene, encontradas em 81 das 321 pacientes que realizaram o painel de 94 genes	30
Figura 3	Heredograma da paciente P013, portadora de duas variantes patogênicas/provavelmente patogênicas nos genes <i>BRCA2</i> e <i>CHEK2</i>	51
Figura 4	Heredograma da paciente P160, portadora de duas variantes patogênicas nos genes <i>BRCA2</i> e <i>TP53</i>	52
Figura 5	Espectro das variantes patogênicas/provavelmente patogênicas detectadas de acordo com o subtipo molecular do câncer de mama.....	57
Figura 6	Distribuição das VUS pelo número de pacientes, de acordo com o gene identificado	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios clínicos da NCCN para realização de pesquisa de mutações nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	4
Tabela 2	Critérios clássicos da LFS	7
Tabela 3	Critérios de Chompret versão 2015.....	8
Tabela 4	Critérios clínicos da Síndrome de Cowden	9
Tabela 5	Genes de alta e moderada penetrância para câncer de mama com risco relativo estimado e diretrizes de manejo	14
Tabela 6	Características Clínicas e Tumorais na população de estudo (n= 321).....	27
Tabela 7	Mutações germinativas patogênicas/provavelmente patogênicas identificadas nos 94 genes do painel realizado nas 321 pacientes incluídas no estudo.....	31
Tabela 8	Descrição das 84 variantes patogênicas/provavelmente patogênicas encontradas em 81 das pacientes incluídas no estudo.....	32
Tabela 9	Preditores clínicos, anatomopatológicos e familiares analisados quanto à significância em relação a presença de variante patogênica/provavelmente patogênica	38
Tabela 10	Preditores clínicos, anatomopatológicos e familiares analisados quanto à significância em relação à presença de variante patogênica/provavelmente patogênica, excluindo-se os genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	40

Tabela 11	Descrição de outras neoplasias diagnosticadas previamente nas pacientes incluídas no estudo e a distribuição conforme presença ou não de variante patogênica/provavelmente patogênica nos genes avaliados.....	53
Tabela 12	Frequência das variantes patogênicas/provavelmente patogênicas de acordo com o subtipo molecular do câncer de mama	56

LISTA DE ABREVIATURAS

ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
ADR	Carcinoma Adrenocortical
ANS	Agência Nacional de Saúde Suplementar
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
dbSNP	<i>The Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
gnomAD	<i>The Genome Aggregation Database</i>
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2
HGVS	<i>Human Genome Variation Society</i>
IC	Intervalo de Confiança
LDG	Laboratório de Diagnóstico Genômico
LFS	Síndrome de Li-Fraumeni
LOF	<i>Loss-of-function</i>
MAF	<i>Minor Allele Frequency</i>
MINAS	<i>Multilocus Inherited Neoplasia Alleles Syndrome</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PP	Provavelmente patogênica
SMOH	Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditário
SPHC	Síndromes de predisposição hereditária ao câncer
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
VCF	<i>Variant Call Format</i>
VUS	<i>Variant of uncertain significance</i>
VP	Variante patogênica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer de mama no Mundo e no Brasil.....	1
1.2	Câncer de mama hereditário	1
1.3	Genes de alta penetrância relacionados ao câncer de mama	2
1.3.1	Genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	2
1.3.2	Gene <i>TP53</i>	6
1.3.3	Gene <i>PTEN</i>	9
1.3.4	Gene <i>STK11</i>	10
1.3.5	Gene <i>CDHI</i>	11
1.4	Genes penetrância moderada relacionados ao câncer de mama	12
1.5	Genes de baixa penetrância relacionados ao câncer de mama	13
1.6	Painel de Sequenciamento de múltiplos genes	15
1.7	Variantes de Significado Incerto	16
1.8	Aconselhamento Genético	18
2	JUSTIFICATIVA	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	Objetivo Geral	21
3.2	Objetivos Específicos	21
4	PACIENTES E MÉTODOS	22
4.1	Seleção de pacientes	22
4.2	Metodologia.....	22
4.3	Análise Estatística.....	25
5	RESULTADOS	26
5.1	População estudada.....	26
5.2	Frequência de mutações patogênicas encontradas.....	28
5.3	Preditores de mutações patogênicas	36

5.3.1	Idade	36
5.3.2	Etnia	36
5.3.3	Histologia.....	36
5.3.4	<i>Status</i> do receptor hormonal	37
5.3.5	Câncer de mama bilateral	37
5.3.6	Diagnóstico de outra neoplasia maligna	37
5.3.7	História familiar de câncer.....	37
5.4	Preditores de mutações patogênicas, excluindo-se os genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	39
5.5	Correlação Genótipo-Fenótipo	41
5.5.1	Gene <i>ATM</i>	41
5.5.2	Gene <i>BLM</i>	41
5.5.3	Gene <i>BRCA1</i>	42
5.5.4	Gene <i>BRCA2</i>	42
5.5.5	Gene <i>BRIP1</i>	42
5.5.6	Gene <i>CHEK2</i>	43
5.5.7	Gene <i>FANCA</i>	43
5.5.8	Gene <i>FANCD2</i>	43
5.5.9	Gene <i>FANCE</i>	44
5.5.10	Gene <i>FANCI</i>	44
5.5.11	Gene <i>FANCL</i>	44
5.5.12	Gene <i>FANCM</i>	44
5.5.13	Gene <i>FH</i>	45
5.5.14	Gene <i>HNF1A</i>	45
5.5.15	Gene <i>MUTYH</i>	45
5.5.16	Gene <i>PALB2</i>	46
5.5.17	Gene <i>PHOX2B</i>	46
5.5.18	Gene <i>PMS2</i>	46
5.5.19	Gene <i>PRF1</i>	47
5.5.20	Gene <i>RAD51C</i>	47
5.5.21	Gene <i>RECQL4</i>	47
5.5.22	Gene <i>SBDS</i>	48
5.5.23	Gene <i>SLX4</i>	48
5.5.24	Gene <i>TP53</i>	48
5.6	Correlação Genótipo-Fenótipo das pacientes com MINAS	49

5.7	Pacientes com diagnóstico de outras neoplasias.....	53
5.8	Análise de variantes patogênicas/provavelmente patogênicas de acordo com o subtipo molecular do câncer de mama.....	54
5.9	Frequência de variantes de significado incerto encontradas.....	58
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÕES.....	68
8	REFERÊNCIAS.....	69

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

APÊNDICES

Apêndice 1 94 genes contidos no Painel realizado no Laboratório de Diagnóstico Genômico-Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center

Apêndice 2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para as pacientes incluídas no projeto.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA NO MUNDO E NO BRASIL

A incidência de câncer no mundo cresce a cada ano. De acordo com as últimas estimativas mundiais, no ano de 2018 foram diagnosticados 18 milhões de casos novos de câncer em todo o mundo, acarretando no total de 9,6 milhões de mortes por câncer no mesmo ano (Bray et al. 2018). Dos casos novos de câncer, 53% ocorrem em homens e 47% em mulheres. O câncer de pulmão permanece como o mais incidente no mundo (2,1 milhões) seguido pelo câncer de mama (2,1 milhões), cólon e reto (1,8 milhão) e próstata (1,3 milhão) (Bray et al. 2018).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estima para o triênio de 2020-2022 aproximadamente 625 mil novos casos de câncer para cada ano, e destes, cerca de 66 mil novos casos de câncer de mama. Excetuando-se os tumores de pele do tipo não melanoma, o câncer de mama é o mais frequente em mulheres no país, além de ser a primeira causa de morte por câncer em mulheres brasileiras (Ministério da Saúde 2019).

Frente a esses dados, considera-se o câncer de mama como um importante problema de saúde pública da mulher no Brasil e no mundo. Desta forma, é fundamental a adoção de medidas objetivando a prevenção primária (prevenção da ocorrência) e secundária (detecção precoce) da doença.

1.2 CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO

Estima-se que cerca de 5-10% dos casos de câncer de mama sejam hereditários, ou seja, causados por mutações genéticas herdadas (Claus et al. 1996). Mutações germinativas em genes de alta e moderada penetrância estão associadas às síndromes de predisposição hereditária ao câncer (SPHC). Algumas SPHC apresentam um alto risco para desenvolvimento de câncer de mama, como a Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditário (SMOH), Síndrome de Cowden, Síndrome de Li-Fraumeni (LFS), Síndrome de Peutz-Jeghers e Síndrome do Câncer Gástrico Difuso Hereditário (Tucker e Friedman 2002; Garber e Offit 2005, Euhus e Robinson 2013).

A maioria das SPHC apresenta herança autossômica dominante e predispõe os indivíduos portadores a um maior risco de desenvolvimento de tumores em idade jovem em relação à população geral. As SPHC tem como característica a ocorrência de múltiplos tumores primários no mesmo indivíduo, tumores primários bilaterais, multifocais ou de etiologia rara, presença de familiares em primeiro grau com tumores no mesmo sítio e ocorrência de muitos casos de câncer afetando várias gerações de uma mesma família (Lindor et al. 2008).

Com o avanço da Genética Molecular, os testes para a detecção de mutações germinativas causadoras das SPHC estão cada vez mais integrados à prática clínica, possibilitando a identificação de indivíduos portadores sintomáticos e assintomáticos em risco. O aconselhamento genético e o acompanhamento multidisciplinar são fundamentais para esses pacientes e seus familiares, objetivando a adoção de estratégias de rastreamento para detecção precoce de câncer e medidas redutoras de risco.

1.3 GENES DE ALTA PENETRÂNCIA RELACIONADOS AO CÂNCER DE MAMA

Mutações germinativas em genes de alta penetrância caracterizam a maioria das SPHC e estão associados a um elevado risco para desenvolvimento de câncer (Turnbull e Rahman 2008).

Podem ser classificados como genes de alta penetrância para câncer de mama aqueles relacionados a um risco relativo ≥ 5 (Slavin et al. 2015). Nesse grupo, estão incluídos os genes *BRCA1* e *BRCA2*, relacionados SMOH, além dos genes *TP53*, *PTEN*, *STK11* e *CDH1*, associados a Síndrome de Li-Fraumeni, Síndrome de Cowden, Síndrome de Peutz-Jeghers e Síndrome do Câncer Gástrico Difuso Hereditário, respectivamente. Essas síndromes apresentam risco de câncer conhecido e medidas de prevenção e redução de risco estabelecidas (Tabela 5).

1.3.1 Genes *BRCA1* e *BRCA2*

Os genes *BRCA1* (OMIM *113705), localizado no cromossomo 17q12-23 e *BRCA2* (OMIM *600185), localizado no cromossomo 13q12-13 são supressores tumorais, cuja presença de mutações germinativas está relacionada à SMOH (Miki et al. 1994; Wooster et al. 1994).

Ambos são genes de alta penetrância e apresentam centenas de mutações já identificadas. A prevalência global de mutações patogênicas nos genes de *BRCA1/2* na população é de cerca de 1:400 (Anglian Breast Cancer Study Group 2000; Whittemore et al. 2004b). Em judeus Ashkenazi, a frequência é de 1:40 devido à presença de três mutações fundadoras nessa população: c.187delAG e c.5385insC em *BRCA1*; e c.6174delT em *BRCA2* (Metcalf et al. 2010).

Portadores de mutações germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2* possuem alto risco para o desenvolvimento de câncer de mama e de ovário. Estima-se um risco ao longo da vida de 41% a 90% para câncer de mama e de 13% a 58% para câncer de ovário, dependendo da população estudada e do tipo de mutação apresentada (Cass et al. 2003; Antoniou et al. 2006; Risch et al. 2006; Euhus e Robinson 2013; Chen et al. 2020). Outras neoplasias malignas também são mais frequentes na SMOH, incluindo câncer de tuba uterina, peritônio, próstata, pâncreas, melanoma, câncer de mama masculino, tumores de vias biliares, bexiga, esôfago, estômago, sistema hematopoiético, cavidade oral e faringe (Couch et al. 1996; Offit 1998; Breast Cancer Linkage Consortium 1999; Risch et al. 2001; Thompson e Easton 2002; Liede et al. 2004; Hodgson et al. 2007). O câncer de mama masculino está associado à SMOH. Estima-se que homens com mutação em *BRCA2* apresentam um risco ao longo da vida de 7% a 8% para câncer de mama, e com mutação em *BRCA1* de cerca de 1,2% (Tai et al. 2007).

Tumores de mama com imunofenótipo triplo negativo, caracterizados pela ausência de expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e ausência de superexpressão/amplificação do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), são frequentemente associados à SMOH. Alguns estudos apontam que de 8.5% a 28% das pacientes com câncer de mama triplo negativo apresentam mutação em *BRCA1* e de 3% a 17% em *BRCA2* (Young et al. 2009; Evans et al. 2011; Couch et al. 2015).

No Brasil, vários estudos já foram realizados para análise dos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes com câncer de mama e ovário. Carraro et al. (2013) avaliou a presença de mutações germinativas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* (c.1100delC) e *TP53* em 54 pacientes com câncer de mama abaixo dos 35 anos, sendo detectada mutações patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2* em 20,5% das pacientes (13% - *BRCA1* e 7% - *BRCA2*) e 50% das pacientes com tumor de mama com imunofenótipo triplo negativo apresentaram mutação em *BRCA1*. Em um outro estudo com 131 pacientes brasileiras com câncer de mama triplo negativo testadas também para os genes *BRCA1* e *BRCA2*, mutações patogênicas foram detectadas em 13%, sendo a maioria (88,2%) no gene *BRCA1* (Brianese et al. 2017). Em relação ao câncer de ovário, Maistro et al. (2016) avaliou a presença de mutações

germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em 100 pacientes brasileiras diagnosticadas com câncer epitelial de ovário e 19% apresentaram mutações patogênicas nos genes avaliados, sendo a maioria em *BRCA1*.

A suspeita diagnóstica da SMOH é feita através de critérios clínicos. Nos Estados Unidos, a *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) publica anualmente critérios clínicos para o diagnóstico da síndrome. Segundo as recomendações da NCCN, pacientes com diagnóstico de câncer de mama e pelo menos um dos critérios clínicos propostos tem indicação de realizar o teste genético para a síndrome. Os critérios clínicos estão descritos no Tabela 1.

Tabela 1 - Critérios Clínicos da NCCN para realização de pesquisa de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

1) Paciente com diagnóstico de câncer de mama e 1 ou mais dos seguintes critérios:

- Diagnóstico ≤ 45 anos, independente da história familiar;
- Diagnóstico entre 46-50 anos com história familiar desconhecida ou limitada; ou diagnóstico de um segundo câncer de mama em qualquer idade; ou ≥ 1 familiares com câncer de mama, ovário, pâncreas, ou próstata em qualquer idade;
- Diagnóstico de câncer de mama triplo-negativo ≤ 60 anos;
- Diagnóstico em qualquer idade com ≥ 1 familiares com câncer de mama ≤ 50 anos ou ovário, pâncreas, próstata metastático em qualquer idade;
- Diagnóstico em qualquer idade com ascendência judaica Ashkenazi;
- Um total de 3 casos de câncer de mama na paciente e/ou familiares em qualquer idade
- Diagnóstico de câncer de mama masculino, em qualquer idade

2) Paciente com diagnóstico de carcinoma do ovário, em qualquer idade.

3) Paciente com diagnóstico de câncer de próstata metastático em qualquer idade.

4) Paciente com diagnóstico de câncer de pâncreas exócrino em qualquer idade.

5) Presença de mutação patogênica em *BRCA1* ou *BRCA2* na família.

Fonte: NCCN (2021)

Um estudo recente realizado no sul do Brasil, analisou os critérios clínicos da NCCN para a indicação de teste genético para a SMOH buscando identificar os critérios mais informativos para a população brasileira. Foram avaliadas 418 pacientes com critérios clínicos para teste, sendo destas, 79% com câncer de mama, 8,8% com câncer de ovário e 13% sem diagnóstico de câncer. Oitenta e três variantes patogênicas nos genes *BRCA1* e/ou *BRCA2* foram identificados em 19,1% das pacientes. Os dados do estudo sugerem que a idade no diagnóstico (especialmente para câncer de mama), câncer de mama bilateral e/ou triplo-negativo e diagnóstico de câncer de ovário são os achados com o maior valor preditivo para um resultado de teste positivo para SMOH (Aleamar et al. 2017).

O rastreamento preconizado para portadoras de mutações patogênicas/provavelmente patogênicas nos genes *BRCA1/2* baseia-se no alto risco para câncer de mama e ovário em idade jovem. Para rastreamento do câncer de mama, a NCCN recomenda o auto-exame mensal das mamas a partir dos 18 anos e exame clínico semestral/anual a partir dos 25 anos. Entre 25 e 29 anos, indica-se a realização anual de ressonância magnética das mamas ou mamografia/tomossíntese (caso a ressonância não esteja disponível). A idade ideal para se iniciar o rastreamento pode ser individualizada de acordo com a história familiar de câncer, principalmente se houver familiar com diagnóstico antes dos 30 anos. Entre as idades de 30 e 75 anos, deve-se alternar mamografia/tomossíntese e ressonância de mama a cada seis meses e, após 75 anos, o rastreamento deve ser individualizado. Pacientes com diagnóstico prévio de câncer de mama devem manter o rastreamento após o tratamento com mamografia/tomossíntese e ressonância magnética das mamas para o tecido mamário remanescente (NCCN 2021).

Segundo a NCCN (2021), a mastectomia total bilateral pode ser considerada nas mulheres com a SMOH para redução de risco. Alguns estudos mostram que a mastectomia bilateral reduz em 90% o risco de desenvolver câncer da mama em portadoras de mutações em *BRCA1/2*, proporcionando um alto grau de proteção (Hartmann et al. 1999; Hartmann et al. 2001).

Em relação ao câncer de ovário (incluindo-se carcinoma de tuba uterina e peritônio), o risco para mulheres com SMOH é menor do que o risco de câncer de mama. Porém, frente à dificuldade de diagnóstico precoce pela inexistência de exames eficazes de rastreamento e o prognóstico reservado da doença diagnosticada em estágio clínico avançado, recomenda-se a realização de salpingooforectomia bilateral redutora de risco nessas pacientes após a constituição da prole. O câncer de ovário é mais prevalente em portadoras de mutação em *BRCA1* e a maior taxa de incidência ocorre entre 50 a 59 anos, enquanto que para *BRCA2* ocorre entre 60 a 69 anos. Assim, recomenda-se que a salpingooforectomia bilateral redutora de risco seja realizada entre 35 e 40 anos para mulheres com mutação em *BRCA1* e entre 40 e 45 anos para *BRCA2* (Finch et al. 2014; NCCN 2021).

Vários estudos têm demonstrado que a salpingooforectomia bilateral reduz a incidência de câncer de ovário (incluindo tuba uterina e peritônio) em portadoras de mutação em *BRCA1/2* entre 80% a 85%, além de aumentar a sobrevivência (Kauff et al. 2008; Rebbeck et al. 2009). A salpingooforectomia bilateral também está associada à redução do risco de câncer de mama em cerca de 50% nessas pacientes (Rebbeck et al. 2009).

Em pacientes não elegíveis à salpingooforectomia redutora de risco, pode-se

considerar o rastreamento com ultrassonografia pélvica transvaginal e dosagem sérica do marcador tumoral CA125 a partir de 30 a 35 anos de idade, apesar da falta de evidências em relação ao benefício (NCCN 2021).

Mulheres portadoras de mutação patogênica/provavelmente patogênica nos genes *BRCA1/2* devem receber aconselhamento genético em relação às cirurgias redutoras de risco, com orientações sobre risco de câncer, riscos associados às cirurgias, opções de reconstrução, impacto na reprodução, sintomas e riscos relacionados à menopausa precoce (doença cardiovascular, osteoporose, alterações sexuais), assim como discussão sobre aspectos psicossociais e de qualidade de vida.

1.3.2 Gene *TP53*

O *TP53* (OMIM *191170) é um gene supressor tumoral, localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) que produz a proteína p53 que participa de vários processos celulares importantes (proliferação celular, apoptose e estabilidade do genoma) (Malkin et al. 1990; Levine et al. 1991).

Mutações germinativas em *TP53* estão relacionadas à Síndrome de Li-Fraumeni (LFS; OMIM #151623), uma SPHC de herança autossômica dominante, caracterizada pela alta penetrância com expressividade variável e alto risco de desenvolvimento de múltiplos tumores, sendo os tumores mais frequentemente associados os sarcomas de partes moles e osteossarcomas, carcinoma adrenocortical (ADR), câncer de mama em mulheres na pré-menopausa, tumores cerebrais e leucemia (Li e Fraumeni 1969a e b; Malkin et al. 1990; Srivastava et al. 1990, Li et al. 1988; Malkin et al. 1990).

O risco estimado para o desenvolvimento de câncer é de 90% até os 60 anos de idade (Birch et al. 2001). Estima-se que a prevalência no mundo de mutações germinativas no gene *TP53* seja de 1:5.000 a 1:20.000 (Lalloo et al. 2003; Gonzalez et al. 2009). No Brasil, há uma incidência maior devido à ocorrência da mutação fundadora p.R337H no gene *TP53* na população do Sul e Sudeste do país, com uma prevalência da LFS de 0,3% na população dessas regiões (Palmero et al. 2008; Custódio et al. 2013).

Em adultos, os tumores predominantes são câncer de mama e sarcomas de partes moles. Um estudo recente detectou a presença de mutações germinativas no gene *TP53* em 6% de pacientes com diagnóstico de câncer de mama antes dos 31 anos, sem critérios clínicos para a LFS (Bougeard et al. 2015). Um outro estudo apontou uma probabilidade de 5% a 8% de identificar uma mutação germinativa em *TP53* em mulheres diagnosticadas com câncer de mama em idade jovem sem história familiar de câncer (Mccuaig et al. 2012).

No Brasil, Giacomazzi et al. (2014) investigaram a prevalência da mutação R337H em mulheres diagnosticadas com câncer de mama sem história familiar de câncer, encontrando uma frequência de mutação de 8,6%. O estudo de Silva et al. (2014), avaliou 120 mulheres brasileiras com câncer de mama com critérios clínicos para a SMOH, sendo detectadas mutações patogênicas em 31 pacientes (26%), incluindo 20 para *BRCA1* (64,5%), sete para *BRCA2* (22,5%), três para *TP53* R337H (10%) e um para *CHEK2* c.1100delC (3%). Esses resultados sugerem que pacientes com câncer de mama com critérios clínicos para SHOH e com resultados negativos para os genes *BRCA1/2* devem ser testadas para a variante *TP53* R337H (Silva et al. 2014).

Assim, mutações germinativas no gene *TP53*, principalmente a mutação R337H, podem desempenhar um papel importante na incidência de câncer de mama no Brasil.

O diagnóstico da LFS é inicialmente clínico. Os critérios clássicos da síndrome estão descritos no Tabela 2 (Li et al. 1988).

Tabela 2 - Critérios Clássicos da LFS.

CRITÉRIOS CLÁSSICOS DA LFS
Presença de todos os critérios abaixo:
- Probando com sarcoma diagnosticado \leq 45 anos
- Um familiar em primeiro grau com qualquer câncer \leq 45 anos
- Um familiar em primeiro ou segundo grau com qualquer câncer \leq 45 anos ou um sarcoma em qualquer idade.

O critério proposto por Chompret et al. (2001), revisado por TINAT et al. (2009) e mais recentemente atualizado por Bougeard et al. (2015) denominado critério de Chompret modificado, é atualmente o mais utilizado para diagnóstico da síndrome (Tabela 3).

Tabela 3 - Critérios de Chompret versão 2015.

CRITÉRIOS DE CHOMPRET VERSÃO 2015	
Apresentação Familiar	Probando com tumor pertencente ao espectro de tumores da LFS (sarcoma de partes moles, osteossarcoma, tumor cerebral, câncer de mama pré-menopausa, ADR) antes dos 46 anos e pelo menos um familiar em primeiro ou segundo grau com um tumor da LFS (exceto câncer de mama se o probando tem câncer de mama) antes dos 56 anos ou com múltiplos tumores
Múltiplos tumores primários	Probando com múltiplos tumores (exceto tumores múltiplos de mama), dois dos quais pertencentes ao espectro LFS e o primeiro diagnosticado antes dos 46 anos
Tumores raros	Probando diagnosticado com ADR, tumor de plexo coróide ou rabdomiossarcoma embrionário subtipo anaplásico, independente da história familiar
Câncer de mama em idade jovem	Câncer de mama diagnosticado antes dos 31 anos

O rastreamento para câncer de mama nas pacientes portadoras da LFS recomendado pela NCCN é semelhante ao recomendado para as portadoras de mutações em *BRCA1/2*. Indica-se a realização anual de ressonância magnética das mamas entre os 20 e 29 anos, acrescentando a mamografia/tomossíntese anualmente a partir dos 30 anos até os 75 anos de idade. A mastectomia total bilateral redutora de risco também pode ser considerada para essas pacientes como medida redutora de risco (NCCN 2021). O rastreamento para a LFS inclui ainda um protocolo extenso com vários outros exames para rastreamento de outros tipos de câncer, incluindo a ressonância magnética de corpo inteiro e crânio anualmente, exames laboratoriais, colonoscopia e endoscopia digestiva alta a cada 2-3 anos, entre outros (Villani et al. 2011; Paixão et al. 2018).

Portadores da LFS apresentam um risco aumentado de desenvolvimento de neoplasias primárias radioinduzidas, como observado em alguns estudos. Assim, recomenda-se evitar o uso de radiação ionizante sempre que possível nos exames de imagens para rastreamento e no tratamento de câncer de mama nesses pacientes (Limacher et al. 2001; Strong 2003; Masciari et al. 2008; Bougeard et al. 2015).

1.3.3 Gene *PTEN*

O *PTEN* (OMIM +601728) é também um gene supressor tumoral, localizado no cromossomo 10q23.3 (Steck et al. 1997).

Mutações germinativas em *PTEN* estão relacionadas à Síndrome de Cowden (OMIM #158350) que possui herança autossômica dominante e alta penetrância (Orloff e Eng 2008). Está associada a múltiplas lesões hamartomatosas, mucocutâneas benignas (triquilemomas, papilomas orais, neuromas mucocutâneos, queratose palmoplantar, lipomas, anomalias vasculares e fibromas) e risco aumentado para desenvolvimento de câncer, como mama, tireóide e endométrio (Starink et al. 1986).

O diagnóstico clínico da síndrome é baseado em critérios principais e menores, sendo necessário a presença no probando de três ou mais critérios principais (incluindo macrocefalia, doença de Lhermitte-Duclos, ou hamartomas gastrointestinais) ou a presença de dois critérios principais e três menores (Pilarski et al. 2013) (Tabela 4).

Tabela 4 – Critérios clínicos da Síndrome de Cowden.

CRITÉRIOS PRINCIPAIS
- Câncer de mama
- Câncer de endométrio (epitelial)
- Câncer de tireóide (folicular)
- ≥ 3 Hamartomas gastrointestinais (incluindo ganglioneuromas, exceto pólipos hiperplásicos)
- Doença de Lhermitte-Duclos (adulto)
- Macrocefalia (≥ 97 percentil)
- Pigmentação macular da glândula do pênis
- Múltiplas lesões mucocutâneas: ≥ 3 trichilemmomas, ceratoses acrais, ≥ 3 pits palmoplantares e/ou pápulas acrais hiperqueratóticas, ≥ 3 neuromas mucocutâneos, ≥ 3 papilomas orais
CRITÉRIOS MENORES
- Transtorno do espectro autista
- Câncer de cólon
- Acantose glicogênica esofágica (≥ 3 lesões)
- ≥ 3 Lipomas (lipomatose subcutânea)
- Deficiência intelectual
- Carcinoma de células renais
- Lipomatose testicular
- Câncer de tireóide (papilífero e papilífero variante folicular)
- Lesões estruturais da tireóide (adenoma, bócio multinodular)
- Anomalias vasculares

O risco ao longo da vida para câncer de mama em mulheres com Síndrome de Cowden foi estimado em até 85%, com uma penetrância de 50% aos 50 anos. Para o câncer de tireóide, o risco ao longo da vida estimado é de 35% para portadores, sendo os tumores de histologia folicular e papilífero predominantes (Tan et al. 2012). Lesões benignas também são comumente encontradas, como bócio multinodular, nódulos adenomatosos e adenomas foliculares, ocorrendo em até 75% dos indivíduos com a síndrome (Harach et al. 1999). O risco para o câncer de endométrio é estimado em 28%, principalmente em idade jovem (Tan et al. 2012). A síndrome também está relacionada com neoplasias gastrointestinais, sendo o risco para câncer colorretal estimado em 9%, com início aproximadamente aos 30 anos, e cerca de 90% dos portadores de mutações germinativas no gene *PTEN* apresentam pólipos ganglioneuromatosos, hamartomatosos, juvenis ou adenomatosos (Tan et al. 2012). Dentre outras neoplasias associadas estão o câncer renal e melanoma cutâneo, com risco cumulativo estimado em 34% e 6%, respectivamente (Tan et al. 2012).

Para o rastreamento do câncer de mama nas pacientes portadoras da Síndrome de Cowden, a NCCN recomenda o exame clínico a partir dos 25 anos ou 5-10 anos antes do primeiro câncer da mama ocorrido na família. Recomenda-se iniciar o rastreamento com mamografia/tomossíntese e ressonância magnética das mamas anualmente a partir dos 30-35 anos ou 5-10 anos antes do caso mais jovem de câncer da mama ocorrido na família. Após os 75 anos, o rastreamento deve ser individualizado (NCCN 2021).

1.3.4 Gene *STK11*

O gene *STK11* (OMIM * 602216) também chamado de *LKB1*, é um supressor tumoral localizado no cromossomo 19p13.3 (Jenne et al. 1998).

Mutações germinativas no gene *STK11* relacionam-se com a Síndrome de Peutz-Jeghers (OMIM #175200), uma SPHC de herança autossômica dominante caracterizada por pólipos gastrointestinais, pigmentação mucocutânea e risco aumentado para cânceres gastrointestinais, câncer de mama e ovário (não epitelial) (Peutz 1921; Bruwer et al. 1954; Jeghers et al. 1949; Hemmink et al. 1998).

O diagnóstico clínico da síndrome baseia-se na presença de um dos seguintes critérios: (1) presença de dois ou mais pólipos hamartomatosos confirmados histologicamente; (2) presença de qualquer número de pólipos hamartomatosos em indivíduo com história familiar da síndrome; (3) hiperpigmentação mucocutânea da boca, lábios, nariz, olhos, genitália ou dedos em indivíduo com história familiar da síndrome e (4) presença de qualquer número de pólipos em indivíduo com hiperpigmentação mucocutânea característica (Beggs et al. 2010).

O risco ao longo da vida para câncer de mama em mulheres portadoras da síndrome é de 8% aos 40 anos, 13% aos 50 anos, 31% aos 60 anos e 45% aos 70 anos (Hearle et al. 2006).

As recomendações da NCCN para o rastreamento do câncer de mama nas pacientes portadoras da síndrome incluem o exame clínico semestral e a realização de ressonância magnética das mamas e mamografia anualmente a partir dos 20 anos (NCCN 2021).

1.3.5 Gene *CDHI*

O gene *CDHI* (OMIM *192090), mapeado no braço longo do cromossomo 16, na posição 16q22.1, é responsável pela produção da proteína E-Caderina, que tem como principais funções a adesão celular e supressão tumoral (Chen et al. 1991; Takeichi 1991; Berx et al. 1995; Chritofori e Semb 1999).

A Síndrome do Câncer Gástrico Difuso Hereditário (OMIM #137215) é causada por mutações germinativas no gene *CDHI* (Guilford et al. 1998). Apresenta uma herança autossômica dominante e se caracteriza pelo alto risco de desenvolvimento de câncer gástrico difuso, também referido com carcinoma gástrico com células em anel de sinete, em idade jovem, com idade média de início de cerca de 38 anos.

Os critérios clínicos para suspeita da síndrome incluem um dos seguintes: (1) dois casos de câncer gástrico na família, sendo um indivíduo com câncer gástrico difuso confirmado antes dos 50 anos; (2) três familiares em primeiro ou segundo grau com câncer gástrico difuso confirmado em qualquer idade; (3) diagnóstico de câncer gástrico difuso antes dos 40 anos independente da história familiar (4) história pessoal ou familiar de câncer gástrico difuso e câncer de mama do tipo lobular, sendo um deles diagnosticado antes dos 50 anos (Fitzgerald et al. 2010).

O risco cumulativo estimado para câncer gástrico é de 80% para portadores da síndrome. Mulheres portadoras apresentam ainda um risco de 39% a 52% para câncer de mama do tipo histológico lobular (Pharoah et al. 2001; Kaurah et al. 2007).

A NCCN sugere realizar mamografia/tomosíntese anualmente e considerar ressonância magnética das mamas a partir dos 30 anos de idade, para portadoras da síndrome. A mastectomia redutora de risco pode ser considerada nessas pacientes de acordo com a história familiar (NCCN 2021).

1.4 GENES DE PENETRÂNCIA MODERADA RELACIONADOS AO CÂNCER DE MAMA

Genes de penetrância moderada para câncer de mama estão associados a um risco moderado de desenvolvimento de câncer. Podem ser classificados como genes de moderada penetrância para câncer de mama aqueles relacionados a um risco relativo ≥ 2 e < 5 (Slavin et al. 2015). Nesse grupo, destacam-se os genes *CHEK2*, *ATM* e *PALB2*.

Existem evidências suficientes para indicação de rastreamento para portadores de mutação patogênica, mesmo na ausência de história familiar de câncer (Tabela 5).

O gene *CHEK2* (OMIM +604373) é um gene supressor tumoral localizado na região cromossômica 22q12.1 (Pommier et al. 2005). Estima-se um risco de 20% ao longo da vida para câncer de mama para portadoras de mutações em *CHEK2*. Para portadoras que tenham um familiar em segundo grau com câncer de mama o risco estimado é de 28%, sendo 34% para portadoras com um familiar em primeiro grau com câncer de mama e 44% com um familiar em primeiro e segundo grau afetados (Cybulski et al. 2011). Alguns estudos tem apontado que o *CHEK2* é o gene mais comumente mutado em mulheres com câncer de mama, depois de *BRCA1* e *BRCA2* (Couch et al. 2017). A mutação c.1100delC em heterozigose no éxon 10 do gene *CHEK2* tem uma frequência de cerca de 0,7% nas populações do Norte e Oeste Europeu, e portadores apresentam um risco cumulativo de câncer de mama de 37% até os 70 anos (Weischer et al. 2008). Alguns estudos relataram um aumento do risco para outros tipos de tumores associados com mutações germinativas em *CHEK2*, como câncer colorretal, tireóide, próstata e câncer renal (Cybulski et al. 2004; Isinger et al. 2006).

O gene *ATM* (OMIM *607585) está localizado na região 11q22.3 e consiste em 66 éxons (Savitsky et al. 1995). Mutações germinativas em homozigose no gene *ATM* estão associadas à Ataxia-Telangiectasia (OMIM 208900) de herança autossômica recessiva, caracterizada por ataxia cerebelar progressiva, apraxia oculomotora, coreoatetose, telangiectasias na conjuntiva, imunodeficiência, sensibilidade à radiação ionizante e aumento do risco de neoplasias (Chun e Gatti 2004). Mutações germinativas em heterozigose no gene *ATM* estão associadas ao risco moderado para câncer de mama (Couch et al. 2017). Estima-se um risco relativo para portadores de 2,78 (95% IC= 2,22-3.62) em comparação com a população geral e um risco relativo de 4,9 (95% IC=1,90-12,9) em mulheres com idade inferior a 50 anos (Thompson et al. 2005b; Couch et al. 2017).

O gene *PALB2* (OMIM *610355) é um gene supressor tumoral localizado no braço curto do cromossomo 16 na posição 12.2, e sua proteína co-localiza-se com a proteína do gene *BRCA2*, interagindo com *BRCA1* e *BRCA2* na via de reparo do DNA (Xia et al. 2006). Mutações germinativas bialélicas em *PALB2* estão associadas à Anemia de Fanconi, de herança autossômica recessiva, caracterizada por anormalidades físicas (baixa estatura, pigmentação anormal da pele, malformações esqueléticas, microcefalia e anomalias geniturinárias e oftalmológicas), insuficiência da medula óssea e aumento do risco de neoplasias (leucemia mielóide aguda e tumores sólidos) (Reid et al. 2007). Portadores de mutações germinativas monoalélicas em *PALB2* apresentam um risco relativo de 2,3 (95% IC=1,4-3,9; $P=0,0025$) para desenvolver câncer de mama (Rahman et al. 2007). Sugere-se ainda que as neoplasias malignas da mama associados à *PALB2* apresentam um fenótipo tumoral mais agressivo, incluindo o imunofenótipo triplo-negativo (Heikkinen et al. 2009). Recentemente, mutações germinativas em *PALB2* foram associadas com a ocorrência de câncer de mama bilateral (Couch et al 2017).

O gene *PALB2* vem sendo, recentemente, relacionado à alta penetrância para câncer de mama (Yang et al. 2020). No entanto, em nosso estudo foi considerado pertencente ao grupo de penetrância moderada para câncer de mama.

Variantes patogênicas/provavelmente patogênicas em outros genes também vêm sendo associadas ao risco moderado para câncer de mama, como *BRIP1*, *BARD1*, *RAD51D*, *NBN* e *NFI* (Seal et al. 2006; Madanikia et al. 2012; Couch et al. 2017).

1.5 GENES DE BAIXA PENETRÂNCIA RELACIONADOS AO CÂNCER DE MAMA

Vários outros genes podem ser classificados como de baixa penetrância para câncer de mama, relacionados a um risco relativo ≥ 1 e ≤ 2 (Slavin et al. 2015). São genes que apresentam penetrância baixa ou incerta e as recomendações de rastreamento e manejo não estão bem estabelecidas, sendo baseadas em avaliações empíricas de risco e revisão de literatura, caso a caso.

Destacam-se como genes de baixa penetrância para câncer de mama, os seguintes genes: *BRIP1*, *BAP1*, *RAD51C*, *MUTYH*, *XRCC2*, *CDK4*, *CDKN2A*, entre outros.

Mutações patogênicas nos genes de reparo de DNA *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* e *EPCAM* estão associadas à Síndrome de Lynch, que se caracteriza pelo alto risco para câncer

colorretal ao longo da vida, além de câncer de endométrio, ovário, estômago, intestino delgado, trato hepatobiliar, trato urinário e tumores cerebrais (Lynch et al. 2006). Apesar disso, alguns estudos associaram esses genes a uma baixa penetrância para câncer de mama e um estudo realizado no Brasil em famílias com a Síndrome de Lynch, demonstrou que o câncer de mama foi o câncer extracolônico mais frequente em mulheres portadoras da Síndrome (da Silva et al. 2010; Win et al. 2012).

Tabela 5 – Genes de alta e moderada penetrância para câncer de mama com risco relativo estimado e diretrizes de manejo.

Gene	Risco Relativo para câncer de mama	Outros cânceres ou síndromes associadas	Rastreamento recomendado pelos <i>guidelines</i> (NCCN)
<i>ATM</i>	2 - 3	Sd Ataxia Telangiectasia em HZ; cólon e pâncreas	MMG anual e RM de mamas a partir de 40 anos
<i>BRCA1</i>	10	Ovário pâncreas, próstata	MMG e RM de mamas, recomendada SOB redutora de risco e discutir MBRR
<i>BRCA2</i>	10	Ovário, pâncreas, próstata, melanoma	RM de mamas, recomendada SOB redutora de risco e discutir MBRR
<i>CDH1</i>	5	Gástrico	RM de mamas, discutir MBRR, recomendada gastrectomia
<i>CHEK2</i>	2 - 3	Cólon, tireóide, pulmão	MMG anual e RM de mamas a partir dos 40 anos
<i>NBN</i>	2 - 3	Sd de Quebra de Nijmegen em HZ; Ovário	Rastreamento de acordo com história familiar
<i>NF1</i>	2 - 3	Sistema nervoso central, bainha do nervo periférico	MMG anual e RM de mamas a partir dos 30 anos
<i>PALB2</i>	3 - 5	Pâncreas, ovário	MMG anual e RM de mamas a partir dos 30 anos, discutir MBRR
<i>PTEN</i>	≥ 5	Tireóide, endométrio	MMG anual e RM de mamas a partir dos 30 anos, discutir MBRR
<i>STK11</i>	≥ 5	Pâncreas, tumores ovarianos estromais e dos cordões sexuais, cólon	MMG e RM de mamas a partir dos 30 anos
<i>TP53</i>	≥ 10	Sarcoma, leucemia, adrenocortical, cerebral	RM de mamas a partir dos 20 anos, discutir MBRR; RM de corpo inteiro e crânio, colonoscopia, hemograma completo e outros exames

Fonte: Adaptado de Kurian et al. (2016).

Legenda: Sd: Síndrome; HZ: homozigose; NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*; MMG: mamografia; RM: ressonância magnética; MBRR: mastectomia bilateral redutora de risco; SOB: salpingooforectomia bilateral.

1.6 PAINEL DE SEQUENCIAMENTO DE MÚLTIPLOS GENES

A implementação de novas tecnologias para a análise de DNA como o Sequenciamento de Nova Geração (*Next-Generation Sequencing* – NGS), vem permitindo a análise simultânea de múltiplos genes através dos painéis para diversas doenças genéticas. A técnica apresenta muitos benefícios, incluindo maior rapidez, eficiência, versatilidade e menor custo quando comparada ao sequenciamento de um único gene (Walsh et al. 2010; Pritchard et al. 2012; LaDuca et al. 2014).

Atualmente, esses painéis têm sido amplamente utilizados em Oncologia para análise de grupos de genes relacionados às SPCH. Existem diversos tipos de painéis multigenes, desde os fenótipos específicos para câncer familiar, como os relacionados ao câncer de mama, até painéis de amplo espectro abrangendo múltiplos fenótipos. Além de incluir genes de alta penetrância com utilidade clínica estabelecida, estes painéis podem englobar também genes de moderada e baixa penetrância, com dados limitados de significância clínica e risco para câncer, além de ausência de diretrizes de manejo estabelecidas (Hall et al. 2014; Rainville et al. 2014).

Não há critérios estabelecidos em relação às indicações clínicas dos painéis multigenes. Questões importantes como quantos e quais genes sequenciar, indicação clínica, benefícios e como realizar o aconselhamento genético, vem sendo amplamente discutidas (Kurian et al. 2014). Em geral, os painéis multigenes são indicados quando mais de um gene pode estar relacionado ao fenótipo, pois nesses casos o painel pode ser mais eficiente tanto em diagnóstico quanto em custo (Hall et al. 2014). Enquanto alguns fenótipos estão associados a um único gene, muitos estão associados a mais de um gene.

A indicação dos painéis também pode ser considerada para pacientes com teste negativo para uma determinada síndrome, cuja história pessoal e familiar é sugestiva de câncer hereditário (Hall et al. 2014; LaDuca et al. 2014).

Atualmente, foi descrita na literatura a Síndrome da Neoplasia Hereditária Multialélica (MINAS; do inglês, *multilocus inherited neoplasia alleles syndrome*), que caracteriza-se pela presença de duas ou mais variantes patogênicas/provavelmente patogênicas em genes relacionados à predisposição ao câncer herdadas no mesmo indivíduo, cujo diagnóstico tornou-se possível graças à tecnologia NSG, uma vez que permite a análise simultânea de múltiplos genes (Whitworth et al. 2016).

São muitos os desafios e implicações da indicação desses painéis na prática clínica. Os resultados encontrados podem ser por vezes complexos e de difícil interpretação. A alta

frequência de variantes de significado incerto encontradas; resultados incidentais (quando uma mutação patogênica é encontrada em um gene não relacionado ao fenótipo) e mutações patogênicas em genes de baixa e moderada penetrância dificultam o aconselhamento genético e o seguimento clínico do paciente e seus familiares (Hall et al. 2014; Rainville et al. 2014; Slavin et al. 2015).

A realização de estudos baseados em painel multigenes para câncer hereditário pode contribuir com informações para delineamento da relação genótipo-fenótipo, definição de risco absoluto e relativo de câncer, para classificação das variantes de significado incerto, uso mais efetivo dessa tecnologia e uma melhor indicação clínica, além de fornecer melhor compreensão sobre a contribuição dos genes de baixa, moderada e alta penetrância no câncer de mama hereditário.

1.7 VARIANTES DE SIGNIFICADO INCERTO

De acordo com a *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG), as variantes genéticas identificadas em doenças mendelianas são classificadas em cinco categorias, numeradas de 1 a 5, que são: (5) patogênica; (4) provavelmente patogênica; (3) significado clínico incerto; (2) provavelmente benigna e (1) benigna. Variantes que não se enquadram nos critérios correspondentes às categorias patogênica ou benigna; ou apresentam evidências conflitantes, são classificadas como de significado clínico incerto (Richards et al. 2015).

As variantes de significado incerto (VUS - *Variant of uncertain significance*) são alterações na sequência de nucleotídeos sem dados suficientes sobre seu impacto na função da proteína e, conseqüentemente, sem definição de sua importância clínica e cuja associação com o risco de doença é desconhecida.

Estudos realizados mostraram que uma grande proporção de painel multigenes para câncer hereditário, aproximadamente um terço, identifica uma VUS em um ou mais genes (Kurian et al. 2014; Tung et al. 2015).

Quanto maior o número de genes analisados, maior é a probabilidade de se encontrar variantes de significado desconhecido. Um estudo realizado com 2.158 pacientes com câncer de mama que realizaram um painel com 25 genes, apontou que VUS foram encontradas em 40% dos indivíduos; outro estudo semelhante realizado com 198 mulheres submetidas a um painel de 42 genes mostrou que VUS foram identificadas em 88% das participantes (Kurian et al. 2014; Tung et al. 2015).

A maioria dessas variantes será posteriormente reclassificada, como benigna ou patogênica. Vários métodos são utilizados para classificar uma VUS quanto à sua patogenicidade. O tipo de mutação (*nonsense*, *missense*, *frameshift*, deleções ou duplicações), a função principal do gene (supressor tumoral, oncogenes), a frequência populacional da variante, descrição na literatura médica e a presença de estudos funcionais devem ser considerados na análise de uma VUS (Goldgar et al. 2008; Li et al. 2017).

Estudos de análise da associação direta da VUS com o fenótipo podem ser usados para determinar uma razão de verossimilhança de associação da variante com a doença, sendo os mais comuns os estudos do tipo co-segregação; comparação da frequência do alelo entre casos e controles; associação de frequência de alelos com histórico pessoal ou familiar da doença; e co-ocorrência da doença com outras variantes genéticas (Goldgar et al. 2008).

A análise de co-segregação de uma variante genética com um determinado fenótipo em uma família é um dado importante para se avaliar a patogenicidade dessa variante, uma vez que trata-se de evidência de ligação do *locus* à doença em questão. Por outro lado, a não-segregação dessa variante com o fenótipo é considerada forte indício contra sua patogenicidade (Richards et al. 2015; Jarvik et al. 2016).

A avaliação do mecanismo de perda de heterozigose (LOH) na amostra tumoral também pode ser útil na classificação de variantes raras, uma vez que a perda somática do alelo selvagem é um mecanismo comum de inativação em tumores de pacientes portadores de uma mutação patogênica na linhagem germinativa (Knudson 1971; Osorio et al. 2002).

Várias ferramentas *in silico* também podem auxiliar na interpretação dessas variantes através da utilização de algoritmos, capazes de prever, por exemplo, se uma variante *missense* prejudica a função ou estrutura da proteína ou se há uma alteração do tipo *splicing*. Porém, não é recomendável que essas ferramentas sejam utilizadas como a única evidência do significado clínico de uma VUS. Em geral, estudos funcionais são necessários para avaliar a perda da função proteica (Li et al. 2017).

Um estudo realizado com mais de um milhão de indivíduos que realizaram teste genético para câncer hereditário, demonstrou que 7,7% das VUS identificadas foram reclassificadas e, destas, 91,2% foram rebaixadas para variantes benignas ou provavelmente benignas (tempo médio para reclassificação de 1,17 anos) e 8,7% foram reclassificadas para variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas (tempo médio de 1,86 anos) (Mersch et al. 2018).

As VUS não devem ser utilizadas na tomada de decisões clínicas e devem ser acompanhadas até sua reclassificação (Robson et al. 2015). Nesse contexto, o aconselhamento

genético pré e pós-teste faz-se fundamental para esses pacientes e seus familiares.

1.8 ACONSELHAMENTO GENÉTICO

O aconselhamento genético em Oncologia é o processo de identificar e aconselhar indivíduos em risco para o câncer hereditário. Tem como finalidade orientar os indivíduos em relação aos fatores genéticos, biológicos e ambientais associados ao câncer e/ou risco de doença, além de orientar sobre testes genéticos, câncer hereditário, rastreamento e prevenção do câncer (Trepanier et al. 2004).

Indivíduos com antecedentes pessoais ou familiares sugestivos de câncer hereditário devem ser encaminhados para aconselhamento genético. Na avaliação do paciente com suspeita de câncer hereditário, deve-se inicialmente realizar o levantamento da história pessoal e familiar detalhada através do heredograma com pelo menos três gerações, tanto do lado materno quanto paterno. Dados como etnia, ancestralidade, sítio primário, tipo histológico de câncer e idade de diagnóstico devem ser coletados, assim como comprovação dos tumores dos familiares através de exames anatomopatológicos, relatório médico e atestado de óbito. Quanto maior o número de familiares afetados e quanto menor a idade no momento do diagnóstico de câncer, maior é a probabilidade de que um componente genético de predisposição a câncer esteja presente na família (Trepanier et al. 2004).

Após a avaliação inicial, pacientes que apresentarem critérios clínicos para alguma síndrome tem indicação de realizar o teste genético para detecção de mutações germinativas em genes relacionados. De acordo com a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (*American Society of Clinical Oncology - ASCO*), os testes genéticos são recomendados quando há uma história pessoal ou familiar sugestiva de câncer hereditário, o teste pode ser adequadamente interpretado e os resultados auxiliam no diagnóstico ou influenciam o manejo clínico do paciente ou de seus familiares (American Society of Clinical Oncology 2003). Os pacientes candidatos ao exame molecular para diagnóstico devem receber o aconselhamento genético pré- e pós-teste.

O aconselhamento pré-teste é fundamental para esses pacientes e deve sempre incluir informações sobre o teste genético indicado, benefícios, limitações, resultados implicados, importância de um resultado positivo para o paciente e seus familiares, padrões de herança genética, riscos e tipos de câncer envolvidos, aspectos psicossociais, considerações econômicas, opções de rastreamento e prevenção do câncer (Trepanier et al. 2004).

Uma vez realizado o teste genético, o paciente deve receber o aconselhamento pós-

teste. Neste, serão discutidos o resultado do exame, seu significado, limitações e implicações para o paciente e sua família. Caso ocorra a identificação de uma mutação patogênica, o paciente deve ser orientado sobre os riscos de câncer associado à síndrome, o rastreamento indicado e medidas de prevenção. Os familiares devem ser convocados para orientações e realização do teste genético (Trepanier et al. 2004).

Com a implementação dos testes genéticos com avaliação simultânea de múltiplos genes relacionados a câncer hereditário na prática clínica, novas abordagens no aconselhamento genético serão necessárias. O resultado do teste pode ser verdadeiro-positivo (presença de uma mutação patogênica) verdadeiro-negativo (ausência de mutação patogênica em gene previamente identificado na família), indeterminado ou não-informativo (ausência de mutação patogênica, porém não se sabe o resultado dos familiares) e inconclusivo (presença de VUS) (NCCN 2021).

Frente à complexidade na interpretação dos resultados dos painéis multigenes devido à elevada frequência de variantes de significado incerto encontradas e à presença de mutações patogênicas em genes de moderada e baixa penetrância, é recomendado que o aconselhamento genético pós-teste seja realizado em centros especializados, uma vez que esses indivíduos necessitam de acompanhamento multidisciplinar em longo prazo.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando-se que cerca de 10% dos casos de câncer de mama são hereditários, ou seja, estão relacionados a mutações germinativas em genes de predisposição hereditária ao câncer, e frente a alta incidência de câncer de mama no Brasil, faz-se necessária a identificação dos indivíduos portadores das SPHC, visando a prevenção do câncer nestes indivíduos e seus familiares.

Os painéis NGS que avaliam simultaneamente múltiplos genes associados a um maior risco para câncer de mama, dentre outros, estão sendo cada vez mais utilizados na prática clínica para pacientes com suspeita de câncer de mama hereditário. No entanto, apesar da utilização desses painéis colaborar na identificação de uma susceptibilidade hereditária ao câncer para algumas famílias, existem desafios significativos na interpretação dos resultados e no aconselhamento genético, pois para muitos genes ainda não estão estabelecidas estimativas de risco para câncer e nem estratégias de manejo e redução de risco. Para que sejam estabelecidos evidências sobre os riscos e consensos no manejo desses pacientes, mais estudos são necessários.

Assim, o presente estudo pretende avaliar o impacto da utilização de um painel de múltiplos genes em uma amostra de pacientes com risco para câncer de mama hereditário, visando compreender o impacto dessa abordagem na prática clínica e contribuir com dados da população brasileira, já que poucos estudos sobre o assunto realizado no Brasil foram publicados até o momento.

Ademais, a pesquisa de mutações patogênicas em outros genes associados com risco de câncer de mama, além de *BRCA1* e *BRCA2*, pode trazer informações sobre a genética da população brasileira e contribuir para a mais adequada indicação de teste genético.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal do estudo é avaliar a contribuição do painel multigenes na detecção de mutações germinativas em pacientes com critérios clínicos para câncer de mama hereditário.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar análise através de um painel 94 genes da Plataforma Illumina para todas as pacientes incluídas no estudo, painel este que inclui além dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, outros 92 genes associados a câncer hereditário;
2. Descrever e correlacionar as diferentes variantes patogênicas/provavelmente patogênicas detectadas nos genes analisados com o subtipo de câncer de mama, fenótipo e história familiar de câncer das pacientes incluídas no estudo;
3. Avaliar a correlação genótipo-fenótipo dos genes com variantes patogênicas/provavelmente patogênicas identificadas;
4. Correlacionar a presença de variantes patogênicas/provavelmente patogênicas com o subtipo molecular de câncer de mama.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DE PACIENTES

Foi realizado um estudo retrospectivo e prospectivo no qual foram incluídas 321 pacientes não aparentadas atendidas no Departamento de Oncogenética do A.C.Camargo Cancer Center, no período de agosto de 2016 a maio de 2018, elegíveis pelos critérios de inclusão descritos abaixo:

1. Mulheres com diagnóstico atual ou prévio de carcinoma de mama, de qualquer tipo histológico (incluindo câncer de mama bilateral), com diagnóstico em qualquer idade que tiveram indicação de realizar teste genético para câncer de mama hereditário em uma consulta no Departamento de Oncogenética e receberam aconselhamento genético pré-teste.
2. Pacientes cujo teste genético foi realizado no Laboratório de Diagnóstico Genômico (LDG) / Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, entre agosto de 2016 e maio de 2018, e que consentirem em participar da pesquisa com assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Este projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP da Fundação Antônio Prudente - A.C.Camargo Cancer Center (Projeto de Pesquisa no. 2483/18), sendo aprovado em 30 de janeiro de 2018 (Anexo 1).

4.2 METODOLOGIA

Foram selecionadas 321 pacientes não aparentadas com diagnóstico de câncer de mama que, após avaliação no Departamento de Oncogenética do A.C.Camargo Cancer Center, apresentaram indicação de realizar teste genético para câncer de mama hereditário, sendo a maioria dessas pacientes com critérios clínicos da NCCN (Tabela 1) para SMOH, relacionada aos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Todas as pacientes realizaram teste genético no Laboratório de Diagnóstico Genômico (LDG) - Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center no período de Agosto de 2016 a Maio de 2018.

O LDG, nesse período, utilizava a metodologia de painel de 94 genes para todos os testes genéticos realizados, analisando-se somente os genes de interesse para cada paciente,

conforme solicitação do médico assistente. O painel de 94 genes é um painel comercial da empresa Illumina - *TruSight Cancer Target Genes* – que contém genes de alta, moderada e baixa penetrância não só para câncer de mama, como para outros tipos de câncer hereditário.

Os dados clínicos, demográficos, anatomopatológicos e história familiar de todas as pacientes do estudo foram obtidos através de revisão de prontuários e heredogramas. Foram coletadas informações sobre a idade atual e ao diagnóstico de todos os cânceres, ancestralidade, patologia tumoral, subtipo molecular do câncer de mama, história familiar de câncer com tipo de câncer e idade no diagnóstico dos familiares.

Para a coleta dos dados dos resultados de *BRCA1/2* e análise dos demais genes do painel, as pacientes selecionadas foram convidadas através de e-mail, telegrama ou contato telefônico para participação no estudo e assinatura do TCLE (Apêndice 1). Foram obtidos 182 Termos de Consentimento Livre e Esclarecido em três rodadas de convocação. Para utilização dos dados das 139 pacientes das quais não foi possível obtenção do TCLE, foi submetida uma emenda ao projeto solicitando a dispensa de aplicação de TCLE, aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição em 22 de junho de 2020.

Os procedimentos técnicos realizados nos testes genéticos do LDG foram realizados de acordo com procedimentos operacionais padrão estabelecidos no laboratório e estão descritos brevemente a seguir. O DNA genômico purificado foi obtido através de amostras de sangue periférico ou saliva coletadas para a realização do teste, sendo submetido à captura dos éxons dos genes alvo através de hibridização utilizando os kits comerciais *TruSight Cancer Sequencing Panel e TruSight Rapid Capture* (Illumina), seguindo as recomendações do fabricante. Este painel avalia as regiões codificadoras e regiões intrônicas que estão adjacentes aos éxons, correspondentes aos sítios de *splicing*, nos 94 genes avaliados. As bibliotecas de DNA alvo de cada paciente são identificadas com *barcodes* específicos (sequências únicas que permitem a identificação das amostras após sequenciamento), possibilitando o sequenciamento paralelo de várias amostras.

O sequenciamento de nova geração (NGS) foi realizado no equipamento NextSeq 500 System (Illumina). As sequências correspondentes aos genes solicitados no pedido médico de cada paciente foram comparadas com as respectivas sequências referência para a chamada de variantes utilizando ferramentas de bioinformática recomendadas pelo fabricante (Isaac Enrichment v3.0 e Illumina VariantStudio 2.2) e confirmadas visualmente por avaliação no programa CLC Genomics Workbench.

Para a análise dos demais genes, os arquivos VCFs (variant call format) gerados pelo programa Enrichment foram importados para o software VarSeq (Golden Helix) para

anotações de função, classificação e frequência em banco de dados públicos. As variantes identificadas foram inicialmente filtradas seguindo os seguintes critérios: qualidade >30; base variante presente em pelo menos 25% das leituras; ausência em bancos de dados populacionais (gnomAD, dbSNP, 1000genomes e Abraom [banco de dados de variantes de exomas da população brasileira: <http://abraom.ib.usp.br/>]) ou frequência do alelo mais raro (*minor allele frequency* - MAF) $\leq 0,01$.

A avaliação do painel incluiu a detecção de variantes pontuais de base única e pequenas deleções ou inserções nas regiões codificadoras e nos sítios de *splicing* (dois pares de bases das regiões intrônicas que estão adjacentes aos éxons) nos 94 genes. Não foram avaliadas alterações no número de cópias (CNV), exceto para os genes *BRCA1* e *BRCA2*, para os quais a análise de grandes deleções e duplicações foi realizada através da técnica MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*).

As variantes detectadas em cada gene foram comparadas com a sequência referência GRCh37/Hg19. Em seguida, as variantes foram anotadas quanto seu efeito na proteína: alterações de perda de função (LOF - *loss-of-function*), como variantes de perda de sentido, *indels* com mudança na matriz de leitura e mutações em sítios canônicos de *splice*; variantes *indels* sem mudança na matriz de leitura; variantes de troca de aminoácido (*missense*) e sinônimas. As variantes *missense* foram anotadas de acordo com a predição de patogenicidade por programas de predição *in silico* (SIFT, PolyPhen, MutationTaster, FATHMM). A descrição das variantes foi realizada com base na nomenclatura preconizada pelas diretrizes da *Human Genome Variation Society* (HGVS).

As variantes identificadas foram consultadas quanto à sua classificação em bancos de dados de variantes germinativas, entre setembro de 2019 a maio de 2020 (ClinVar, Varsome, IARC, INSIGHT, LOVD).

A classificação e interpretação final das variantes detectadas foram realizadas com base nas recomendações do ACMG (Richards et al. 2015). Esta recomendação prevê a classificação das variantes germinativas relacionadas a doenças mendelianas em cinco classes, de acordo com uma série de critérios, que são: patogênica, provavelmente patogênica, significado incerto, provavelmente benigna e benigna. O ACMG disponibiliza dois grupos de critérios para essa classificação: 1) um grupo para variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas, categorizados como muito forte (PVS1), forte (PS1–4), moderado (PM1–6) ou de suporte (PP1–5); e 2) outro para variantes benignas ou provavelmente benignas, categorizados como independente (BA1), forte (BS1–4) ou de suporte (BP1–6) (Richards et al. 2015).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As características clínicas, anatomopatológicas e familiares de todos os pacientes do estudo foram descritas utilizando-se estatísticas descritivas, incluindo medianas, médias e desvios-padrão para dados contínuos, com o intuito de evidenciar algum padrão no espectro de tumores ou outras características clínicas, anatomopatológicas ou familiares que divergem das identificadas nos pacientes *BRCA1* e *BRCA2* mutadas. Para dados categóricos, foram utilizadas as proporções com intervalo de confiança (IC) de 95% calculadas pelo método de Clopper-Pearson. As características demográficas, clínicas e patológicas foram comparadas pelo teste T para amostras independentes. Para comparação de duas variáveis categóricas, foram utilizados o teste Qui-Quadrado ou de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5% ($P < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas por meio do Software SPSS versão 25.

Para os resultados do painel 94 genes, foi considerado como resultado positivo a presença de uma ou mais variantes patogênicas/provavelmente patogênicas e resultado negativo a ausência de variantes patogênicas/provavelmente patogênicas nos genes analisados.

5 RESULTADOS

5.1 POPULAÇÃO ESTUDADA

A idade média ao diagnóstico do câncer de mama das 321 pacientes incluídas foi de 45,21 anos (variando entre 26 a 85 anos). A maioria das pacientes apresentou diagnóstico em idade menor ou igual a 45 anos (57%), 33% entre 46 e 60 anos e 10% acima dos 60 anos (Tabela 6). Apenas 1,2% da população do estudo tinha etnia Judia Ashkenazi.

O tipo histológico predominante foi o carcinoma ductal, encontrado em 82,6% das pacientes, seguido pelo carcinoma lobular (8,4%) (Tabela 6).

Em relação ao subtipo molecular, de acordo com a imunoexpressão dos receptores hormonais (estrógeno, progesterona) e do HER2, 48,3% das pacientes apresentaram tumor de mama com positividade para receptores hormonais associado a ausência de expressão da proteína HER2 (luminal) e 24,6% das pacientes apresentaram imunofenótipo triplo negativo (Tabela 6).

Além disso, observamos que 11,8% (n=38/321) das pacientes tiveram diagnóstico de um segundo tumor primário de mama, sendo que 9% apresentaram câncer de mama bilateral.

Quanto ao diagnóstico de outras neoplasias, excluindo-se câncer de mama, 12,1% (n=39/321) das mulheres incluídas no estudo tiveram diagnóstico de um outro câncer, e destas, 23% (n=9/39) tiveram diagnóstico de câncer de ovário.

Em relação à história familiar de câncer, 65,1% (n=209/321) das pacientes relataram apresentar um familiar em primeiro, segundo, ou terceiro grau com câncer de mama ou ovário e 76% delas (n=244/321) relataram familiares diagnosticados com qualquer tipo de câncer (exceto mama e ovário). Do total, apenas 6 pacientes (1,9%) não souberam relatar informações sobre a história familiar de câncer (Tabela 6).

Tabela 6 - Características Clínicas e Tumorais na população de estudo (n= 321).

Características do Estudo (N=321)	No.	%
Idade de diagnóstico, anos		
Média ± DP	45,21 ± 11,22	
Mediana	44	
Intervalo	26-85	
≤45	183	57,0
46-60	106	33,0
>60	32	10,0
Etnia Judia Ashkenazi		
Sim	4	1,2
Não	317	98,8
Subtipos de câncer de mama, status do receptor		
TNBC	79	24,6
RH positivo/HER2 negativo (Luminal)	155	48,3
RH negativo/HER2 positivo (Hiperexpressor HER2)	13	4,0
RH positivo/HER2 positivo (Luminal B HER2)	40	12,5
RH positivo/HER2 não avaliado	22	6,8
Desconhecido	12	3,7
Histologia		
Ductal (invasivo e <i>in situ</i>)	265	82,6
Lobular	27	8,4
Misto (ductal e lobular)	2	0,6
Outro	20	6,2
Desconhecido	7	2,2
Diagnóstico de 2º câncer de mama		
Sim	38	11,8
Não	283	88,2
Câncer de mama Bilateral		
Sim	29	9,0
Não	292	91,0
Diagnóstico de outra neoplasia maligna (exceto câncer de mama)		
Sim	39	12,1
Não	282	87,9
Familiar de 1º, 2º ou 3º grau com câncer de mama ou ovário		
Sim	209	65,1
Não	106	33,0
Desconhecido	6	1,9
Familiar de 1º, 2º ou 3º grau com qualquer tipo de câncer (exceto câncer de mama e ovário)		
Sim	244	76,0
Não	71	22,1
Desconhecido	6	1,9

Legenda: TNBC: Câncer de mama triplo negativo; RH: receptor hormonal; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2.

5.2 FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES PATOGÊNICAS ENCONTRADAS

Entre as 321 pacientes diagnosticadas com câncer de mama incluídas no estudo, 81 pacientes (25,2%) apresentaram variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas (VP/PP) em um ou mais dos 94 genes analisados. Variantes de significado incerto (VUS) foram identificadas em 77,6% (n=249/321) das pacientes (Figura 1).

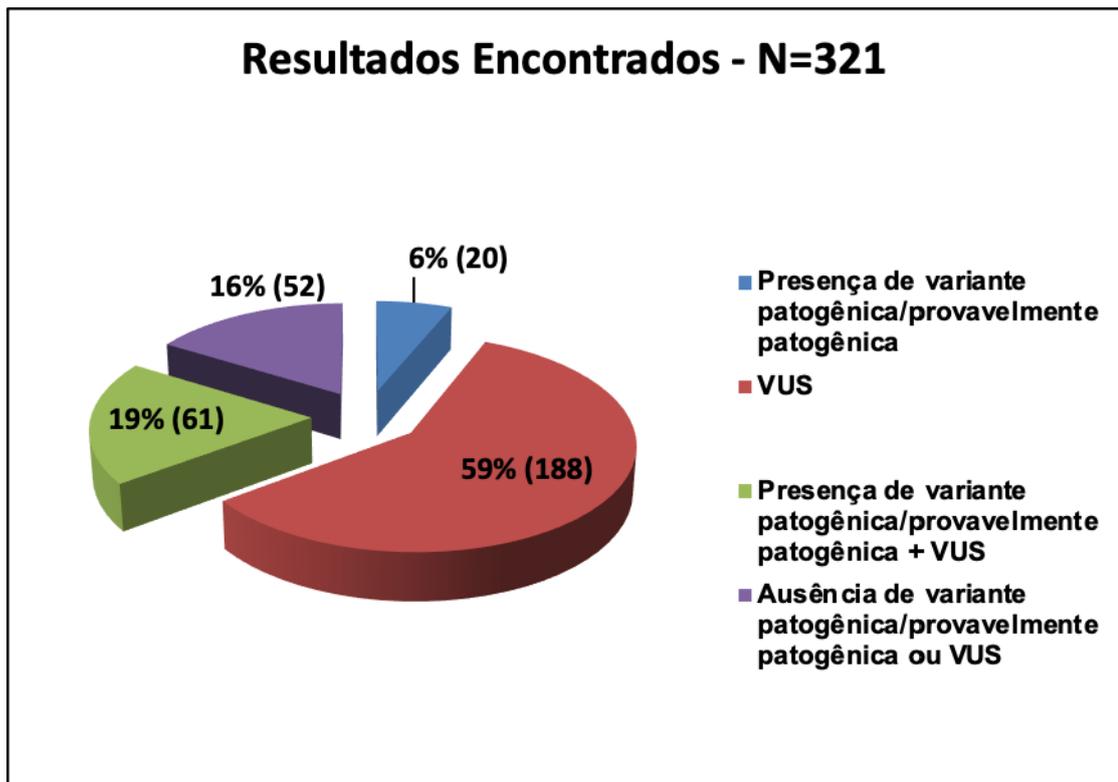


Figura 1 - Distribuição de resultados do painel de 94 genes nas 321 pacientes participantes do estudo.

Foram identificadas um total de 84 VP/PP em 24 genes do painel, distribuídas entre 81 pacientes. Das 81 pacientes com resultado positivo, 32 (n=32/81 - 39,5%) apresentaram VP/PP nos genes *BRCA1/2*, sendo 17 em *BRCA1* e 15 em *BRCA2* (Figura 2) (Tabelas 7 e 8). A idade média ao diagnóstico do câncer de mama nas pacientes portadoras de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foi de 43,46 anos (44,17 anos para *BRCA1* e 42,66 anos para *BRCA2*, respectivamente).

As 49 pacientes restantes (n=49/81 - 60,5%) apresentaram VP/PP em 22 outros genes do painel, sendo eles: *ATM*, *BLM*, *BRIP1*, *CHEK2*, *FANCA*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCI*, *FANCL*, *FANCM*, *FH*, *HNFI1A*, *MUTYH*, *PALB2*, *PHOX2B*, *PMS2*, *PRF1*, *RAD51C*,

RECQL4, *SBDS*, *SLX4* e *TP53*. Três pacientes (n=3/81 – 3,7%) apresentara duas VP/PP cada: uma com mutações nos gene *BRCA2* e *ATM*; outra com mutações em *BRCA2* e *CHEK2* e a terceira com mutações nos genes *BRCA2* e *TP53*. Essas pacientes foram diagnosticadas com MINAS.

Quanto ao tipo de mutação identificada, a maioria era do tipo *frameshift* correspondendo a 39,3% do total (n=33/84), seguida pelas variantes *nonsense* e *missense*, com percentual de 21,4% (n=18/84) cada.

Do total de mutações detectadas, 42,9% (n=36/84) foram identificadas em genes de alta penetrância para câncer de mama (*BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*). Não foram detectadas mutações nos genes *CDH1*, *STK11* e *PTEN*, também considerados de alta penetrância para câncer de mama.

Além disso, foram identificadas 18 variantes patogênicas/provavelmente patogênicas (n=18/84 - 21,4%) em genes de moderada penetrância relacionados ao câncer de mama, sendo *ATM* (n=8/84 - 9,5%), *PALB2* (n=4/84 - 4,8%) e *CHEK2* (n=6/84 - 7,1%). O restante das 30 mutações patogênicas/provavelmente patogênicas (n=30/84 - 35,7%) foram identificadas em genes considerados de baixa penetrância para câncer de mama e foram considerados como achados incidentais uma vez que não apresentaram correlação genótipo-fenótipo (Tabelas 7 e 8).

A análise do painel 94 genes contribuiu para identificar VP/PP em outros genes além de *BRCA1/2* em 52 pacientes, aumentando a positividade do teste genético de 9,9% (n=32/321) para 25,2% (n=81/321), um aumento absoluto de 15,3%.

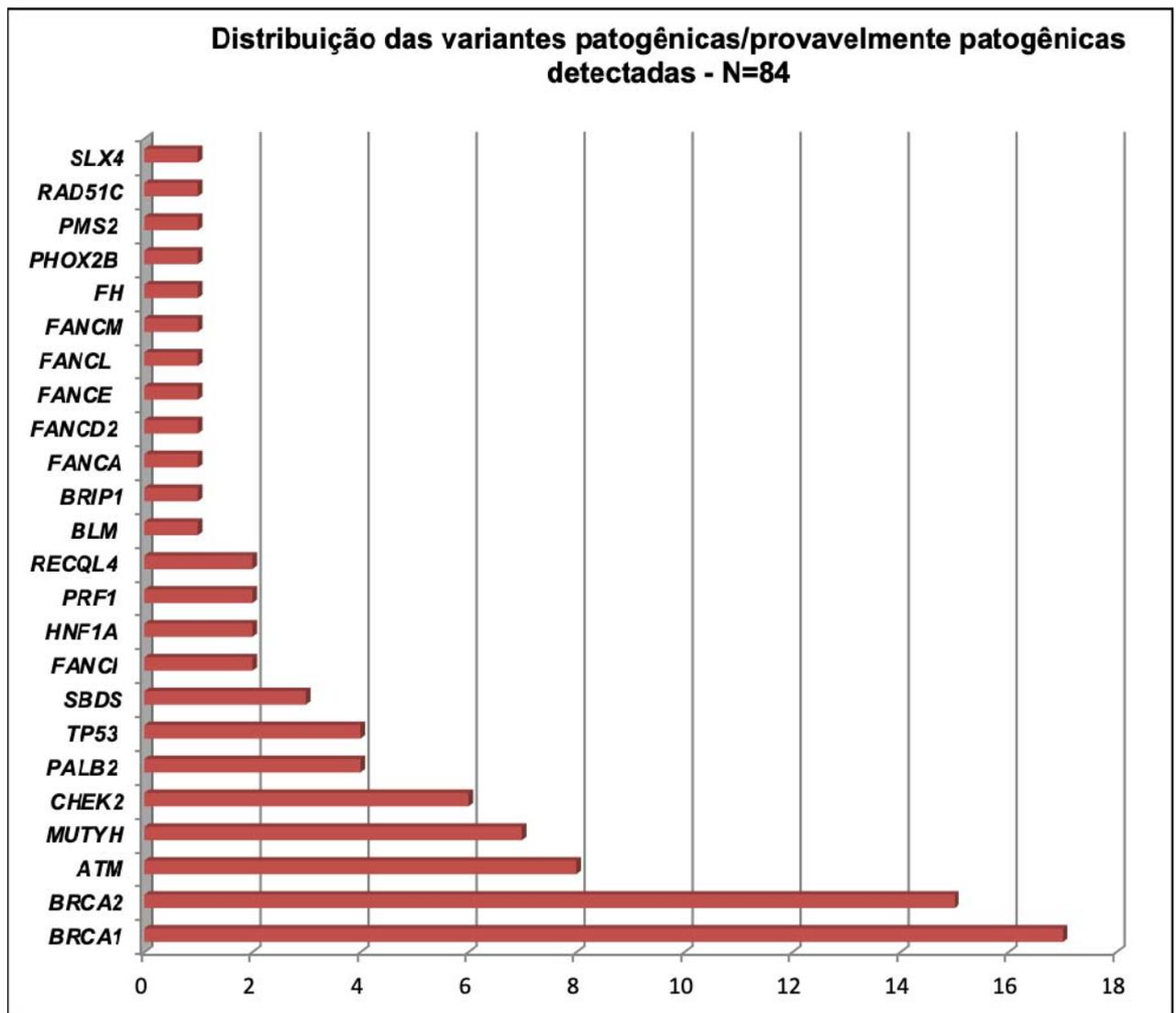


Figura 2 - Distribuição das 84 mutações germinativas de acordo com o gene, encontradas em 81 das 321 pacientes que realizaram o painel de 94 genes.

Tabela 7 - Mutações germinativas patogênicas/provavelmente patogênicas identificadas nos 94 genes do painel realizado nas 321 pacientes incluídas no estudo.

Gene	No.	%	IC 95%
Pacientes sem VP/PP	240	74,8	
Pacientes com VP/PP	81	25,2	
Total de mutações germinativas	84		
Genes de alto risco para câncer de mama	36	42,9	
<i>BRCA1</i>	17	20,2	12,3 - 30,4
<i>BRCA2</i>	15	17,9	10,4 - 27,7
<i>TP53</i>	4	4,8	1,3 - 11,7
Genes de risco moderado para câncer de mama	18	21,4	
<i>ATM</i>	8	9,5	4,2 - 17,9
<i>PALB2</i>	4	4,8	1,3 - 11,7
<i>CHEK2</i>	6	7,1	2,7 - 14,9
Genes de baixo risco para câncer de mama	30	35,7	
<i>MUTYH</i> (monoalélica)	7	8,3	3,4 - 16,4
<i>SBDS</i>	3	3,6	0,7 - 10,1
<i>FANCI</i>	2	2,4	0,3 - 8,3
<i>HNFI1A</i>	2	2,4	0,3 - 8,3
<i>PRF1</i>	2	2,4	0,3 - 8,3
<i>RECQL4</i>	2	2,4	0,3 - 8,3
<i>BLM</i>	1	1,2	0,00 - 6,5
<i>FANCA</i>	1	1,2	0,00 - 6,5
<i>FANCD2</i>	1	1,2	0,00 - 6,5
<i>FANCE</i>	1	1,2	0,00 - 6,5
<i>FANCL</i>	1	1,2	0,00 - 6,5
<i>FANCM</i>	1	1,2	0,00 - 6,5
<i>FH</i>	1	1,2	0,00 - 6,5
<i>PHOX2B</i>	1	1,2	0,00 - 6,5
<i>PMS2</i>	1	1,2	0,00 - 6,5
<i>RAD51C</i>	1	1,2	0,00 - 6,5
<i>SLX4</i>	1	1,2	0,00 - 6,5
<i>BRIP1</i>	1	1,2	0,00 - 6,5

Legenda: VP/PP: variante patogênica/provavelmente patogênica.

Tabela 8 – Descrição das 84 variantes patogênicas/provavelmente patogênicas encontradas em 81 das pacientes incluídas no estudo.

ID	Gene	Chr:Pos	Tipo	Nomenclatura HGVS	dbSNP	MAF (gnomAD)	Classificação (Clinvar)	Classificação ACMG
P017	ATM	11:108196153	Frameshift	c.6691_6692insCTTTT, (p.Leu2231Serfs*6)	ND	ND	ND	Provavelmente patogênica
P047	ATM	11: 108196143	Missense	c.6679C>T, (p.Arg2227Cys)	rs564652222	ND	Patogênica	
P062	ATM	11: 108138057	Nonsense	c.2626C>T, (p.Gln876Ter)	ND	ND	ND	Provavelmente patogênica
P087	ATM	11: 108155009	Frameshift	c.3802delG,(p.Val1268Terfs)	rs587779834	ND	Patogênica	
P134	ATM	11: 108203613	Nonsense	c.7913G>A, (p.Trp2638Ter)	rs377349459	0.000017	Patogênica	
P233	ATM	11: 108203613	Nonsense	c.7913G>A, (p.Trp2638Ter)	rs377349459	0.000017	Patogênica	
P185	ATM	11: 108175549	Nonsense	c.5644C>T, (p.Arg1882Ter)	rs786204433	ND	Patogênica	
P211	ATM	11:108192104	Nonsense	c.6529C>T, (p.Gln2177Ter)	rs766706861	0.0000039	ND	Provavelmente patogênica
P044	BLM	15: 91310153	Frameshift	c.2207_2212delinsTAGATTC, (p.Tyr736fs)	rs113993962	0.00017	Patogênica	
P009	BRCA1	17: 41251790	Splice Donor	c.547+2T>A	rs80358047	ND	Patogênica	
P012	BRCA1	17: 41244068 - 41244071	Frameshift	c.3477_3480delAAAG, (p.Ile1159Metfs)	rs80357781	ND	Patogênica	
P018	BRCA1	17: 41256984	Intrônica	c.213-11T>G, IVS5-11T>G	rs80358061	0.000011	Patogênica	
P065	BRCA1	17: 41219623	Splice Donor	c.5074+2T>C, IVS17+2T>C	rs80358089	ND	Patogênica	
P082	BRCA1	17: 41246532	Frameshift	c.1016dupA (p.Val340Glyfs*6)	rs80357569	ND	Patogênica	
P123	BRCA1	17: 41199683	Nonsense	c.5444G>A, (p.Trp1815Ter)	rs80356962	ND	Patogênica	
P131	BRCA1	17: 41219623	Splice Donor	c.5074+2T>C, IVS17+2T>C	rs80358089	ND	Patogênica	
P132	BRCA1	17: 41209082	Frameshift	c.5266dupC, (p.Gln1756Profs*74)	rs80357906	ND	Patogênica	
P145	BRCA1	17: 41215889	Splice Donor	c.5152+2T>C	rs886040914	ND	Patogênica	
P154	BRCA1	17: 41243513	Frameshift	c.4035delA, (p.Glu1346Lysfs*20)	rs80357711	ND	Patogênica	
P157	BRCA1	17: 41209082	Frameshift	c.5266dupC, (p.Gln1756Profs*74)	rs80357906	ND	Patogênica	
P200	BRCA1	17: 41209082	Frameshift	c.5266dupC, (p.Gln1756Profs*74)	rs80357906	ND	Patogênica	
P248	BRCA1	17: 41209082	Frameshift	c.5266dupC, (p.Gln1756Profs*74)	rs80357906	ND	Patogênica	
P228	BRCA1	17: 41203112	Frameshift	c.5300delG, p.(Cys1767Phefs*26)	ND	ND	ND	Provavelmente patogênica
P229	BRCA1	17: 41203112	Frameshift	c.5300delG, p.(Cys1767Phefs*26)	ND	ND	ND	Provavelmente patogênica
P289	BRCA1	17: 41245861	Nonsense	c.1687C>T (p.Gln563Ter)	rs80356898	0.00004	Patogênica	
P314	BRCA1	17: 41246251	Frameshift	c.1297delG, (p.Ala433Profs)	rs80357794	ND	Patogênica	
P002	BRCA2	13: 32912236 - 32912239	Frameshift	c.3744_3747delTGAG, (p.Ser1248Argfs*10)	rs80359403	ND	Patogênica	

Cont/Tabela 8

ID	Gene	Chr:Pos	Tipo	Nomenclatura HGVS	dbSNP	MAF (gnomAD)	Classificação (Clinvar)	Classificação ACMG
P013	BRCA2	13:32914109 - 32914113	Frameshift	c.5617_5621delGTAAT, p.(Val1873*)	ND	ND	ND	Provavelmente patogênica
P052	BRCA2	13: 32914942	Frameshift	c.6450dupA, (p.Val2151Serfs*25)	rs80359595	ND	Patogênica	
P090	BRCA2	13: 32911300 - 32911303	Frameshift	c.2808_2811del, (p.Ala938Profs*21)	rs80359351	0.00002	Patogênica	
P109	BRCA2	13:32953937	Missense	c.9004G>A, (p.Glu3002Lys)	rs80359152	ND	Patogênica	
P130	BRCA2		Deleção	deleção éxons 1 e 2	ND	ND	ND	Provavelmente patogênica
P136	BRCA2	13: 32890599	Missense	c.2T>G, (p.Met1Arg)	rs80358547	0.00001	Patogênica	
P160	BRCA2	13:32907421	Frameshift	c.1813dupA, (p.Ile605Asnfs*11)	rs80359306	ND	Patogênica	
P211	BRCA2	13: 32893302 - 32893303	RNA splicing	c.156_157insAlu	ND	ND	Patogênica	
P238	BRCA2	13: 32911300 - 32911303	Frameshift	c.2808_2811del, (p.Ala938Profs)	rs80359351	0.00002	Patogênica	
P245	BRCA2	13: 32900635	Splice Acceptor	c.517-1G>A, IVS6-1G>A	rs81002849	ND	Patogênica	
P250	BRCA2	13: 32929114	Nonsense	c.7124T>G, (p.Leu2375Ter)	rs886040687	ND	Patogênica	
P275	BRCA2	13: 32915148	Nonsense	c.6656C>G, (p.Ser2219Ter)	rs80358893	ND	Patogênica	
P309	BRCA2	13: 32972521	Frameshift	c.9871delT, (p.Ser3291Leufs)	rs886040854	ND	Patogênica	
P319	BRCA2	13: 32914174	Nonsense	c.5682C>G, (p.Tyr1894Ter)	rs41293497	ND	Patogênica	
P107	BRIP1	17: 59793412	Nonsense	c.2392C>T, (p.Arg798Ter)	rs137852986	0.00015	Conflitante	Patogênica
P003	CHEK2	22: 29091857	Frameshift	c.1100delC, (p.Thr367Metfs)	rs555607708	0.00182	Conflitante	Patogênica
P004	CHEK2	22: 29121326	Missense	c.349A>G, (p.Arg117Gly)	rs28909982	0.00011	Patogênica	
P033	CHEK2	22: 29121326	Missense	c.349A>G, (p.Arg117Gly)	rs28909982	0.00011	Patogênica	
P048	CHEK2	22: 29121058	Missense	c.499G>A, (p.Gly167Arg)	rs72552322	0.000023	Conflitante	Provavelmente patogênica
P105	CHEK2	22: 29091857	Frameshift	c.1100delC, (p.Thr367Metfs)	rs555607708	0.00182	Conflitante	Patogênica
P013	CHEK2	22:29121087	Missense	c.470T>C, (p.Ile157Thr)	rs17879961	0.0049	Conflitante	Provavelmente patogênica
P261	FANCA	16:89862330	Frameshift	c.983_986TCAC, (p.His330Alafs*4)	rs772359099	0.000042	Patogênica	
P076	FANCD2	3:10133904	Nonsense	c.3817C>T, (p.Arg1273Ter)	rs745930696	0.000015	ND	Provavelmente patogênica
P208	FANCE	6:35423630	Nonsense	c.355C>T, (p.Gln119Ter)	rs121434505	0.000011	ND	Provavelmente patogênica
P096	FANCI	15: 89849381	Frameshift	c.3493delG, (p.Asp1165Thrfs)	rs1060501884	ND	Patogênica	

Cont/Tabela 8

ID	Gene	Chr:Pos	Tipo	Nomenclatura HGVS	dbSNP	MAF (gnomAD)	Classificação (Clinvar)	Classificação ACMG
P264	FANCI	15:89828432	Nonsense	c.1804C>T, (p.Arg602Ter)	rs1432325198	0.000010	ND	Provavelmente patogênica
P030	FANCL	2:58388668	Inframe	c.1007_1009delTAT, (p.Ile336_Cys337delinsSer)	rs747253294	ND	Conflitante	Provavelmente patogênica
P043	FANCM	14:45618145 - 45618161	Frameshift	c.865_881delCTTATTGTTCCGCTTGG, (p.Leu289*)	ND	ND	ND	Provavelmente patogênica
P042	FH	1:241661228	Inframe	c.1431_1433dupAAA, (p.Lys477dup)	rs367543046	0.0010	Conflitante	Provavelmente patogênica
P080	HNF1A	12:121432118	Frameshift	c.872dupC, (p.Gly292Argfs*25)	rs587776825	ND	Patogênica	
P296	HNF1A	12:121432118	Frameshift	c.872dupC, (p.Gly292Argfs*25)	rs587776825	ND	Patogênica	
P071	MUTYH	1:45798475	Missense	c.536A>G, (p.Tyr179Cys)	rs34612342	0.0015	Patogênica	
P192	MUTYH	1:45798475	Missense	c.536A>G, (p.Tyr179Cys)	rs34612342	0.0015	Patogênica	
P155	MUTYH	1:45797228	Missense	c.1187G>A, (p.Gly396Asp)	rs36053993	0.003	Patogênica	
P203	MUTYH	1:45797228	Missense	c.1187G>A, (p.Gly396Asp)	rs36053993	0.003	Patogênica	
P285	MUTYH	1:45797228	Missense	c.1187G>A, (p.Gly396Asp)	rs36053993	0.003	Patogênica	
P058	MUTYH	1:45797760	Splice Acceptor	c.934-2A>G	rs77542170	0.0011	Conflitante	Provavelmente patogênica
P147	MUTYH	1:45797760	Splice Acceptor	c.934-2A>G	rs77542170	0.0011	Conflitante	Provavelmente patogênica
P023	PALB2	16:23641218	Nonsense	c.2257C>T, (p.Arg753Ter)	rs180177110	0.000023	Patogênica	
P254	PALB2	16:23649427	Frameshift	c.72delG, (p.Arg26Glyfs)	rs180177142	ND	Patogênica	
P266	PALB2	16:23637594	Nonsense	c.2711G>A, (p.Trp904Ter)	rs1060502726	ND	Patogênica	
P304	PALB2	16:23646627	Nonsense	c.1240C>T, (p.Arg414Ter)	rs180177100	0.0000079	Patogênica	
P036	PHOX2B	4:41748030	Frameshift	c.739delG, (p.Ala247Profs*62)	ND	ND	ND	Provavelmente patogênica
P284	PMS2	7:6045549	Missense	c.137G>T, (p.Ser46Ile)	rs121434629	0.00017	Provavelmente patogênica	
P001	PRF1	10:72358804	Missense	c.673C>T; (p.Arg225Trp)	rs28933973	0.000012	Patogênica	
P166	PRF1	10:72358189	Frameshift	c.1288dupG, (p.Asp430Glyfs*28)	rs1226526104	ND	ND	Provavelmente patogênica
P081	RAD51C	17:56798156	Frameshift	c.890_899del, (p.Leu297Hisfs*2)	rs1555602141	ND	Patogênica	
P056	RECQL4	8:145741776	Nonsense	c.727C>T, (p.Gln243Ter)	rs1345625725	0.000031	ND	Provavelmente patogênica

Cont/Tabela 8

ID	Gene	Chr:Pos	Tipo	Nomenclatura HGVS	dbSNP	MAF (gnomAD)	Classificação (Clinvar)	Classificação ACMG
P313	RECQL4	8:145738437	Frameshift	c.2547_2548delGT, (p.Phe850Profs*33)	rs778141083	0.000010	Patogênica	
P069	SBDS	7:66459197	Splice Donor	c.258+2T>C	rs113993993	0.0038	Patogênica	
P112	SBDS	7:66459197	Splice Donor	c.258+2T>C	rs113993993	0.0038	Patogênica	
P283	SBDS	7:66459197	Splice Donor	c.258+2T>C	rs113993993	0.0038	Patogênica	
P230	SLX4	16:36333330	Frameshift	c.4921dupG, (p.Val1641Glyfs*15)	rs770425994	0.000027	ND	Provavelmente patogênica
P097	TP53	17: 7574017	Missense	c.1010G>A, (p.Arg337His)	rs121912664	0.00001	Patogênica	
P160	TP53	17: 7574017	Missense	c.1010G>A, (p.Arg337His)	rs121912664	0.00001	Patogênica	
P277	TP53	17: 7574017	Missense	c.1010G>A, (p.Arg337His)	rs121912664	0.00001	Patogênica	
P256	TP53	17:7577121	Missense	c.817C>T, (p.Arg273Cys)	rs121913343	0.00001	Patogênica	

Legenda: Chr:Pos: Posição cromossômica; HGVS: Human Genome Variation Society; dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism database; MAF: Minor allele frequency; ExAC: Exome Aggregation Consortium; ND: não descrita; ACMG: American College of Medical Genetics and Genomics.

5.3 PREDITORES DE MUTAÇÕES PATOGÊNICAS

Foram analisados alguns preditores clínicos, anatomopatológicos e familiares quanto à significância em relação à presença de mutações patogênicas/provavelmente patogênicas nos 24 genes identificados. Os preditores avaliados foram: idade, etnia, histologia do tumor de mama, *status* do receptor hormonal, câncer de mama bilateral, histórico pessoal de outras neoplasias malignas e história familiar de câncer (Tabela 9).

5.3.1 Idade

Para a análise, as pacientes foram divididas em três grupos conforme idade ao diagnóstico do câncer de mama, sendo ≤ 45 anos, entre 46-60 e acima de 60 anos. Foram avaliadas também a média e mediana.

Foram encontradas as frequências de 58%, 38,3% e 3,7% para mulheres com mutações e diagnóstico de câncer de mama aos ≤ 45 anos, 46-60 e acima de 60 anos, respectivamente. No teste do Qui-quadrado de Person foi encontrado um valor de $P=0,07$, próximo a significância estatística entre menor idade de diagnóstico do câncer de mama e presença de mutação patogênica. Na Tabela 9 se observa uma maior frequência de mutações patogênicas em mulheres diagnosticadas com câncer de mama antes dos 45 anos.

5.3.2 Etnia

Foi avaliada a relação entre etnia Judia Ashkenazi e presença de mutação nos genes avaliados. Apesar da frequência de pacientes com etnia Judia ter sido baixa na população estudada, foi possível observar diferença significativa entre os dois grupos avaliados, com 75% (3/4) contra 25% (78/239) de mulheres portadoras de mutação que declararam ou não etnia Judia Ashkenazi, respectivamente (Tabela 9). Nas três pacientes com etnia Judia Ashkenazi, foram identificadas um total de três VP/PP nos seguintes genes: *BLM*, *BRCA1* (mutação fundadora c.5266dupC ou c.5385insC) e *CHEK2*.

5.3.3 Histologia

O tipo histológico predominante nos grupos de pacientes com e sem mutação foi o ductal, com frequência encontrada de 82,7% e 82,5% respectivamente. As frequências encontradas dos outros tipos histológicos (Lobular, Ductal + Lobular e outros) foi semelhante nos dois grupos. Não houve significância estatística entre o tipo histológico e presença de mutação patogênica/provavelmente patogênica na população estudada (Tabela 9).

5.3.4 Status do receptor hormonal

No grupo das pacientes sem mutação, o *status* do receptor hormonal predominante foi o luminal (positividade para expressão de estrogênio, progesterona e ausência de amplificação do HER2), com frequência encontrada de 52,5%, e no grupo das pacientes mutadas a frequência de 35,8%, maior que o percentual de 25% detectado na coorte completa. O valor de *P* encontrado foi 0,064, que, embora não tenha demonstrado significância estatística entre o receptor hormonal e a presença de mutação patogênica/provavelmente patogênica, pode haver uma associação (Tabela 9).

5.3.5 Câncer de mama bilateral

Também não foi encontrada significância estatística entre diagnóstico de câncer de mama bilateral e presença de mutação patogênica ($P=0,15$), sendo que 13,6% das pacientes com mutação tiveram diagnóstico de câncer de mama bilateral, contra 7,5% das pacientes sem mutação.

5.3.6 Diagnóstico de outra neoplasia maligna

A frequência de pacientes em ambos os grupos com diagnóstico de outra neoplasia maligna (exceto outro câncer de mama) foi bem próxima, sendo encontrado valor de $P=0,15$; demonstrando que não houve significância estatística deste preditor analisado.

5.3.7 História familiar de câncer

Não foi observada significância estatística entre história familiar positiva para câncer e presença de mutação patogênica. Foi analisada a presença de familiar em 1º, 2º ou 3º grau com câncer de mama ou ovário e com outros tipos de neoplasia. Os valores de *P* encontrados foram 0,5 e 0,9; respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9 - Preditores clínicos, anatomopatológicos e familiares analisados quanto à significância em relação a presença de variante patogênica/provavelmente patogênica.

Variável	Sem VP/PP		Com VP/PP		Valor de P
	No.	%	No.	%	
Idade ao diagnóstico (anos)					
≤45	136	56,7%	47	58,0%	0,07
46-60	75	31,3%	31	38,3%	
>60	29	12,1%	3	3,7%	
Etnia Judia Ashkenazi					
Sim	1	0,4%	3	3,7%	0,05
Não	239	99,6%	78	96,3%	
Subtipos de câncer de mama, status do receptor					
TNBC	54	22,5%	25	30,9%	0,06
RH positivo/HER2 negativo (Luminal)	126	52,5%	29	35,8%	
RH negativo/HER2 positivo (Hiperexpressor Her2)	9	3,8%	4	4,9%	
RH positivo/HER2 positivo (Luminal B HER2)	24	10,0%	16	19,8%	
RH positivo/HER2 não avaliado	18	7,5%	4	4,9%	
Desconhecido	9	3,8%	3	3,7%	
Histologia					
Ductal	198	82,5%	67	82,7%	0,75
Lobular	19	7,9%	8	9,9%	
Ductal e lobular	1	0,4%	1	1,2%	
Outro	16	6,7%	4	4,9%	
Desconhecido	6	2,5%	1	1,2%	
Câncer de mama Bilateral					
Sim	18	7,5%	11	13,6%	0,15
Não	222	92,5%	70	86,4%	
Diagnóstico de outra neoplasia maligna (exceto câncer de mama)					
Sim	25	10,4%	14	17,3%	0,15
Não	215	89,6%	67	82,7%	
Familiar de 1º, 2º ou 3º grau com câncer de mama ou ovário					
Sim	155	64,6%	54	66,7%	0,5
Não	79	32,9%	27	33,3%	
Desconhecido	6	2,5%	0	0%	
Familiar de 1º, 2º ou 3º grau com qualquer tipo de câncer (exceto câncer de mama e ovário)					
Sim	183	76,3%	61	75,3%	0,9
Não	52	21,7%	19	23,5%	
Desconhecido	5	2,1%	1	1,20%	

Legenda: VP/PP: variante patogênica/provavelmente patogênica; TNBC: Câncer de mama triplo negativo; RH: receptor hormonal; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2.

5.4 PREDITORES DE MUTAÇÕES PATOGÊNICAS, EXCLUINDO-SE OS GENES *BRCA1* E *BRCA2*

Foram analisados os mesmos preditores clínicos, anatomopatológicos e familiares quanto à significância em relação à presença de mutação patogênica nos demais genes, excluindo-se *BRCA1* e *BRCA2*, levando-se em consideração os 22 outros genes do painel em que foram identificadas VP/PP, sendo eles: *ATM*, *BLM*, *BRIP1*, *CHEK2*, *FANCA*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCI*, *FANCL*, *FANCM*, *FH*, *HNFI1A*, *MUTYH*, *PALB2*, *PHOX2B*, *PMS2*, *PRF1*, *RAD51C*, *RECQL4*, *SBDS*, *SLX4* e *TP53*.

Os preditores avaliados foram: idade, etnia, histologia do tumor de mama, *status* do receptor hormonal, câncer de mama bilateral, histórico pessoal de outras neoplasias malignas e história familiar de câncer. Para essa análise foram consideradas as três pacientes portadoras de uma segunda mutação patogênica em outro gene do painel, além dos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Não houve significância estatística para nenhum preditor analisado, no entanto, a etnia Judia Ashkenazi apresentou um valor próximo à significância estatística ($P=0,08$) (Tabela 10).

Tabela 10 - Preditores clínicos, anatomopatológicos e familiares analisados quanto à significância em relação à presença de variante patogênica/provavelmente patogênica, excluindo-se os genes *BRCA1* e *BRCA2*

Variável	Sem VP/PP		Com VP/PP		Valor de P
	No.	%	No.	%	
Idade ao diagnóstico (anos)					
≤45	136	56,7%	29	55,8%	0,32
46-60	75	31,3%	20	38,5%	
>60	29	12,1%	3	5,8%	
Etnia Judia Ashkenazi					
Sim	1	0,4%	2	3,8%	0,08
Não	239	99,6%	50	96,2%	
Subtipos de câncer de mama, status do receptor					
TNBC	54	22,5%	13	25,0%	0,1
RH positivo/HER2 negativo (Luminal)	126	52,5%	20	38,5%	
RH negativo/HER2 positivo (Hiperexpressor HER2)	9	3,8%	3	5,8%	
RH positivo/HER2 positivo (Luminal B HER2)	24	10,0%	13	25,0%	
RH positivo/HER2 não avaliado	18	7,5%	2	3,8%	
Desconhecido	9	3,8%	1	1,9%	
Histologia					
Ductal	198	82,5%	43	82,7%	0,2
Lobular	19	7,9%	7	13,5%	
Ductal e lobular	1	0,4%	1	1,9%	
Outro	16	6,7%	1	1,9%	
Desconhecido	6	2,5%	0	0,0%	
Câncer de mama Bilateral					
Sim	18	7,5%	4	7,7%	1,0
Não	222	92,5%	48	92,3%	
Diagnóstico de outra neoplasia maligna (exceto câncer de mama)					
Sim	25	10,4%	7	13,5%	0,69
Não	215	89,6%	45	86,5%	
Familiar de 1°, 2° ou 3° grau com câncer de mama ou ovário					
Sim	155	64,6%	34	65,4%	0,76
Não	79	32,9%	18	34,6%	
Desconhecido	6	2,5%	0	0%	
Familiar de 1°, 2° ou 3° grau com qualquer tipo de câncer (exceto câncer de mama e ovário)					
Sim	183	76,3%	42	80,8%	0,82
Não	52	21,7%	9	17,3%	
Desconhecido	5	2,1%	1	1,92%	

Legenda: VP/PP: variante patogênica/provavelmente patogênica; TNBC: Câncer de mama triplo negativo; RH: receptor hormonal; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2.

5.5 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

A maioria das pacientes incluídas no estudo tinha critérios clínicos para SMOH, relacionada aos genes *BRCA1* e *BRCA2*. No entanto, como foram detectados mutações patogênicas em outros genes do painel realizado, foram avaliadas as características clínicas e história familiar das pacientes portadoras de VP/PP com intuito de correlacionar os genótipos encontrados com o fenótipo de câncer nessas pacientes e seus familiares. Apenas uma das pacientes com resultado positivo (n=1/81 – 1,2%) não soube referir informações sobre a história familiar.

Nessa correlação, foram avaliadas apenas pacientes com uma VP/PP detectada. As pacientes com mais de duas VP/PP detectadas, foram descritas separadamente.

5.5.1 Gene *ATM*

O gene *ATM* está associado à Ataxia-Telangiectasia de herança autossômica recessiva (OMIM: 208900) e à predisposição hereditária ao câncer de mama, de herança autossômica dominante (OMIM: 114480). Foram detectadas variantes VP/PP no gene *ATM* em heterozigose em 7 pacientes. A idade média ao diagnóstico do câncer de mama foi de 38,14 anos (35-43 anos). O tipo histológico predominante foi o carcinoma ductal, encontrado em 6 pacientes (85,7%) e 5 pacientes (71,4%) apresentaram tumor de mama do tipo luminal B HER2. Nenhuma dessas pacientes apresentou câncer de mama bilateral ou diagnóstico de outro tumor primário. Em relação à história familiar de câncer, seis pacientes referiram casos de câncer de mama e/ou ovário em familiares de 1º, 2º e 3º grau.

5.5.2 Gene *BLM*

O gene *BLM* está associado à Síndrome de Bloom, de herança autossômica recessiva (OMIM: 210900).

Foi detectada apenas uma variante patogênica em heterozigose no gene *BLM* em uma paciente de etnia Judia Ashkenazi, com diagnóstico de carcinoma ductal de mama aos 49 anos, imunofenótipo triplo negativo e um segundo carcinoma ductal primário de mama do tipo luminal (positivo para receptores hormonais e ausência de amplificação de HER2) aos 51 anos. A paciente teve ainda diagnóstico de melanoma cutâneo aos 51 anos e não apresentava história familiar de câncer de mama e/ou ovário.

A variante detectada nessa paciente trata-se da variante *frameshift* c.2207_2212delinsTAGATTC, (p.Tyr736fs), frequente na população Judia Ashkenazi.

5.5.3 Gene *BRCA1*

O gene *BRCA1* está associado a SMOH de herança autossômica dominante (OMIM: 604370) e à Anemia de Fanconi (grupo de complementação S) de herança autossômica recessiva (OMIM: 617883).

Foram detectadas um total de 17 VP/PP no gene *BRCA1* em nossa coorte. A idade média ao diagnóstico de câncer de mama foi de 44,1 anos (28-60 anos). O tipo histológico predominante foi o carcinoma ductal, encontrado em 15 pacientes (88%) e subtipo triplo negativo (59%). Três pacientes (17,6%) tiveram diagnóstico de câncer de mama bilateral (dois tumores primários), com idade média de diagnóstico do segundo tumor de 48,3 anos. Seis pacientes (35,3%) apresentaram diagnóstico de outro tumor primário (excetuando-se câncer de mama) e destas, o câncer de ovário foi o tumor predominante (83% - n=5/6). A maioria das pacientes apresentou história familiar para câncer de mama e/ou ovário (70%).

5.5.4 Gene *BRCA2*

O gene *BRCA2* está associado a SMOH de herança autossômica dominante (OMIM: 612555) e à Anemia de Fanconi (grupo de complementação D1) de herança autossômica recessiva (OMIM: 605724).

Foram detectadas um total de 15 VP/PP no gene *BRCA2* em nossa coorte. A idade média ao diagnóstico de câncer de mama foi de 42,6 anos (27-56 anos). O tipo histológico predominante foi o carcinoma ductal, encontrado em 12 pacientes (80%) e de subtipo luminal (40%). Quatro pacientes (26,6%) tiveram diagnóstico de câncer de mama bilateral (dois tumores primários), com idade média de diagnóstico do segundo tumor de 51,2 anos. Apenas duas pacientes (13,3%) apresentaram diagnóstico de outro tumor primário (excetuando-se câncer de mama), sendo câncer de ovário em ambos os casos. A maioria das pacientes apresentou história familiar para câncer de mama e/ou ovário (73,3%).

5.5.5 Gene *BRIP1*

O gene *BRIP1* está associado à Anemia de Fanconi (grupo de complementação J) de herança autossômica recessiva (OMIM: 609054) e à predisposição hereditária ao câncer de ovário.

Foi detectada apenas uma variante patogênica em heterozigose no gene *BRIP1* em uma paciente, com diagnóstico de carcinoma ductal de mama aos 57 anos, do tipo luminal. A paciente teve diagnóstico um segundo tumor primário, sendo um câncer colorretal aos 56 anos

e apresentou história familiar positiva para câncer de mama, mas negativa para câncer de ovário.

5.5.6 Gene *CHEK2*

O gene *CHEK2* está associado à predisposição ao câncer de mama, de herança autossômica dominante (OMIM: 114480), câncer colorretal e câncer de próstata de herança autossômica dominante (OMIM: 176807). Foram detectadas VP/PP no gene *CHEK2* em heterozigose em 5 pacientes. A idade média ao diagnóstico do câncer de mama foi de 45,4 anos (33-53 anos). O tipo histológico predominante foi o carcinoma ductal, encontrado em 4 pacientes (80%), subtipo luminal em duas pacientes (40%), luminal B HER2 em uma paciente (20%) e outra com imunofenótipo desconhecido. A quinta paciente teve diagnóstico de carcinoma lobular triplo negativo (1/5 – 20%).

Uma paciente (20%) apresentou diagnóstico de um segundo tumor primário de mama três anos após o primeiro, na mama contra-lateral. O primeiro tumor apresentado foi um carcinoma ductal (imunofenótipo desconhecido) aos 42 anos e o segundo tumor foi um carcinoma ductal luminal aos 45 anos.

Apenas duas pacientes de nossa amostra apresentaram a variante patogênica mais comum no gene *CHEK2* c.1100delC.

Todas as pacientes apresentaram história familiar para câncer de mama e/ou ovário e nenhuma delas apresentou história familiar de câncer colorretal.

5.5.7 Gene *FANCA*

O gene *FANCA* está associado à Anemia de Fanconi (grupo de complementação A), de herança autossômica recessiva (OMIM: 227650).

Foi detectada apenas uma variante patogênica em heterozigose no gene *FANCA* em uma paciente, com diagnóstico de carcinoma ductal de mama aos 38 anos, do tipo luminal. A paciente não teve diagnóstico de outros tumores primários e também não apresentou história familiar positiva para câncer de mama e/ou ovário.

5.5.8 Gene *FANCD2*

O gene *FANCD2* está associado à Anemia de Fanconi do grupo de complementação D2, de herança autossômica recessiva (OMIM: 227646).

Foi detectada apenas uma variante provavelmente patogênica em heterozigose no gene *FANCD2* em uma paciente, com diagnóstico de carcinoma ductal de mama aos 52 anos,

imunofenótipo triplo negativo. A paciente não teve diagnóstico de outros tumores primários e também não apresentou história familiar positiva para câncer de mama e/ou ovário.

5.5.9 Gene *FANCE*

O gene *FANCE* está associado à Anemia de Fanconi (grupo de complementação E), de herança autossômica recessiva (OMIM: 600901).

Foi detectada apenas uma variante provavelmente patogênica em heterozigose no gene *FANCE* em uma paciente, com diagnóstico de carcinoma ductal de mama aos 33 anos, do tipo Luminal B HER2. A paciente não teve diagnóstico de outros tumores primários e também não apresentou história familiar positiva para câncer de mama e/ou ovário.

5.5.10 Gene *FANCI*

O gene *FANCI* está associado à Anemia de Fanconi (grupo de complementação I), de herança autossômica recessiva (OMIM: 609053).

Foram detectadas variantes patogênicas em heterozigose no gene *FANCI* em duas pacientes, com idade média ao diagnóstico de câncer de mama de 50 anos. Ambas apresentaram um carcinoma lobular, um com imunofenótipo triplo negativo e o outro luminal. As pacientes não tiveram diagnóstico de outros tumores primários e apenas uma apresentou história familiar positiva para câncer de mama e/ou ovário.

5.5.11 Gene *FANCL*

O gene *FANCL* está associado à Anemia de Fanconi (grupo de complementação L), de herança autossômica recessiva (OMIM: 614083).

Foi detectada apenas uma variante provavelmente patogênica em heterozigose no gene *FANCL* em uma paciente, com diagnóstico de dois tumores primários de mama sincrônicos aos 55 anos, um do tipo lobular e o outro ductal, ambos com positividade para receptores hormonais. A paciente não teve diagnóstico de outros tumores primários e relatou história familiar positiva para câncer de mama e/ou ovário.

5.5.12 Gene *FANCM*

O gene *FANCM* está associado à Anemia de Fanconi (grupo de complementação M) de herança autossômica recessiva; à Falência ovariana precoce 15 de herança autossômica recessiva (OMIM: 618096) e à Falência Espermatogênica 28 de herança autossômica recessiva (OMIM: 618086).

Foi detectada apenas uma variante provavelmente patogênica em heterozigose no gene *FANCM* em uma paciente, com diagnóstico de carcinoma ductal de mama aos 36 anos, imunofenótipo luminal. A paciente não teve diagnóstico de outros tumores primários e apresentou história familiar positiva para câncer de mama e/ou ovário.

5.5.13 Gene *FH*

O gene *FH* está associado à Deficiência da Fumarato Hidratase de herança autossômica recessiva (OMIM: 606812) e à Leiomiomatose Hereditária e Carcinoma de Células Renais de herança autossômica dominante (OMIM: 150800).

Foi detectada uma variante provavelmente patogênica em heterozigose no gene *FH* em uma paciente, com diagnóstico de carcinoma ductal de mama aos 40 anos, do tipo hiperexpressor de HER2. A paciente não teve diagnóstico de outros tumores primários e apresentou história familiar positiva para câncer de mama e/ou ovário.

5.5.14 Gene *HNF1A*

O gene *HNF1A*, está associado ao Diabetes MODY tipo III, de herança autossômica dominante (OMIM: 600496) e predisposição a Diabetes Mellitus, de herança autossômica dominante (OMIM: 125853) e recessiva (OMIM: 222100).

Foram detectadas variantes patogênicas em heterozigose no gene *HNF1A* em duas pacientes, com idade média ao diagnóstico de câncer de mama de 43 anos. Ambas apresentaram um carcinoma ductal cada, com imunofenótipo triplo negativo e luminal. As pacientes não tiveram diagnóstico de outros tumores primários e apenas uma delas referiu história familiar de câncer de mama e/ou ovário.

5.5.15 Gene *MUTYH*

O gene *MUTYH* está associado à Polipose Adenomatosa familiar associada ao *MUTYH* (MAP), de herança autossômica recessiva (OMIM:608456).

Foram detectadas variantes VP/PP no gene *MUTYH* em heterozigose em 7 pacientes. A idade média ao diagnóstico do câncer de mama foi de 52,7 anos (37-78 anos). O tipo histológico predominante foi o carcinoma ductal, encontrado em 5 pacientes (71,4%) com os seguintes imunofenótipos: 2 luminais, 2 luminais B HER2 e um triplo negativo.

Uma paciente (14,3%) apresentou diagnóstico sincrônico de um segundo tumor primário de mama contra-lateral. Um dos tumores era do tipo lobular triplo negativo e o outro tumor do tipo ductal hiperexpressor de HER2.

As demais pacientes não tiveram diagnóstico de outros tumores primários. Quanto à história familiar de câncer, 6 das 7 pacientes referiram história familiar positiva para câncer e destas, 4 para câncer de mama e/ou ovário. Apenas uma das pacientes relatou história familiar de câncer colorretal.

5.5.16 Gene *PALB2*

O gene *PALB2* está associado à predisposição ao câncer de mama, de herança autossômica dominante (OMIM:114480); predisposição ao câncer de pâncreas (OMIM: 613348); e à Anemia de Fanconi (grupo N) de herança autossômica recessiva (OMIM: 610832).

Foram detectadas variantes patogênicas no gene *PALB2* em heterozigose em 4 pacientes. A idade média ao diagnóstico do câncer de mama foi de 40,25 anos (27-46 anos). O tipo histológico predominante foi o carcinoma ductal, encontrado em 3 pacientes (75%) e 2 pacientes (50%) apresentaram tumor de mama com imunofenótipo triplo negativo.

As pacientes não tiveram diagnóstico de outros tumores primários. Em relação à história familiar de câncer, todas apresentaram história positiva para câncer de mama e/ou ovário e apenas uma apresentou história familiar para câncer de pâncreas.

5.5.17 Gene *PHOX2B*

O gene *PHOX2B* está associado à suscetibilidade ao neuroblastoma, (OMIM: 613013) e também à síndrome da hipoventilação central congênita, com ou sem doença de Hirschsprung, de herança autossômica dominante (OMIM: 209880).

Foi detectada uma variante provavelmente patogênica em heterozigose no gene *PHOX2B* em uma paciente, com diagnóstico de carcinoma lobular de mama aos 47 anos, hiperexpressor de HER2. A paciente não teve diagnóstico de outros tumores primários e referiu história familiar de câncer de mama e/ou ovário.

5.5.18 Gene *PMS2*

O gene *PMS2* está associado à Síndrome de Lynch, de herança autossômica dominante (OMIM: 614337) e à síndrome de câncer hereditário por defeito na reparação de erros de replicação de DNA (*mismatch repair*), de herança autossômica recessiva (OMIM: 276300).

Foi detectada a variante provavelmente patogênica c.137G>T em heterozigose no éxon 2 do gene *PMS2* (região sem homologia com o pseudogene *PMS2CL*) em uma paciente,

com diagnóstico de carcinoma ductal de mama aos 49 anos, do tipo luminal. A paciente não teve diagnóstico de outros tumores primários.

A paciente referiu história familiar de câncer incluindo osteossarcoma, câncer gástrico e mama, porém sem critérios clínicos para a Síndrome de Lynch.

5.5.19 Gene *PRF1*

O gene *PRF1* está associado à Linfocitose hemofagocítica familiar, de herança autossômica recessiva (OMIM: 603553); à Anemia Aplásica (OMIM: 609135) e ao linfoma não-Hodgkin (OMIM:605027).

Foram detectadas VP/PP em heterozigose no gene *PRF1* em duas pacientes, com idade média ao diagnóstico de câncer de mama de 40,5 anos. Ambas apresentaram um carcinoma ductal do tipo luminal. As pacientes não tiveram diagnóstico de outros tumores primários e uma delas apresentou história familiar positiva para câncer de mama e/ou ovário.

5.5.20 Gene *RAD51C*

O gene *RAD51C* está associado à Anemia de Fanconi (grupo de complementação O) de herança autossômica recessiva (OMIM: 613390) e à predisposição ao câncer de ovário.

Foi detectada uma variante patogênica em heterozigose no gene *RAD51C* em uma paciente, com diagnóstico de carcinoma ductal de mama aos 30 anos, com imunofenótipo triplo negativo. A paciente teve diagnóstico prévio de leucemia linfóide aguda aos 14 anos e apresentou história familiar negativa para câncer de mama e/ou ovário.

5.5.21 Gene *RECQL4*

O gene *RECQL4* está associado às síndromes de Rothmund-Thomson tipo 2 (OMIM: 268400), à RAPADILINO (OMIM: 266280) e de Baller-Gerold (OMIM: 218600), todas de herança autossômica recessiva.

Foram detectadas VP/PP em heterozigose no gene *RECQL4* em duas pacientes, com idade média ao diagnóstico de câncer de mama de 38,5 anos, do tipo histológico ductal, sendo um deles luminal e o outro hiperexpressor de HER2. As pacientes não tiveram diagnóstico de outros tumores primários e uma delas relatou história familiar positiva para câncer de mama e/ou ovário.

5.5.22 Gene *SBDS*

O gene *SBDS* está associado à Síndrome Shwachman-Diamond, de herança autossômica recessiva (OMIM: 260400).

Foram detectadas variantes patogênicas no gene *SBDS* em heterozigose em 3 pacientes, todas portadoras da mesma variante (c.258+2T>C) e pertencentes a famílias não aparentadas.

A idade média ao diagnóstico do câncer de mama foi de 49,3 anos (35-66 anos). Duas pacientes (75%) apresentaram um carcinoma ductal cada, sendo um com imunofenótipo triplo negativo e o outro luminal. A terceira paciente apresentou um carcinoma lobular do tipo luminal.

Todas as pacientes apresentaram diagnóstico de um segundo tumor primário, metacrônico, sendo um câncer de tireoide, um de pâncreas e outro de mama. Apenas uma delas apresentou história familiar positiva para câncer de mama e/ou ovário.

5.5.23 Gene *SLX4*

O gene *SLX4*, está associado à Anemia de Fanconi, grupo de complementação P, de herança autossômica recessiva (OMIM:613951).

Foi detectada apenas uma variante provavelmente patogênica em heterozigose no gene *SLX4* em uma paciente, com diagnóstico de carcinoma ductal de mama aos 43 anos, do tipo luminal. A paciente não teve diagnóstico de outros tumores primários e também não apresentou história familiar de câncer de mama e/ou ovário.

5.5.24 Gene *TP53*

O gene *TP53* está associado à Síndrome de Li-Fraumeni, de herança autossômica dominante (OMIM: 151623).

Foram detectadas variantes patogênicas no gene *TP53* em heterozigose em 3 pacientes (2 delas portadoras da variante fundadora brasileira R337H). A idade média ao diagnóstico do câncer de mama foi de 48,6 anos (33-62 anos). O tipo histológico predominante foi o carcinoma ductal, encontrado nas três pacientes. Cada paciente apresentou um imunofenótipo diferente, sendo triplo negativo, luminal e hiperexpressor de HER2.

Duas pacientes apresentaram diagnóstico de um outros tumores primários: uma paciente com diagnóstico de carcinoma ductal de mama imunofenótipo triplo negativo aos 51 anos, apresentou um tumor *Phyllodes* na mama contra-lateral, sincrônico. A outra paciente

apresentou diagnóstico de câncer de mama bilateral aos 62 anos e câncer gástrico do tipo difuso sincrônico.

De acordo com a história familiar relatada, apenas uma das pacientes com diagnóstico de câncer de mama aos 33 anos (sem casos de câncer na família), apresentou critérios clínicos para realizar a testagem para o gene *TP53*. As outras duas pacientes portadoras da variante R337H não apresentaram critérios clínicos para a Síndrome de Li-Fraumeni.

5.6 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO DAS PACIENTES COM MINAS

Das 81 pacientes com resultado positivo, três ($n=3/81 - 3,7\%$) apresentaram duas VP/PP em genes distintos cada e foram diagnosticadas com MINAS.

A primeira paciente (P013) foi diagnosticada com carcinoma ductal de mama aos 49 anos, do tipo luminal B HER2. Na história familiar, a irmã da paciente foi diagnosticada com câncer de mama aos 36 anos, pai com câncer de próstata aos 77 anos, tio paterno com câncer de cólon aos 72 anos, tia paterna com câncer gástrico aos 45 anos e prima paterna com câncer de mama aos 35 anos. Foram detectadas a variante patogênica c.5617_5621delGTAAT em heterozigose no gene *BRCA2* e a variante provavelmente patogênica c.470T>C em heterozigose no gene *CHEK2*. Mutações nos dois genes podem estar relacionadas ao câncer de mama, sendo o risco maior associado ao gene *BRCA2*, que também causa aumento de risco para câncer de próstata. Já o gene *CHEK2*, também está associado ao aumento de risco para câncer colorretal (Figura 3).

A segunda paciente (P160) foi diagnosticada com carcinoma ductal de mama aos 41 anos, do tipo luminal. De acordo com a história familiar, a irmã da paciente foi diagnosticada com astrocitoma aos 14 anos, mãe com câncer de mama bilateral aos 38 anos, prima materna com câncer de mama aos 31 anos, avô materno com câncer renal aos 70 anos e tia avó materna com câncer de mama aos 48 anos. Foram detectadas a variante patogênica c.1813dupA em heterozigose no gene *BRCA2* e a variante patogênica R337H (c.1010G>A) em heterozigose no gene *TP53*. Nesse caso, o fenótipo é compatível com mutações em ambos os genes, considerados de alta penetrância para câncer de mama. O gene *TP53*, associado à síndrome de Li-Fraumeni, aumenta o risco para outros tumores como os de SNC e renal, descritos na família (Figura 4).

A terceira paciente (P211) foi diagnosticada com carcinoma ductal de mama aos 31 anos, do tipo luminal B HER2. Na história familiar, foi referida apenas tia materna com câncer de mama aos 50 anos. O heredograma dessa paciente não estava disponível. Foram detectadas a variante patogênica c.156_157insAlu em heterozigose no gene *BRCA2* e a variante provavelmente patogênica c.6529C>T em heterozigose no gene *ATM*. Da mesma forma, mutações nos dois genes podem estar relacionadas ao câncer de mama, sendo o risco maior associado ao gene *BRCA2*.

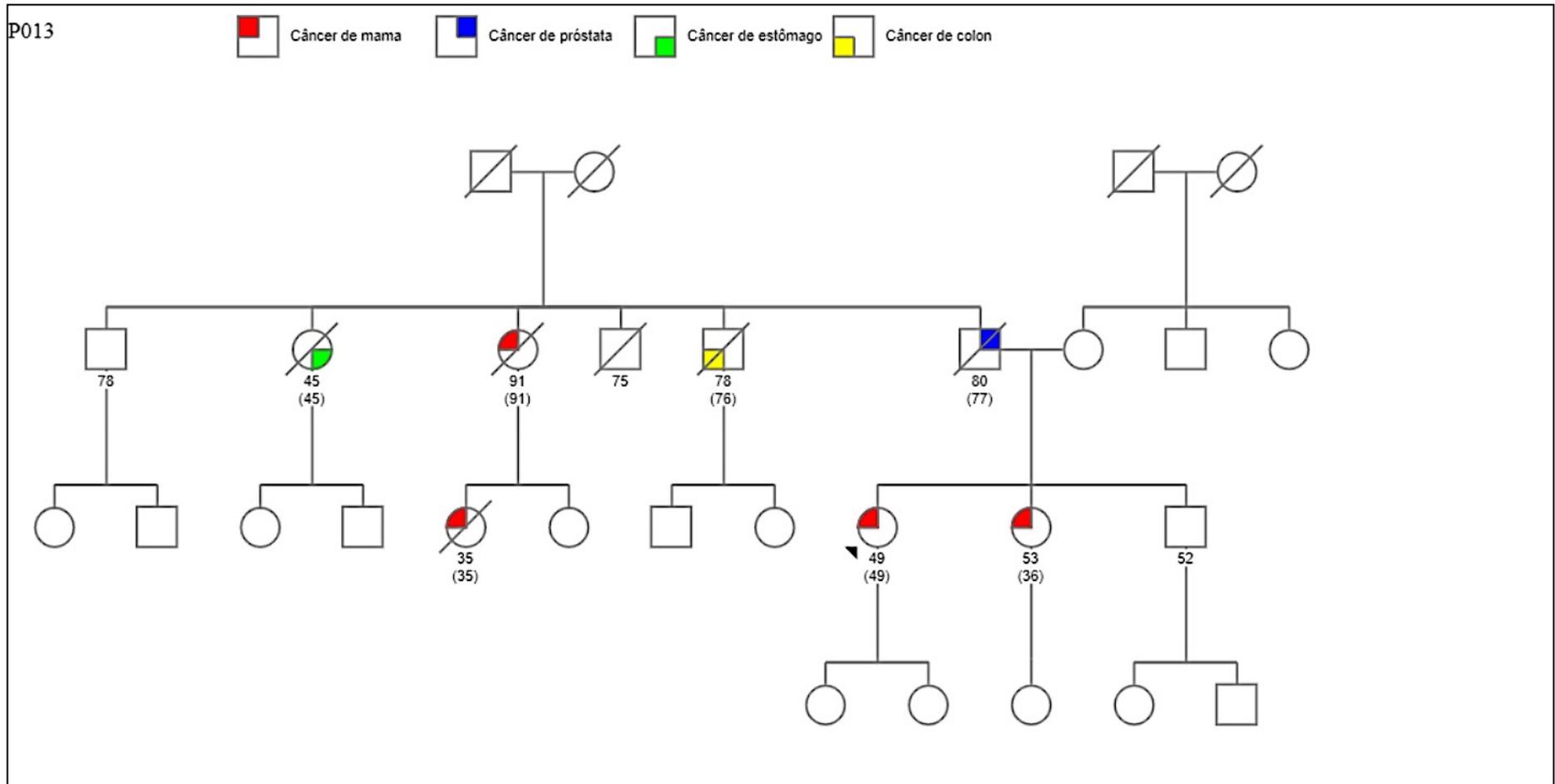


Figura 3 - Heredograma da paciente P013, portadora de duas variantes patogênicas/provavelmente patogênicas nos genes *BRCA2* e *CHEK2*.

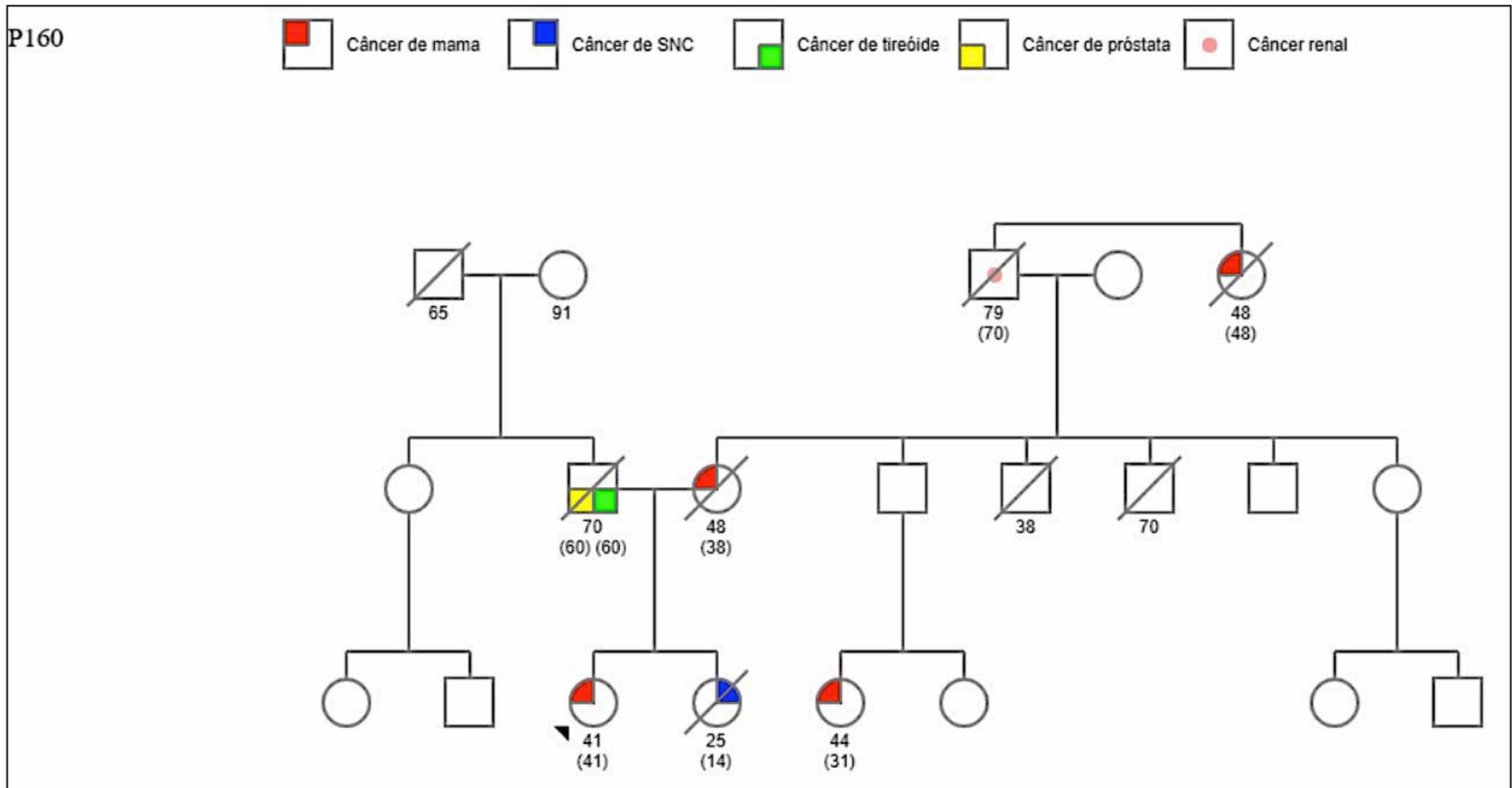


Figura 4 - Heredograma da paciente P160, portadora de duas variantes patogênicas nos genes *BRCA2* e *TP53*.

5.7 PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE OUTRAS NEOPLASIAS

Em relação ao diagnóstico de outras neoplasias, excluindo-se câncer de mama, 12% (n=39/321) das mulheres incluídas no estudo tiveram diagnóstico de um outro câncer primário, sendo um total de 45 tumores distintos diagnosticados. O câncer ovariano foi o mais frequente nesse grupo de pacientes, seguido pelo câncer de tireóide e câncer colorretal (Tabela 11).

Dos 45 tumores apresentados pelas pacientes, a maioria (n=22/45 - 48,9%) foi diagnosticado após o câncer de mama, 33,3% foi diagnosticado antes do câncer de mama (n=15/45) e 17,8% (n=8/45) tiveram diagnóstico sincrônico ao câncer de mama.

Tabela 11 - Descrição de outras neoplasias diagnosticadas previamente nas pacientes incluídas no estudo e a distribuição conforme presença ou não de variante patogênica/provavelmente patogênica nos genes avaliados.

Pacientes com história de outros tumores primários (exceto câncer de mama)			Pacientes com história de outros tumores primários (exceto câncer de mama) x Presença de VP/PP			
	Nº	%		Nº	%	
Não	282	88,0	Não	25	64,0	
Sim	39	12,0	Sim	14	36,0	
Total	321	100,0	Total	39	100,0	
Tipo de Câncer	Nº	%	Tipo de Câncer	Nº	%	Gene mutado
Ovário	9	20	Ovário	6	43,1	<i>BRCA1/BRCA2</i>
Tireóide	7	15,5	Tireóide	2	14,3	<i>FANCL/SBDS</i>
Colorretal	7	15,5	Melanoma	1	7,1	<i>BLM</i>
Melanoma	4	8,8	Sarcoma	1	7,1	<i>BRCA1</i>
Pulmão	3	6,6	Gástrico	1	7,1	<i>TP53</i>
GIST	3	6,6	Leucemia	1	7,1	<i>RAD51C</i>
Sarcoma	2	4,4	Colorretal	1	7,1	<i>BRIP1</i>
Pâncreas	2	4,4	Pâncreas	1	7,1	<i>SBDS</i>
Gástrico	2	4,4				
Vesícula Biliar	1	2,3				
Rim	1	2,3				
Linfoma Hodgkin	1	2,3				
Leucemia	1	2,3				
Endométrio	1	2,3				
Colo uterino	1	2,3				
Total	45	100,0	Total	14	100,0	

Legenda: VP/PP: variante patogênica/provavelmente patogênica; GIST: tumor estromal gastrointestinal.

5.8 ANÁLISE DE VARIANTES PATOGÊNICAS/PROVAVELMENTE PATOGÊNICAS DE ACORDO COM O SUBTIPO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA

A presença de VP/PP foi analisada de acordo com os subtipos moleculares de câncer de mama (Tabela 12; Figura 5). Com o intuito de entender a contribuição dos diferentes genes contidos no painel utilizado nesse estudo em relação ao total de mutações detectadas, a análise foi realizada considerando-se três grupos:

- 1) os genes *BRCA1/2*, uma vez que são considerados os genes mais importantes relacionados à predisposição hereditária ao câncer de mama;
- 2) 14 genes acionáveis (excluindo-se *BRCA1/2*) incluídos no painel para câncer hereditário preconizado pela Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS), para os quais os riscos de câncer e o manejo clínico está bem estabelecido nos *guidelines* atuais (*ATM, BRIP1, CDH1, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11 e TP53*);
- 3) os outros 78 genes do painel.

Entre as 79 pacientes com câncer de mama triplo negativo, 31,6% (n=25/79) tiveram uma mutação patogênica/provavelmente patogênica identificada. Os genes *BRCA1* e *BRCA2* correspondem a quase metade das VP/PP identificadas (n=12/25), sendo que o gene *BRCA1* contribuiu com o maior número de VP/PP (n=10/25), e somados, tem-se um percentual de 15,2% (n=12/79). Excluindo-se os genes *BRCA1/2*, genes acionáveis incluídos no painel de 14 genes foram identificados em 6 pacientes (com VP/PP em *ATM, CHEK2, PALB2, RAD51C e TP53*) correspondendo a 7,6% (n=6/79) e os demais genes do painel foram identificados em 7 pacientes, correspondendo a 8,8% (n=7/79). Assim, observamos que a utilização do painel de 94 genes contribuiu com um aumento total da positividade do teste em 16,4% nesse subtipo de tumor de mama.

O câncer de mama luminal foi encontrado em 155 pacientes, sendo que, destas, 18,7% (n=29/155) apresentavam mutações patogênicas/provavelmente patogênicas e os genes *BRCA2* e *BRCA1* contribuíram com 6,5% (n=10/155) das VP/PP detectadas nesse grupo (3,9% (n=6/155) e 2,6% (n=4/155) em *BRCA2* e *BRCA1*, respectivamente). Excluindo-se os genes *BRCA1/2*, o percentual de detecção de VP/PP em genes de alta e média penetrância incluídos no painel de 14 genes acionáveis foi de 4,5% (n=7/155), com VP/PP identificadas nos genes *ATM, BRIP1, CHEK2, PALB2, PMS2 e TP53*. Para os demais genes do painel o

percentual de detecção de VP/PP foi de 7,7% (n=12/155). Assim, para o subtipo luminal, o painel contribuiu com um aumento no percentual de detecção de VP/PP em 12,2%, demonstrando uma contribuição significativa em relação ao total de 18,7% de VP/PP detectadas.

O subtipo luminal B HER2 foi encontrado em 40 pacientes, e destes, 40% (n=16/40) apresentavam VP/PP, com ênfase para o gene *ATM* com o maior número de mutações identificadas (12,5% - n=5/40), seguido pelo gene *BRCA2* (10% - n=4/40). Para esse subtipo, analisando-se apenas os genes *BRCA1/2*, o percentual de detecção de mutações foi de 12,5% (n=5/40). Considerando-se o painel de 14 genes acionáveis, o percentual de VP/PP foi de 17,5% (n=7/40) (VP/PP identificadas nos genes *ATM*, *CHEK2* e *PALB2*) e o percentual de VP/PP dos demais genes do painel foi de 10% (n=4/40). Para o subtipo luminal B HER2, o painel contribuiu com um aumento no percentual de detecção de VP/PP em 27,5%, demonstrando uma contribuição significativa em relação ao total de 40% de VP/PP detectadas.

Finalmente, o subtipo com hiperexpressão de HER2 foi encontrado em apenas 13 pacientes e, destes, 30,8% (n=4/13) apresentaram uma VP/PP em um dos 94 genes do painel. O percentual de mutação em *BRCA1/2* foi somente de 7,7% (n=1/13), com mutação detectada em *BRCA2*. Considerando-se o painel de 14 genes acionáveis, o percentual de VP/PP também foi de 7,7% (n=1/13) (VP identificada no gene *TP53*) e o percentual de VP/PP dos demais genes do painel foi de 15,4% (n=2/13). Para esse subtipo, o painel contribuiu com um aumento total no percentual de detecção de VP/PP em 23,1%, demonstrando também uma contribuição significativa em relação ao total de 30,8% de VP/PP detectadas.

Tabela 12 - Frequência das variantes patogênicas/provavelmente patogênicas de acordo com o subtipo molecular do câncer de mama

Subtipo Molecular	Total		Sem VP/PP		Com VP/PP		Genes		
	No.	%	No.	%	No.	%	Gene	No.	%
TNBC	79	100%	54	68,3%	25	31,7%	<i>BRCA1</i>	10	12,6%
							<i>BRCA2</i>	2	2,5%
							<i>MUTYH</i>	2	2,5%
							<i>PALB2</i>	2	2,5%
							<i>ATM</i>	1	1,3%
							<i>BLM</i>	1	1,3%
							<i>CHEK2</i>	1	1,3%
							<i>FANCD2</i>	1	1,3%
							<i>FANCI</i>	1	1,3%
							<i>HNFI1A</i>	1	1,3%
							<i>RAD51C</i>	1	1,3%
							<i>SBDS</i>	1	1,3%
							<i>TP53</i>	1	1,3%
Luminal	155	100%	126	81,3%	29	18,7%	<i>BRCA2</i>	6	3,9%
							<i>BRCA1</i>	4	2,6%
							<i>CHEK2</i>	2	1,4%
							<i>MUTYH</i>	2	1,4%
							<i>PRF1</i>	2	1,4%
							<i>SBDS</i>	2	1,4%
							<i>ATM</i>	1	0,6%
							<i>BRIP1</i>	1	0,6%
							<i>FANCA</i>	1	0,6%
							<i>FANCI</i>	1	0,6%
							<i>FANCM</i>	1	0,6%
							<i>HNFI1A</i>	1	0,6%
							<i>PALB2</i>	1	0,6%
							<i>PMS2</i>	1	0,6%
							<i>RECQL4</i>	1	0,6%
<i>SLX4</i>	1	0,6%							
<i>TP53</i>	1	0,6%							
Luminal B HER2	40	100%	24	60%	16	40%	<i>ATM</i>	5	12,5%
							<i>BRCA2</i>	4	10,0%
							<i>MUTYH</i>	2	5,0%
							<i>BRCA1</i>	1	2,5%
							<i>CHEK2</i>	1	2,5%
							<i>FANCE</i>	1	2,5%
							<i>PALB2</i>	1	2,5%
<i>PHOX2B</i>	1	2,5%							
HER2- Hiperexpressor	13	100%	9	69,2%	4	30,8%	<i>BRCA2</i>	1	7,7%
							<i>FH</i>	1	7,7%
							<i>RECQL4</i>	1	7,7%
							<i>TP53</i>	1	7,7%

Legenda: VP/PP: variante patogênica/provavelmente patogênica; TNBC: câncer de mama triplo negativo; HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano tipo 2.

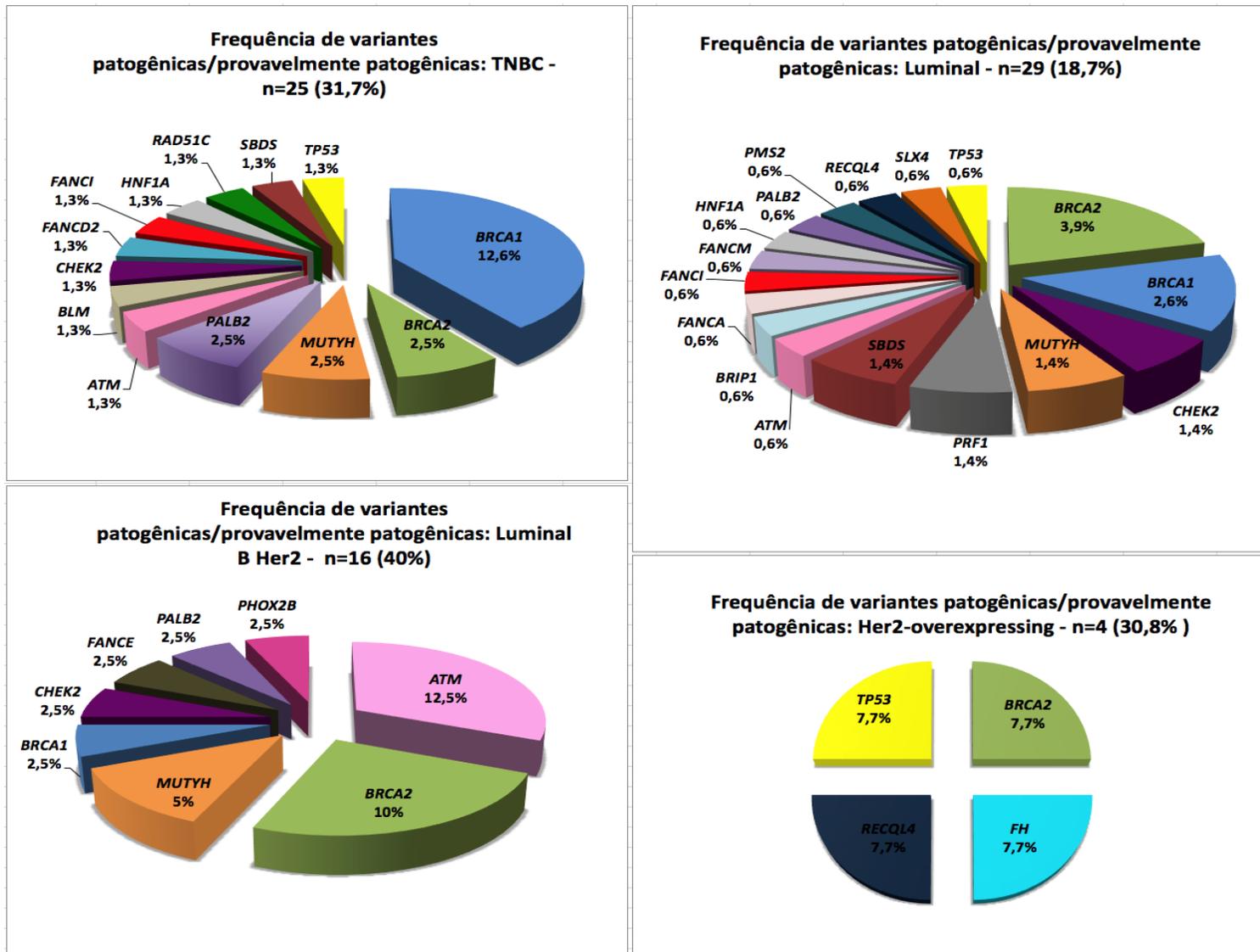


Figura 5 - Espectro das variantes patogênicas/provavelmente patogênicas detectadas de acordo com o subtipo molecular do câncer de mama.

5.9 FREQUÊNCIA DE VARIANTES DE SIGNIFICADO INCERTO ENCONTRADAS

Pelo menos uma variante de significado incerto (VUS) foi identificada em 249 pacientes (n=249/321 - 77,5%), totalizando 470 variantes encontradas em 81 dos 94 genes do painel.

A maioria das VUS foram identificadas no gene *FANCM*, sendo encontradas em 22 pacientes (n=22/249 - 8,8%). Em seguida, temos os genes *ATM* e *RECQL4*, com variantes identificadas em 20 pacientes cada (n=20/249 - 8%), o gene *MSH6* com variantes identificadas em 18 pacientes (n=18/249 - 7,2%), o gene *SLX4*, em 17 pacientes (n=17/249 - 6,8%) e *BRCA2* em 16 pacientes (n=16/249 - 6,4%) (Figura 6). Lembrando que algumas pacientes apresentaram mais de uma VUS no mesmo gene.

Do total de pacientes com VUS identificadas, 24,5% (n=61/249) apresentaram também ao menos uma VP/PP.

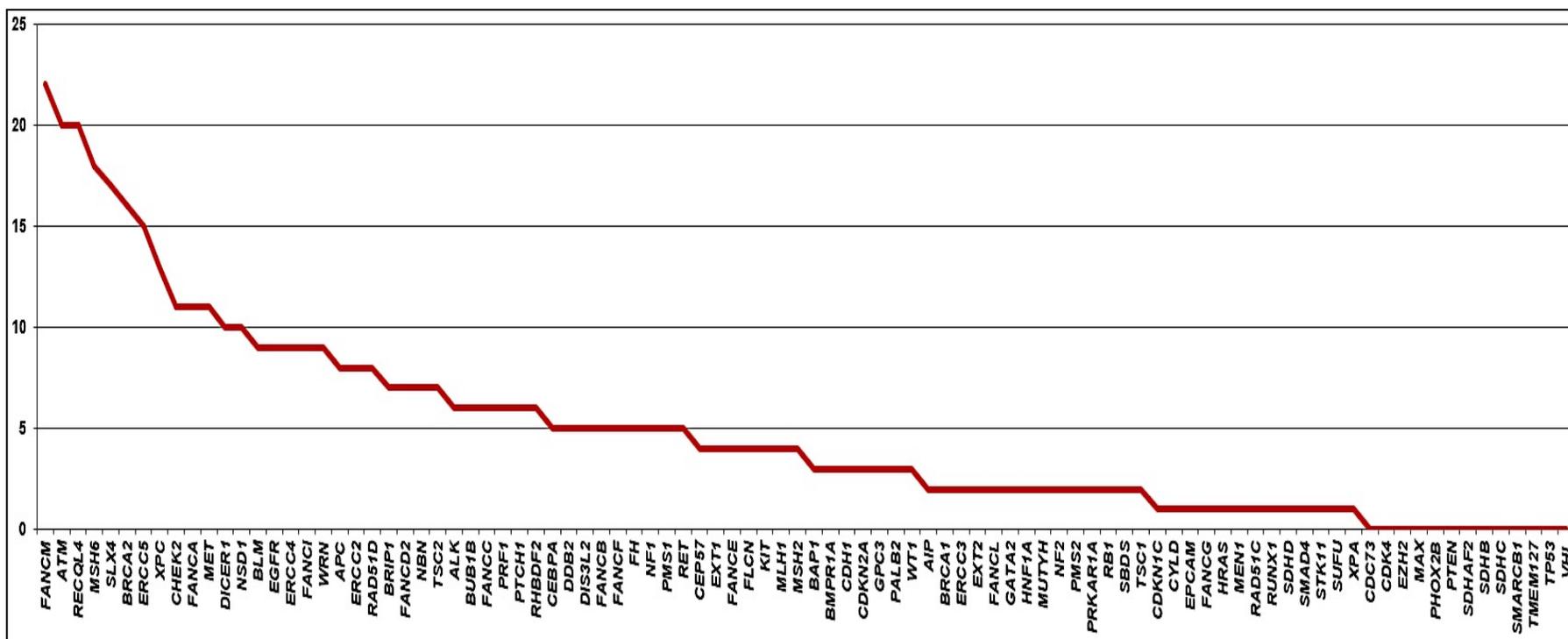


Figura 6 – Distribuição das VUS pelo número de pacientes, de acordo com o gene identificado.

6 DISCUSSÃO

Os painéis multigenes para câncer de mama hereditário estão sendo cada vez mais usados na prática clínica. Além de incluir genes de alta penetrância com utilidade clínica estabelecida, esses painéis contêm genes cuja significância clínica e associação com câncer ainda é incerta. Assim, apesar da utilização desses painéis contribuir no diagnóstico das SPHC em algumas famílias, há desafios significativos na interpretação de seus resultados e no aconselhamento genético, uma vez que as estimativas de risco de câncer e estratégias de manejo ainda não foram estabelecidas para muitos genes.

Enquanto o impacto das mutações em muitos genes de moderada e baixa penetrância para câncer de mama ainda vem sendo estudado, o benefício em se identificar mutações nos genes *BRCA1/2* já está bem estabelecido. Além das estratégias de rastreamento visando à detecção precoce do câncer e medidas redutoras de risco, alguns tumores associados a mutações nos genes *BRCA1/2* respondem melhor à terapia alvo, como os inibidores de PARP (poli [adenosina difosfato-ribose] polimerase) do que os cânceres esporádicos, impactando também no tratamento em alguns casos.

No Brasil, o acesso ao teste genético para câncer de mama hereditário ainda é um desafio para os pacientes de maior risco, uma vez que esse procedimento não é coberto pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e só foi incorporado à maioria dos planos de saúde privados a partir de 2014. De 2014 a 2018, as resoluções para cobertura de testes genéticos no sistema privado, regulamentadas pela Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS), preconizavam a realização de testes individualizados e sequenciais para os genes *BRCA1* e *BRCA2*. Somente em 2018, a nova resolução da ANS incorporou o painel multigenes para investigação de câncer hereditário em indivíduos com critérios clínicos pré-determinados, estabelecendo um painel de 16 genes acionáveis (*ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, MLH1, MSH2, MSH6, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11* e *TP53*), cujas estimativas de risco para câncer e manejo clínico estão bem estabelecidos pelos *guidelines* atuais.

O painel preconizado pela ANS foi adotado como referência nesse estudo pois, mesmo não incluindo apenas genes relacionados ao câncer de mama, é indicado atualmente para investigação de mulheres com diagnóstico atual ou prévio de câncer de mama que apresentam critérios clínicos para câncer de mama hereditário e que tenham resultado “negativo” na análise de mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

No entanto, como apenas uma pequena parte da população brasileira tem acesso ao sistema privado de saúde e o teste genético ainda apresenta alto custo, a maioria das mulheres

brasileiras com risco para câncer de mama hereditário atualmente não tem acesso ao diagnóstico genético.

O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a contribuição da realização de um painel multigenes em uma amostra de pacientes com risco para câncer de mama hereditário, visando compreender o impacto dessa abordagem na prática clínica e obtenção de dados da população brasileira, já que poucos estudos sobre o assunto foram realizados no Brasil até o momento.

Em nosso estudo, a frequência de VP/PP nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foi de 9,9% e em outros genes de predisposição de câncer (excluindo-se *BRCA1/2*) foi de 15,3%, entre 321 mulheres não aparentadas com câncer de mama. A análise do painel de 94 genes contribuiu para identificar VP/PP em genes não *BRCA1/2* em 49 pacientes, aumentando em 15,3% a frequência de variantes VP/PP encontradas no teste genético, ou seja, o uso do painel de 94 genes contribuiu com a identificação de cerca de 60% das VP/PP detectadas nessa coorte. Esse achado é semelhante a alguns estudos prévios sobre painéis multigenes em câncer de mama (Susswein et al. 2016; Thompson et al. 2016; Tung et al. 2016; Couch et al. 2017).

Considerando-se apenas o painel de 16 genes acionáveis preconizados pela ANS para análise de câncer hereditário, a taxa de detecção de VP/PP em nossa coorte foi de 16,8% (54/321), identificando-se 6,9% a mais de mulheres em risco do que se apenas os genes *BRCA1/2* fossem avaliados. Esses resultados destacam a importância da realização de testes com painel multigenes em nossa população, pois impactam diretamente no acompanhamento desses pacientes e familiares, uma vez que são genes com estimativas de risco para câncer estabelecidas e estratégias de rastreamento e prevenção bem definidas.

Nossos resultados demonstraram uma maior prevalência de VP/PP em genes de alta penetrância para câncer de mama (*BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*), como esperado. Curiosamente, nenhuma variante patogênica foi identificada nos outros genes de alta penetrância, isto é, *PTEN*, *CDH1* e *STK11* na população estudada. Mutações patogênicas no gene *TP53* foram identificadas em quatro pacientes e destas, três eram portadoras da mutação R337H, com alta prevalência no Brasil, devido a um efeito fundador (Garritano et al. 2010). Um estudo recente identificou a variante c.400G>T (p.Glu134Ter/E134*) no gene *XAF1* em um subconjunto de portadores da mutação *TP53*-R337H, propondo que a co-segregação das mutações *XAF1*-E134* e *TP53*-R337H leva a um fenótipo de câncer mais agressivo do que a R337H apenas (Pinto et al. 2020). Em nossa coorte, esta variante ainda não foi pesquisada nas pacientes portadoras da mutação *TP53*-R337H.

Similarmente, um outro estudo brasileiro que avaliou 157 indivíduos (132 com câncer de mama e 25 não afetados) usando três tipos diferentes de painel multigenes (de Souza

Timoteo et al. 2018). Mutações germinativas foram identificadas em vinte e sete indivíduos (17,2%), 24 com câncer de mama e três assintomáticos, e a maioria delas nos genes *BRCA1/2* (75%) (de Souza Timoteo et al. 2018).

Em relação aos genes de moderada penetrância para o câncer de mama, VP/PP em *ATM*, *PALB2* e *CHEK2* foram encontradas em 5,6% de nossa coorte, correspondendo a 21,4% das VP/PP encontradas, achado consistente com outros estudos recentes (Susswein et al. 2016; Thompson et al. 2016; Tung et al. 2016; Couch et al. 2017; Rosenthal et al. 2017). Para Tung et al. (2017), mutações germinativas em genes moderada penetrância ao câncer de mama são identificadas em aproximadamente 2% a 5% dos indivíduos que realizam painel multigenes.

É importante notar que, excluindo-se os genes *BRCA1/2*, o gene *ATM* foi o gene com maior número de VP/PP identificadas em nosso estudo. Em contraste, o gene *CHEK2* destaca-se como o mais comum (excluindo *BRCA1/2*) na maioria dos estudos que avaliaram painéis multigenes em câncer de mama (Susswein et al. 2016; Thompson et al. 2016; Tung et al. 2016; Couch et al. 2017; Rosenthal et al. 2017). De Souza Timoteo et al. (2018) relataram que mutações germinativas em genes de penetrância moderada e baixa para câncer de mama foram detectadas em 3,8% dos indivíduos, incluindo os genes *ATM*, *ATR*, *MLH1* e *MSH6*.

De acordo com as diretrizes da NCCN, o rastreamento recomendado para pacientes com mutações germinativas em genes de risco moderado para câncer de mama (como *ATM*, *PALB2* e *CHEK2*) inclui a realização de mamografia anualmente e considerar a realização da ressonância magnética das mamas. Não há evidências suficientes para indicação de mastectomia redutora de risco e, a mesma pode ser considerada de acordo com a história familiar (NCCN 2021). Em nossa coorte, apenas uma das pacientes com mutação em *CHEK2* teve diagnóstico de câncer de mama contralateral e nenhuma das pacientes com mutações nos genes de penetrância moderada para câncer de mama apresentou outro câncer primário (excluindo câncer de mama). O câncer de mama bilateral não foi significativamente associado a mutações nos genes de predisposição do câncer de mama na população estudada.

Não se evidenciou significância estatística na análise de preditores clínicos, anatomopatológicos e familiares quanto à correlação com a presença de VP/PP nos 24 genes identificados, possivelmente por tratar-se de uma população pré-selecionada por critérios clínicos estabelecidos.

Em relação ao subtipo molecular do câncer de mama, observamos que o câncer de mama com imunofenótipo triplo-negativo foi encontrado em 24,6% do total das pacientes incluídas e destas, VP/PP no gene *BRCA1* foram detectadas em 12,6%, semelhante ao relatado anteriormente em outros estudos, incluindo nosso estudo prévio com 131 mulheres

brasileiras com câncer de mama triplo-negativo (Young et al. 2009; Evans et al. 2011; Couch et al. 2015; Brianese et al. 2017). Foi observado para esse subtipo, que a realização do painel contribuiu com um aumento considerável no percentual de detecção de VP/PP (16,4%) ou seja, um aumento relativo de 52% em comparação com a análise de *BRCA1/2* apenas (15,2%). Se considerarmos apenas o painel de genes acionáveis, o aumento também foi importante (7,6%).

Para o subtipo luminal detectamos 23,2% de VP/PP, sendo que mutações nos genes *BRCA1/2* foram encontradas em 6,5%, enquanto mutações nos outros 92 genes correspondem a 16,7%, destes, 4,5% em genes acionáveis, destacando-se que a contribuição do painel multigenes na detecção de mutações em outros genes não-*BRCA1/2* em tumores luminais foi importante (73% de aumento relativo).

Além disso, observamos que a proporção de mutações no gene *ATM* é significativamente maior em tumores luminais B HER2, conforme relatado anteriormente na literatura (Renault et al. 2018). Para esse subtipo, destacamos a expressiva contribuição do painel na detecção de mutações em genes acionáveis, aumentando significativamente esse percentual (17,5%). No geral, o painel contribuiu com um aumento no percentual de detecção de VP/PP para todos os subtipos moleculares de câncer de mama avaliados, quando comparados com análise isolada de *BRCA1/2*, com destaque para os subtipos luminal B HER2 (27,5%) e hiperexpressor de HER2 (23,1%).

Quanto à idade ao diagnóstico do câncer de mama, a média de idade ao diagnóstico foi menor nas pacientes com mutações nos genes *ATM* e *PALB2*, em comparação com os genes de alta penetrância como *BRCA1/2* e *TP53* e observamos idade média ao diagnóstico do gene *BRCA2* inferior ao gene *BRCA1*. Espera-se que a frequência das mutações diminua com o aumento da idade do diagnóstico de câncer de mama. Em nossa coorte, o maior percentual de pacientes com mutações identificadas, se encontrava na faixa etária abaixo de 45 anos.

Foram detectadas 30 VP/PP em genes de baixa penetrância para câncer de mama, sem correlação clínica com o fenótipo e esses dados foram considerados como achados incidentais. Análise de co-segregação e estudos de perda de heterozigose tumoral não foram realizados. Dentre esses, identificamos sete pacientes com VP/PP em heterozigose no gene *MUTYH*, cuja associação com o risco de câncer de mama é controversa. Alguns estudos relataram um risco aumentado de câncer de mama em portadores de mutações monoalélicas no gene *MUTYH* (Rennert et al. 2012; Win et al. 2016). No entanto, outros estudos não encontraram evidências estatísticas para o risco aumentado de câncer de mama (Beiner et al. 2009; Out et al. 2012).

Além disso, identificamos uma variante patogênica no gene *BLM* associado à Síndrome de Bloom, condição de herança autossômica recessiva caracterizada por baixa estatura pré e pós-natal, eritema telangiectásico na face, fotossensibilidade, microcefalia, entre outros achados. A síndrome é mais comum em na população Judia Ashkenazi devido à mutação fundadora c.2207_2212delinsTAGATTC, (p.Tyr736fs) conhecida como (*BLM^{Ash}*) (LI et al. 1998). Variantes patogênicas bialélicas no gene *BLM*, responsável pela codificação de uma das helicases RecQ, causam instabilidade cromossômica importante, levando ao aumento de risco para o desenvolvimento de vários tipos de câncer. Mutações patogênicas/provavelmente patogênicas em heterozigose no gene *BLM* têm sido associadas a um risco aumentado de câncer de mama e câncer colorretal, porém ainda sem evidências robustas (Baris et al. 2007; Thompson et al. 2012).

Ainda em relação aos genes de baixa penetrância, identificamos uma variante patogênica no em *BRIP1*, associado ao aumento de risco para câncer de ovário. Apesar de alguns estudos sugerirem aumento de risco para câncer de mama, ainda não há evidências robustas (Easton et al. 2016; Weber-Lassalle et al. 2018). A paciente de nossa coorte portadora da variante em *BRIP1*, não tinha história pessoal ou familiar de câncer de ovário.

Da mesma forma, identificamos uma variante patogênica no gene *RAD51C*, associado ao aumento de risco para câncer de ovário, em uma paciente sem história pessoal ou familiar de câncer de ovário.

Tivemos também 7 VP/PP em heterozigose identificadas em genes associados à Anemia de Fanconi, de herança autossômica recessiva, sendo *FANCA*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCI*, *FANCL* e *FANCM*, cuja associação de VP/PP em heterozigose com câncer hereditário ainda não é bem compreendida. Alguns estudos sugerem que variantes patogênicas de perda de função em heterozigose no gene *FANCM*, estão associadas a aumento de risco para câncer de mama (Neidhardt et al. 2017).

Dentre os demais genes de baixa penetrância identificados em nosso estudo temos o gene *FH* associado à Leiomiomatose Hereditária e Carcinoma de Células Renais de herança autossômica dominante identificado em paciente sem fenótipo associado, o gene *PHOX2B* possivelmente associado ao risco aumentado para o desenvolvimento de neuroblastoma ao longo da vida (Mosse et al 2004, Trochet et al. 2004); o gene *SBDS*, cuja presença de variantes patogênicas bialélicas estão associadas à síndrome de Shwachman-Diamond, caracterizada por disfunção pancreática exócrina, alterações hematológicas (citopenias e susceptibilidade à síndrome mielodisplásica e leucemia mielóide aguda) e alterações ósseas (Shwachman et al. 1964); o gene *PMS2*, associado à Síndrome de Lynch, identificado em paciente sem critérios Amsterdam e os genes *HNFI1A*, *PRF1*, *RECQL4*, e *SLX4* ainda sem

evidências robustas de associação com câncer hereditário. Resultados incidentais em painéis multigenes para câncer hereditário são um desafio para o aconselhamento genético, incluindo genes acionáveis com condutas clínicas definidas e genes cujo risco de câncer não é bem estabelecido.

Recentemente, foi descrita a Síndrome da Neoplasia Hereditária Multialélica (MINAS), síndrome caracterizada pela presença de duas ou mais VP/PP em genes relacionados à predisposição ao câncer, herdadas no mesmo indivíduo (Whitworth et al. 2016). São poucos os relatos dessa síndrome na literatura. Nós encontramos uma frequência de 3,7% entre as pacientes com presença de mutações patogênica/provavelmente patogênica, com as combinações *BRCA2/ATM*, *BRCA2/CHEK2* e *BRCA2/TP53* (incluindo a mutação fundadora brasileira). Um aspecto interessante dos pacientes com MINAS é observar se mutações combinadas estão associadas a um fenótipo mais grave (por exemplo, diagnóstico mais precoce de câncer ou vários tipos de câncer no mesmo indivíduo relacionado aos dois genótipos). Na literatura, já foram relatados pacientes com a combinação *BRCA2/TP53* (Manoukian et al. 2007; Monnerat et al. 2007). Uma sobreposição de fenótipos associados a ambos os genes foi observada em todos os nossos casos. Nas nossas pacientes, as combinações encontradas envolviam gene de alta e moderada penetrância para câncer de mama. Os fenótipos associados à MINAS podem ser mais fáceis de interpretar quando os dois genes envolvidos estão associados a um espectro tumoral diferente. Em geral, não se demonstraram evidências claras de um efeito sinérgico desses tipos de mutações na gravidade do fenótipo (Whitworth et al. 2016).

Uma das pacientes com fenótipo MINAS, apresentou a variante patogênica c.156_157insAlu em heterozigose no gene *BRCA2*, uma mutação fundadora de origem portuguesa, cujos estudos prévios apontam uma frequência de 0,65% na população brasileira (Felicio et al. 2018). Em nossa coorte, encontramos uma frequência de 0,31% dessa variante.

De acordo com estudos prévios, cerca de um terço dos painéis multigenes identifica pelo menos uma variante de significado incerto (VUS) em um ou mais genes (Kurian et al. 2009; Tung et al. 2015). Um estudo com 2.158 mulheres com câncer de mama encaminhadas para teste genético usando um painel de 25 genes, mostrou que VUS foram encontradas em 40% dos indivíduos (Tung et al. 2015). Outro estudo semelhante com 198 mulheres submetidas à realização de um painel de 42 genes mostrou que VUS foram identificadas em 88% dos pacientes (Kurian et al. 2009).

Em nossa série utilizando um painel de 94 genes, encontramos pelo menos uma VUS em 77,5% das pacientes, frequência maior que a encontrada na literatura. Espera-se que os painéis contendo um maior número de genes resultem em um maior índice de pacientes com

VUS. Além disso, como a maioria dos VUS representam variantes *missense* raras com baixas frequências alélicas ou não descritas em bancos de dados populacionais, prevê-se que populações menos caracterizadas geneticamente, como a brasileira, terão mais VUS identificadas. Nesse sentido, um estudo recente que avaliou mais de 100.000 testes genéticos de múltiplos genes em câncer hereditário revelou que, em comparação com europeus, indivíduos asiáticos e do Oriente Médio tinham maior probabilidade de serem identificados com uma VUS (Roberts et al. 2020).

Cabe salientar que o presente estudo apresenta algumas limitações. A análise de grandes deleções e duplicações através da técnica MLPA foi realizada apenas para os genes *BRCA1/2* e apenas uma deleção envolvendo os éxons 1 e 2 do gene *BRCA2* foi identificada. O painel de 94 genes que utilizamos não foi validado para análise de variações em número de cópias (CNV), não sendo possível avaliar a frequência dessas variações em nossa coorte. De acordo com a literatura, a prevalências de variações em número de cópias patogênicas em genes relacionados a câncer hereditário é de cerca de 8,3% (Truty et al. 2019). Também não foi possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo adequada para os genes de risco moderado e baixo para o câncer de mama, devido ao pequeno número de pacientes com mutações patogênicas/provavelmente patogênicas nesses genes.

Além disso, as pacientes incluídas em nosso estudo apresentavam critérios clínicos para SMOH, com história pessoal ou familiar que sugeria maior risco de câncer hereditário. Ao mesmo tempo, é possível que tenhamos excluído pacientes sem os critérios para SMOH e que poderiam apresentar mutações patogênicas/provavelmente patogênicas nos outros genes do painel. Estudos recentes tem recomendado que todas as pacientes com diagnóstico de câncer de mama realizem investigação com teste genético (Beitsch et al. 2019, Samadder et al. 2020). No estudo de Beitsch et al. (2019), das quase mil pacientes com câncer de mama incluídas, 49,95% apresentavam critérios clínicos da NCCN para indicação de teste genético e 50,05% não. Observou-se que das pacientes com critérios da NCCN, 9,39% tinham uma VP/PP contra 7,9% entre as pacientes sem critérios, indicando que quase metade das pacientes com câncer de mama que apresentam uma VP/PP em genes relacionados, não são identificadas pelas diretrizes atuais. No estudo realizado por Samadder et al. (2020) com quase três mil pacientes com diagnóstico de câncer (tumores sólidos) selecionados sem critérios clínicos determinados e submetidos a um painel de 80 genes, demonstrou-se que 13,3% dos pacientes apresentaram uma VP/PP e destes, 6,4% não teriam sido detectados considerando-se o histórico pessoal e familiar de câncer.

Em conclusão, nossos resultados indicam que, mulheres que preenchem os critérios clínicos para SMOH podem se beneficiar da realização de um painel multigenes, pois o

mesmo permite identificar VP/PP em outros genes de predisposição ao câncer de mama, incluindo os genes acionáveis, que impactam diretamente no manejo clínico e prevenção. Mais estudos ainda são necessários para melhor avaliação de desempenho do painel multigenes em mulheres com diagnóstico de câncer de mama, incluindo aquelas que não preenchem os critérios clínicos para SMOH, visando correlacionar o genótipo-fenótipo de genes de câncer de mama de risco moderado e baixo.

7 CONCLUSÕES

- Nesse estudo observamos que a realização do painel multigenes em pacientes com critérios para câncer de mama contribuiu na identificação VP/PP em genes não *BRCA1/2*, aumentando em 15,3% a positividade do teste genético.
- Levando-se em consideração apenas VP/PP nos 16 genes acionáveis preconizados pela ANS para análise de câncer hereditário, a taxa de detecção de VP/PP em nossa coorte foi de 16,8% identificando-se 6,9% a mais de mulheres em risco do que se apenas os genes *BRCA1/2* fossem avaliados.
- Destacamos também a contribuição do painel multigenes na detecção de mutações em tumores luminais B HER2, uma vez que a maioria das mutações identificadas nesse subtipo molecular de câncer de mama foram em genes acionáveis não-*BRCA1/2*, aumentando consideravelmente o percentual de detecção VP/PP nesses genes.
- Nossos resultados destacam a importância da realização do painel multigenes em nossa população, cujos resultados impactam diretamente no acompanhamento desses pacientes e familiares, uma vez que incluem outros genes acionáveis além de *BRCA1/2*, com estimativas de risco para câncer estabelecidas e estratégias de rastreamento e prevenção bem definidas.

8 REFERÊNCIAS

American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol*. 2003;21(12):2397-406.

Alemar B, Gregório C, Herzog J, Matzenbacher Bittar C, Brinckmann Oliveira Netto C, Artigalas O, et al. BRCA1 and BRCA2 mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population? *PLoS One*. 2017 Nov 21;12(11):e0187630.

Anglian Breast Cancer Study Group. Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *Br J Cancer*. 2000;83:1301–8.

Antoniou AC, Durocher F, Smith P, Simard J, Easton DF; INHERIT BRCAs program members. BRCA1 and BRCA2 mutation predictions using the BOADICEA and BRCAPRO models and penetrance estimation in high-risk French-Canadian families. *Breast Cancer Res*. 2006;8(1):R3.

Baris HN, Kedar I, Halpern GJ, Shohat T, Magal N, Ludman MD, et al. Prevalence of breast and colorectal cancer in Ashkenazi Jewish carriers of Fanconi anemia and Bloom syndrome. *Isr Med Assoc J*. 2007 Dec;9(12):847-50.

Beggs AD, Latchford AR, Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Aretz S, et al. Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. *Gut*. 2010;59:975–86.

Beiner ME, Zhang WW, Zhang S, Gallinger S, Sun P, Narod SA. Mutations of the MYH gene do not substantially contribute to the risk of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;114(3):575-8.

Beitsch PD, Whitworth PW, Hughes K, Patel R, Rosen B, Compagnoni G, et al. Underdiagnosis of Hereditary Breast Cancer: Are Genetic Testing Guidelines a Tool or an Obstacle? *J Clin Oncol*. 2019;37(6):453-460.

Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, de Leeuw WJ, van de Vijver M, Cornelisse C, et al. E-cadherin is a tumour/invasion suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J*. 1995;14:6107–15.

Birch JM, Alston RD, McNally RJ, Evans DG, Kelsey AM, Harris M, et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene*. 2001 Aug 2;20(34):4621-8.

Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman JM, Charbonnier C, Fermeij P, Belotti M, et al. Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers. *J Clin Oncol*. 2015 Jul 20;33(21):2345-52.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 Nov;68(6):394-424.

Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Aug 4;91(15):1310-6.

Brianese RC, Nakamura KDM, Almeida FGDSR, Ramalho RF, Barros BDF, Ferreira ENE, et al. BRCA1 deficiency is a recurrent event in early-onset triple-negative breast cancer: a comprehensive analysis of germline mutations and somatic promoter methylation. *Breast Cancer Res Treat*. 2018 Feb;167(3):803-14.

Bruwer A, Barga JA, Kierland RR. Surface pigmentation and generalized intestinal polyposis; (Peutz-Jeghers syndrome). *Proc Staff Meet Mayo Clin*. 1954 Mar 24;29(6):168-71.

Carraro DM, Koike Folgueira MA, Garcia Lisboa BC, Ribeiro Olivieri EH, Vitorino Krepischki AC, de Carvalho AF, et al. Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. *PLoS One*. 2013;8(3):e57581.

Cass I, Baldwin RL, Varkey T, Moslehi R, Narod SA, Karlan BY. Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. *Cancer*. 2003 May 1;97(9):2187-95.

Chen J, Bae E, Zhang L, Hughes K, Parmigiani G, Braun D, et al. Penetrance of Breast and Ovarian Cancer in Women Who Carry a BRCA1/2 Mutation and Do Not Use Risk-Reducing Salpingo-Oophorectomy: An Updated Meta-Analysis. *JNCI Cancer Spectr*. 2020 Apr 23;4(4):pkaa029.

Chen, LZ, Harris, PC, Apostolou, S, Baker E, Holman K, Lane SA, et al. A refined physical map of the long arm of human chromosome 16. *Genomics*. 1991 Jun;10(2):308-12.

Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D, Brugières L, Pagés S, Feunteun J, et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *J Med Genet*. 2001 Jan;38(1):43-7.

Chun HH, Gatti RA. Ataxia–telangiectasia, an evolving phenotype. *DNA Repair (Amst)*. 2004 Aug-Sep;3(8-9):1187-96.

Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer*. 1996 Jun 1;77(11):2318-24.

Couch FJ, Shimelis H, Hu C, Hart SN, Polley EC, Na J, et al. Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2017 Sep 1;3(9):1190-1196.

Couch FJ, Farid LM, DeShano ML, Tavtigian SV, Calzone K, Campeau L, et al. BRCA2 Germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nat Genet*. 1996 May;13(1):123-5.

Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. *Clin Oncol*. 2015 Feb 1;33(4):304-11.

Custódio G, Parise GA, Kiesel Filho N, Komechen H, Sabbaga CC, Rosati R, et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *J Clin Oncol*. 2013 Jul 10;31(20):2619-26.

Cybulski C, Górski B, Huzarski T, Masojć B, Mierzejewski M, Debniak T, et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet*. 2004 Dec;75(6):1131-5.

Cybulski C, Wokołorczyk D, Jakubowska A, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, et al. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. *J Clin Oncol*. 2011 Oct 1;29(28):3747-52.

da Silva FC, de Oliveira LP, Santos EM, Nakagawa WT, Aguiar Junior S, Valentin MD, et al. Frequency of extracolonic tumors in Brazilian families with Lynch syndrome: analysis of a hereditary colorectal cancer institutional registry. *Fam Cancer*. 2010 Dec;9(4):563-70.

de Souza Timoteo AR, Gonçalves AÉMM, Sales LAP, Albuquerque BM, de Souza JES, de Moura PCP, et al. A portrait of germline mutation in Brazilian at-risk for hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2018 Dec;172(3):637-646.

Easton DF, Lesueur F, Decker B, Michailidou K, Li J, Allen J, et al. No evidence that protein truncating variants in BRIP1 are associated with breast cancer risk: implications for gene panel testing. *J Med Genet*. 2016 May;53(5):298-309.

Euhus DM, Robinson L. Genetic predisposition syndromes and their management. *Surg Clin North Am*. 2013 Apr;93(2):341-62.

Evans DG, Howell A, Ward D, Lalloo F, Jones JL, Eccles DM. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in triple negative breast cancer. *J Med Genet*. 2011 Aug;48(8):520-2.

Felicio PS, Alemar B, Coelho AS, Berardinelli GN, Melendez ME, Lengert AVH, et al. Screening and characterization of BRCA2 c.156_157insAlu in Brazil: Results from 1380 individuals from the South and Southeast. *Cancer Genet.* 2018 Dec;228-229:93-97.

Finch AP, Lubinski J, Moller P, Singer CF, Karlan B, Senter L, et al. Impact of oophorectomy on cancer incidence and mortality in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *J Clin Oncol.* 2014 May 20;32(15):1547-53.

Fitzgerald RC, Hardwick R, Huntsman D, Carneiro F, Guilford P, Blair V, et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *J Med Genet.* 2010 Jul;47(7):436-44.

Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol.* 2005 Jan 10;23(2):276-92.

Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, Le Calvez-Kelm F, et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Hum Mutat.* 2010 Feb;31(2):143-50.

Giacomazzi J, Graudenz MS, Osorio CA, Koehler-Santos P, Palmero EI, Zagonel-Oliveira M, et al. Prevalence of the TP53 p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. *PLoS One.* 2014 Jun 17;9(6):e99893.

Goldgar DE, Easton DF, Byrnes GB, Spurdle AB, Iversen ES, Greenblatt MS; IARC Unclassified Genetic Variants Working Group. Genetic evidence and integration of various data sources for classifying uncertain variants into a single model. *Hum Mutat.* 2008 Nov;29(11):1265-72.

Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, Gu D, Wen-Fong CY, Nguyen VQ, et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol.* 2009 Mar 10;27(8):1250-6.

Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, et al. E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature*. 1998 Mar 26;392(6674):402-5.

Hall MJ, Forman AD, Pilarski R, Wiesner G, Giri VN. Gene panel testing for inherited cancer risk. *J Natl Compr Canc Netw*. 2014 Sep;12(9):1339-46.

Harach HR, Soubeyran I, Brown A, Bonneau D, Longy M. Thyroid pathologic findings in patients with Cowden disease. *Ann Diagn Pathol*. 1999 Dec;3(6):331-40.

Hartmann LC, Schaid DJ, Woods JE, Crotty TP, Myers JL, Arnold PG, et al. Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. *N Engl J Med*. 1999 Jan 14;340(2):77-84.

Hartmann LC, Sellers TA, Schaid DJ, Frank TS, Soderberg CL, Sitta DL, et al. Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Nov 7;93(21):1633-7.

Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJ, et al. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Cancer Res*. 2006 May 15;12(10):3209-15.

Heikkinen T, Kärkkäinen H, Aaltonen K, Milne RL, Heikkilä P, Aittomäki K, et al. The breast cancer susceptibility mutation PALB2 1592delT is associated with an aggressive tumor phenotype. *Clin Cancer Res*. 2009 May 1;15(9):3214-22.

Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*. 1998 Jan 8;391(6663):184-7.

Hodgson SV, Foulkes WD, Eng C, Maher ER. *A practical guide to human cancer genetics*. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2007. 3:410.

Isinger A, Bhat M, Borg A, Nilbert M. CHEK2 1100delC in patients with metachronous cancers of the breast and the colorectum. *BMC Cancer*. 2006 Mar 15;6:64.

Jarvik GP, Browning BL. Consideration of cosegregation in the pathogenicity classification of genomic variants. *Am J Hum Genet.* 2016 Jun 2;98(6):1077-1081.

Jeghers H, Mckusick VA, Katz KH. Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa, lips and digits; a syndrome of diagnostic significance. *N Engl J Med.* 1949 Dec 29;241(26):1031-6.

Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R, et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet.* 1998 Jan;18(1):38-43.

Kauff ND, Domchek SM, Friebel TM, Robson ME, Lee J, Garber JE, et al. Risk-reducing salpingo-oophorectomy for the prevention of BRCA1- and BRCA2-associated breast and gynecologic cancer: a multicenter, prospective study. *J Clin Oncol.* 2008 Mar 10;26(8):1331-7.

Kaurah P, MacMillan A, Boyd N, Senz J, De Luca A, Chun N, et al. Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA.* 2007 Jun 6;297(21):2360-72.

Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971 Apr;68(4):820-3.

Kurian AW, Antoniou AC, Domchek SM. Refining Breast Cancer Risk Stratification: Additional Genes, Additional Information. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2016;35:44-56.

Kurian AW, Hare EE, Mills MA, Kingham KE, McPherson L, Whittemore AS, et al. Clinical evaluation of a multiple-gene sequencing panel for hereditary cancer risk assessment. *J Clin Oncol.* 2014 Jul 1;32(19):2001-9.

LaDuca H, Stuenkel AJ, Dolinsky JS, Keiles S, Tandy S, Pesaran T, et al. Utilization of multigene panels in hereditary cancer predisposition testing: analysis of more than 2,000 patients. *Genet Med.* 2014 Nov;16(11):830-7.

Laloo F, Varley J, Ellis D, Moran A, O'Dair L, Pharoah P, et al. Early Onset Breast Cancer Study Group. Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. *Lancet*. 2003 Mar 29;361(9363):1101-2.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 1991 Jun 6;351(6326):453-6.

Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res*. 1988 Sep 15;48(18):5358-62.

Li FP, Fraumeni JF Jr. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Natl Cancer Inst*. 1969 Dec;43(6):1365-73.

Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms: a familial syndrome? *Ann Intern Med*. 1969 Oct;71(4):747-52.

Li L, Eng C, Desnick RJ, German J, Ellis NA. Carrier frequency of the Bloom syndrome b1mAsh mutation in the Ashkenazi Jewish population. *Mol Genet Metab*. 1998 Aug;64(4):286-90.

Li MM, Datto M, Duncavage EJ, Kulkarni S, Lindeman NI, Roy S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation and Reporting of Sequence Variants in Cancer: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology, American Society of Clinical Oncology, and College of American Pathologists. *J Mol Diagn*. 2017 Jan;19(1):4-23.

Liede A, Karlan BY, Narod SA. Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. *J Clin Oncol*. 2004 Feb 15;22(4):735-42.

Limacher JM, Frebourg T, Natarajan-Ame S, Bergerat JP. Two metachronous tumors in the radiotherapy fields of a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Int J Cancer*. 2001 Aug 20;96(4):238-42.

Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, Greene MH; National Cancer Institute, Division of Cancer Prevention, Community Oncology and Prevention Trials Research Group. Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes - second edition. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2008;(38):1-93.

Lynch HT, Boland CR, Gong G, Shaw TG, Lynch PM, Fodde R, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. *Eur J Hum Genet.* 2006 Apr;14(4):390-402.

Madanikia SA, Bergner A, Ye X, Blakeley JO. Increased risk of breast cancer in women with NF1. *Am J Med Genet A.* 2012 Dec;158A(12):3056-60.

Maistro S, Teixeira N, Encinas G, Katayama ML, Niewiadonski VD, Cabral LG, et al. Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in epithelial ovarian cancer patients in Brazil. *BMC Cancer.* 2016 Dec 3;16(1):934.

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science.* 1990 Nov 30;250(4985):1233-8.

Manoukian S, Peissel B, Pensotti V, Barile M, Cortesi L, Stacchiotti S, et al. Germline mutations of TP53 and BRCA2 genes in breast cancer/sarcoma families. *Eur J Cancer.* 2007 Feb;43(3):601-6.

Masciari S, Van den Abbeele AD, Diller LR, Rastarhuyeva I, Yap J, Schneider K, et al. F18-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography screening in Li-Fraumeni syndrome. *JAMA.* 2008 Mar 19;299(11):1315-9.

McCuaig JM, Armel SR, Novokmet A, Ginsburg OM, Demsky R, Narod SA, et al. Routine TP53 testing for breast cancer under age 30: ready for prime time? *Fam Cancer.* 2012 Dec;11(4):607-13.

Mersch J, Brown N, Pirzadeh-Miller S, Mundt E, Cox HC, Brown K, et al. Prevalence of variant reclassification following hereditary cancer genetic Testing. *JAMA*. 2018 Sep 25;320(12):1266-1274.

Metcalfe KA, Poll A, Royer R, Llacuachaqui M, Tulman A, Sun P, et al. Screening for founder mutations in BRCA1 and BRCA2 in unselected Jewish women. *J Clin Oncol*. 2010 Jan 20;28(3):387-91.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994 Oct 7;266(5182):66-71.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer Jose Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2019.

Monnerat C, Chompret A, Kannengiesser C, Avril MF, Janin N, Spatz A, et al. BRCA1, BRCA2, TP53, and CDKN2A germline mutations in patients with breast cancer and cutaneous melanoma. *Fam Cancer*. 2007;6(4):453-61.

Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D, Carlisle AJ, Winter CL, Rappaport E, et al. Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet*. 2004 Oct;75(4):727-30.

National Comprehensive Cancer Network-NCCN. Clinical practice guidelines in oncology: genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian. Version 2 2021 Disponível em: <https://bit.ly/382sNy2>. [2020 out 12].

Neidhardt G, Hauke J, Ramser J, Groß E, Gehrig A, Müller CR, et al. Association Between Loss-of-Function Mutations Within the FANCM Gene and Early-Onset Familial Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2017 Sep 1;3(9):1245-1248.

Offit K. Clinical cancer genetics: risk counseling and management. New York: Wiley-Liss; 1998. The common hereditary cancers. Part A: Breast cancer syndromes; p.66-115.

Orloff MS, Eng C. Genetic and phenotypic heterogeneity in the PTEN hamartoma tumour syndrome. *Oncogene*. 2008 Sep 18;27(41):5387-97.

Osorio A, de la Hoya M, Rodríguez-López R, Martínez-Ramírez A, Cazorla A, Granizo JJ, et al. Loss of heterozygosity analysis at the BRCA loci in tumor samples from patients with familial breast cancer. *Int J Cancer*. 2002 May 10;99(2):305-9.

Out AA, Wasielewski M, Huijts PE, van Minderhout IJ, Houwing-Duistermaat JJ, Tops CM, et al. MUTYH gene variants and breast cancer in a Dutch case-control study. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Jul;134(1):219-27.

Paixão D, Guimarães MD, de Andrade KC, Nóbrega AF, Chojniak R, Achatz MI. Whole-body magnetic resonance imaging of Li-Fraumeni syndrome patients: observations from a two rounds screening of Brazilian patients. *Cancer Imaging*. 2018 Aug 14;18(1):27.

Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, Olivier M, Martel-Planche G, et al. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett*. 2008 Mar 8;261(1):21-5.

Peutz J. Very remarkable case of familial polyposis of mucous membrane of intestinal tract and nasopharynx accompanied by peculiar pigmentation of skin and mucous membrane. *Nederl Maandschr Geneesk* 1921;10:134e46.

Pharoah PD, Guilford P, Caldas C. International Gastric Cancer Linkage Consortium. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*. 2001 Dec;121(6):1348-53.

Pilarski R, Burt R, Kohlman W, Pho L, Shannon KM, Swisher E. Cowden syndrome and the PTEN hamartoma tumor syndrome: systematic review and revised diagnostic criteria. *J Natl Cancer Inst*. 2013 Nov 6;105(21):1607-16.

Pinto EM, Figueiredo BC, Chen W, Galvao HCR, Formiga MN, Fragoso MCBV, et al. XAF1 as a modifier of p53 function and cancer susceptibility. *Sci Adv*. 2020 Jun 24;6(26):eaba3231.

Pommier Y, Sordet O, Rao VA, Zhang H, Kohn KW. Targeting chk2 kinase: molecular interaction maps and therapeutic rationale. *Curr Pharm Des.* 2005;11(22):2855-72.

Pritchard CC, Smith C, Salipante SJ, Lee MK, Thornton AM, Nord AS, et al. ColoSeq provides comprehensive lynch and polyposis syndrome mutational analysis using massively parallel sequencing. *J Mol Diagn.* 2012 Jul;14(4):357-66.

Rahman N, Seal S, Thompson D, Kelly P, Renwick A, Elliott A, et al. PALB2, which encodes a BRCA2-interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. *Nat Genet.* 2007 Feb;39(2):165-7.

Rainville IR, Rana HQ. Next-generation sequencing for inherited breast cancer risk: counseling through the complexity. *Curr Oncol Rep.* 2014 Mar;16(3):371.

Rebbeck TR, Kauff ND, Domchek SM. Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2009 Jan 21;101(2):80-7.

Reid S, Schindler D, Hanenberg H, Barker K, Hanks S, Kalb R, et al. Biallelic mutations in PALB2 cause Fanconi anemia subtype FA-N and predispose to childhood cancer. *Nat Genet.* 2007 Feb;39(2):162-4.

Renault AL, Mebirouk N, Fuhrmann L, Bataillon G, Cavaciuti E, Le Gal D, et al. Morphology and genomic hallmarks of breast tumours developed by ATM deleterious variant carriers. *Breast Cancer Res.* 2018 Apr 17;20(1):28.

Rennert G, Lejbkowitz F, Cohen I, Pinchev M, Rennert HS, Barnett-Griness O. MUTYH mutation carriers have increased breast cancer risk. *Cancer.* 2012 Apr 15;118(8):1989-93.

Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015 May;17(5):405-24.

Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Kwan E, et al. Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet.* 2001 Mar;68(3):700-10.

Roberts ME, Susswein LR, Janice Cheng W, Carter NJ, Carter AC, Klein RT, et al. Ancestry-specific hereditary cancer panel yields: Moving toward more personalized risk assessment. *J Genet Couns.* 2020 Aug;29(4):598-606.

Robson ME, Bradbury AR, Arun B, Domchek SM, Ford JM, Hampel HL, et al. American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility. *J Clin Oncol.* 2015 Nov 1;33(31):3660-7.

Rosenthal ET, Evans B, Kidd J, Brown K, Goringe H, van Orman M, et al. Increased Identification of Candidates for High-Risk Breast Cancer Screening Through Expanded Genetic Testing. *J Am Coll Radiol.* 2017 Apr;14(4):561-568.

Samadder NJ, Riegert-Johnson D, Boardman L, Rhodes D, Wick M, Okuno S, et al. Comparison of Universal Genetic Testing vs Guideline-Directed Targeted Testing for Patients With Hereditary Cancer Syndrome. *JAMA Oncol.* 2020 Oct 30:e206252.

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science.* 1995 Jun 23;268(5218):1749-53.

Seal S, Thompson D, Renwick A, Elliott A, Kelly P, Barfoot R, et al. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. *Nat Genet.* 2006 Nov;38(11):1239-41.

Shwachman H, Diamond LK, Oski FA, Khaw KT. The syndrome of pancreatic insufficiency and bone marrow dysfunction. *J pediatr.* 1964 nov;65:645-63.

Silva FC, Lisboa BC, Figueiredo MC, Torrezan GT, Santos EM, Krepischi AC, et al. Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. *BMC Med Genet.* 2014 May 15;15:55.

Slavin TP, Niell-Swiler M, Solomon I, Nehoray B, Rybak C, Blazer KR, et al. Clinical Application of Multigene Panels: Challenges of Next-Generation Counseling and Cancer Risk Management. *Front Oncol.* 2015 Sep 29;5:208.

Srivastava S, Zou ZQ, Pirolo K, Blattner W, Chang EH. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature.* 1990 Dec 20-27;348(6303):747-9.

Starink TM, van der Veen JP, Arwert F, de Waal LP, de Lange GG, Gille JJ, et al. The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients. *Clin Genet.* 1986 Mar;29(3):222-33.

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet.* 1997 Apr;15(4):356-62.

Strong LC. General keynote: hereditary cancer: lessons from Li-Fraumeni syndrome. *Gynecol Oncol.* 2003 Jan;88(1 Pt 2):S4-7; discussion S11-3.

Susswein LR, Marshall ML, Nusbaum R, Vogel Postula KJ, Weissman SM, Yackowski L, et al. Pathogenic and likely pathogenic variant prevalence among the first 10,000 patients referred for next-generation cancer panel testing. *Genet Med.* 2016 Aug;18(8):823-32.

Tai YC, Domchek S, Parmigiani G, Chen S. Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Dec 5;99(23):1811-4.

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 1991 Mar 22;251(5000):1451-5.

Tan MH, Mester JL, Ngeow J, Rybicki LA, Orloff MS, Eng C. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clin Cancer Res.* 2012 Jan 15;18(2):400-7.

Thompson D, Duedal S, Kirner J, McGuffog L, Last J, Reiman A, et al. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jun 1;97(11):813-22.

Thompson D, Easton DF; Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Sep 18;94(18):1358-65.

Thompson ER, Doyle MA, Ryland GL, Rowley SM, Choong DY, Tothill RW, et al. Exome sequencing identifies rare deleterious mutations in DNA repair genes FANCC and BLM as potential breast cancer susceptibility alleles. *PLoS Genet.* 2012 Sep;8(9):e1002894.

Thompson ER, Rowley SM, Li N, McInerney S, Devereux L, Wong-Brown MW, et al. Panel Testing for Familial Breast Cancer: Calibrating the Tension Between Research and Clinical Care. *J Clin Oncol.* 2016 May 1;34(13):1455-9.

Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Bouvignies E, et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. *J Clin Oncol.* 2009 Sep 10;27(26):e108-9; author reply e110.

Trepanier A, Ahrens M, McKinnon W, Peters J, Stopfer J, Grumet SC, et al. Genetic cancer risk assessment and counseling: recommendations of the national society of genetic counselors. *J Genet Couns.* 2004 Apr;13(2):83-114.

Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, Deville A, de Pontual L, Schleiermacher G, et al. Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet.* 2004 Apr;74(4):761-4.

Truty R, Paul J, Kennemer M, Lincoln SE, Olivares E, Nussbaum RL, et al. Prevalence and properties of intragenic copy-number variation in Mendelian disease genes. *Genet Med.* 2019 Jan;21(1):114-123.

Tucker T, Friedman JM. Pathogenesis of hereditary tumors: beyond the "two-hit" hypothesis. *Clin Genet.* 2002 Nov;62(5):345-57.

Tung N, Battelli C, Allen B, Kaldate R, Bhatnagar S, Bowles K, et al. Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA1 and BRCA2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. *Cancer*. 2015 Jan 1;121(1):25-33.

Tung N, Domchek SM, Stadler Z, Nathanson KL, Couch F, Garber JE, et al. Counselling framework for moderate-penetrance cancer-susceptibility mutations. *Nat Rev Clin Oncol*. 2016 Sep;13(9):581-8.

Tung N, Lin NU, Kidd J, Allen BA, Singh N, Wenstrup RJ, et al. Frequency of germline mutations in 25 cancer susceptibility genes in a sequential series of patients with breast cancer. *J Clin Oncol*. 2016 May 1;34(13):1460-8.

Turnbull C, Rahman N. Genetic predisposition to breast cancer: past, present, and future. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:321-45.

Villani A, Tabori U, Schiffman J, Shlien A, Beyene J, Druker H, et al. Biochemical and imaging surveillance in germline TP53 mutation carriers with Li-Fraumeni syndrome: a prospective observational study. *Lancet Oncol*. 2011 Jun;12(6):559-67.

Walsh T, Lee MK, Casadei S, Thornton AM, Stray SM, Pennil C, et al. Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jul 13;107(28):12629-33.

Weber-Lassalle N, Hauke J, Ramser J, Richters L, Groß E, Blümcke B, et al. BRIP1 loss-of-function mutations confer high risk for familial ovarian cancer, but not familial breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2018 Jan 24;20(1):7.

Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol*. 2008 Feb 1;26(4):542-8

Whittemore AS, Gong G, John EM, McGuire V, Li FP, Ostrow KL, et al. Prevalence of BRCA1 mutation carriers among U.S. non-Hispanic Whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Dec;13(12):2078-83.

Whitworth J, Skytte AB, Sunde L, Lim DH, Arends MJ, Happerfield L, et al. Multilocus inherited neoplasia alleles syndrome: a case series and review. *JAMA Oncol.* 2016 Mar;2(3):373-9.

Win AK, Lindor NM, Young JP, Macrae FA, Young GP, Williamson E, et al. Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in lynch syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 2012 Sep 19;104(18):1363-72.

Win AK, Reece JC, Dowty JG, Buchanan DD, Clendenning M, Rosty C, et al. Risk of extracolonic cancers for people with biallelic and monoallelic mutations in *MUTYH*. *Int J Cancer.* 2016 Oct 1;139(7):1557-63.

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. *Science.* 1994 Sep 30;265(5181):2088-90.

Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, et al. Control of *BRCA2* cellular and clinical functions by a nuclear partner, *PALB2*. *Mol Cell.* 2006 Jun 23;22(6):719-729.

Yang X, Leslie G, Doroszk A, Schneider S, Allen J, Decker B, et al. Cancer Risks Associated With Germline *PALB2* Pathogenic Variants: An International Study of 524 Families. *J Clin Oncol.* 2020 Mar 1;38(7):674-685.

Young SR, Pilarski RT, Donenberg T, Shapiro C, Hammond LS, Miller J, et al. The prevalence of *BRCA1* mutations among young women with triple-negative breast cancer. *BMC Cancer.* 2009 Mar 19;9:86.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **23/01/2018**, **aprovaram** a realização do projeto nº **2483/18** intitulado: **“Avaliação de painel multigenes em mulheres brasileiras com câncer de mama.”**

Pesquisador responsável: Dirce Maria Carraro.

Aluna: Daniele Paixão Pereira (Doutorado)

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 30 de janeiro de 2018.

Atenciosamente,



Dra. Sandra Caíres Serrano

2ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Apêndice 1 – 94 genes contidos no Painel realizado no Laboratório de Diagnóstico Genômico
- Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center

1	<i>AIP</i>
2	<i>ALK</i>
3	<i>APC</i>
4	<i>ATM</i>
5	<i>BAP1</i>
6	<i>BLM</i>
7	<i>BMPRIA</i>
8	<i>BRCA1</i>
9	<i>BRCA2</i>
10	<i>BRIP1</i>
11	<i>BUB1B</i>
12	<i>CDC73</i>
13	<i>CDH1</i>
14	<i>CDK4</i>
15	<i>CDKN1C</i>
16	<i>CDKN2A</i>
17	<i>CEBPA</i>
18	<i>CEP57</i>
19	<i>CHEK2</i>
20	<i>CYLD</i>
21	<i>DDB2</i>
22	<i>DICER1</i>
23	<i>DIS3L2</i>
24	<i>EGFR</i>
25	<i>EPCAM</i>
26	<i>ERCC2</i>
27	<i>ERCC3</i>
28	<i>ERCC4</i>
29	<i>ERCC5</i>
30	<i>EXT1</i>
31	<i>EXT2</i>
32	<i>EZH2</i>
33	<i>FANCA</i>
34	<i>FANCB</i>
35	<i>FANCC</i>
36	<i>FANCD2</i>
37	<i>FANCE</i>
38	<i>FANCF</i>
39	<i>FANCG</i>
40	<i>FANCI</i>
41	<i>FANCL</i>
42	<i>FANCM</i>
43	<i>FH</i>
44	<i>FLCN</i>
45	<i>GATA2</i>
46	<i>GPC3</i>
47	<i>HNF1A</i>
48	<i>HRAS</i>
49	<i>KIT</i>
50	<i>MAX</i>
51	<i>MEN1</i>

52	<i>MET</i>
53	<i>MLH1</i>
54	<i>MSH2</i>
55	<i>MSH6</i>
56	<i>MUTYH</i>
57	<i>NBN</i>
58	<i>NF1</i>
59	<i>NF2</i>
60	<i>NSD1</i>
61	<i>PALB2</i>
62	<i>PHOX2B</i>
63	<i>PMS1</i>
64	<i>PMS2</i>
65	<i>PRF1</i>
66	<i>PRKARIA</i>
67	<i>PTCH1</i>
68	<i>PTEN</i>
69	<i>RAD51C</i>
70	<i>RAD51D</i>
71	<i>RB1</i>
72	<i>RECQL4</i>
73	<i>RET</i>
74	<i>RHBDF2</i>
75	<i>RUNX1</i>
76	<i>SBDS</i>
77	<i>SDHAF2</i>
78	<i>SDHB</i>
79	<i>SDHC</i>
80	<i>SDHD</i>
81	<i>SLX4</i>
82	<i>SMAD4</i>
83	<i>SMARCB1</i>
84	<i>STK11</i>
85	<i>SUFU</i>
86	<i>TMEM127</i>
87	<i>TP53</i>
88	<i>TSC1</i>
89	<i>TSC2</i>
90	<i>VHL</i>
91	<i>WRN</i>
92	<i>WT1</i>
93	<i>XPA</i>
94	<i>XPC</i>

Apêndice 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para as pacientes incluídas no projeto.

A.C.Camargo Cancer Center - Fundação Antônio Prudente

Rua Prof. Antônio Prudente, 211 - Liberdade - São Paulo, SP. Fone: 2189-5172

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos - Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) No 466, de 12 de dezembro de 2012, e Res CNS 251/97 do Ministério da Saúde.

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PARTICIPANTE:

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: M F DATA

NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL:

.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:SEXO : M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº

BAIRRO:.....CIDADE:.....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

II. DADOS SOBRE O ESTUDO

O presente estudo, intitulado “**AVALIAÇÃO DE PAINEL MULTIGENES EM MULHERES BRASILEIRAS COM CÂNCER DE MAMA**”, é um projeto de pesquisas do Centro Internacional de Pesquisas e do Núcleo de Oncogenética do AC Camargo Cancer Center, sob responsabilidade da Dra. Dirce Maria Carraro e da Dra. Maria Nirvana da Cruz Formiga.

1. Explicações do pesquisador ao participante ou seu representante legal

O Departamento de Oncogenética convida você a participar deste estudo porque você realizou um teste genético para câncer de mama (genes *BRCA1* e *BRCA2*) no Laboratório de Diagnóstico Genômico deste hospital a pedido de seu médico. Neste estudo, será analisado o resultado do seu teste genético e se o resultado do teste foi negativo para mutações reconhecidamente patogênicas nos genes analisados, nós oferecemos a possibilidade de você ser submetida a um teste genético mais ampliado que avalia outros 92 genes associados também a um risco aumentando de desenvolvimento de câncer, chamado painel multigenes. Como você já realizou um teste em nosso laboratório, nós utilizaremos dados do seu exame anterior e o seu material genético (DNA) que está disponível no laboratório, e não será preciso nova coleta de sangue. Como se trata de uma pesquisa que poderá gerar resultados de seu interesse, nós precisamos que você assine este termo de consentimento para que você possa participar e receber o resultado da pesquisa.

2. Objetivos da pesquisa

O objetivo deste estudo é identificar mutações patogênicas (ou seja, que aumentam o risco para câncer) em outros 92 genes (diferentes dos genes *BRCA1* e *BRCA2*), alguns associados com câncer de mama e outros associados a outros tipos de câncer. Esses outros genes estão contidos num exame chamado painel multigenes, que é usado para avaliação de mutação patogênica em vários genes relacionados a um maior risco de desenvolver câncer. É um exame relativamente novo e está sujeito a mudanças frequentes para melhorias. É importante esclarecer que estes testes são complexos e que para algumas alterações encontradas, não há estudos e nem evidências científicas suficientes para garantir que a alteração encontrada esteja aumentando o risco de desenvolvimento de câncer na sua família.

A tecnologia que empregamos no seu teste é considerada uma das mais avançadas no momento, no entanto, não é isenta da possibilidade de ocorrência de falhas na obtenção dos resultados.

Como se trata de uma área em constante aprimoramento, a utilização de dados resultantes deste teste ou reanálises dos dados gerados poderão ser úteis para publicações com finalidades científicas, que são fundamentais para contribuir com o conhecimento na área de câncer e, conseqüentemente, na ajuda ao combate e enfrentamento desta doença. Os dados só serão publicados de forma totalmente anônima preservando sua identidade.

3. Procedimentos que serão utilizados e propósitos

Caso você concorde em participar, você passará pelo aconselhamento genético pré-teste realizado pela Dra. Daniele Paixão ou pela Dra. Maria Nirvana Formiga do Departamento de Oncogenética do AC Camargo Cancer Center, para entender as implicações dos resultados. Quando o resultado do teste for liberado, você será convidado a receber o resultado juntamente com uma consulta de aconselhamento genético pós-teste.

Se concordar em participar, você deverá preencher e assinar esse documento (Termo de Consentimento) apresentado pelo médico no momento da consulta, em 2 vias. Uma ficará em seu poder e a outra será arquivada pelo pesquisador.

Esclarecemos ainda que você tem toda a liberdade de participar ou não do estudo, e sua decisão, seja ela qual for, não afetará de nenhum modo o seu tratamento. Caso você concorde, esta será uma colaboração voluntária, não havendo nenhuma forma de remuneração por isto. A qualquer momento, mesmo que você já tenha concordado em participar e fornecido a sua assinatura, você tem toda a liberdade de desistir e solicitar o descarte das amostras, sem que isso ocasione qualquer prejuízo a você ou ao seu familiar.

4. Complicações e riscos esperados

O resultado do teste genético pode causar angústias e ansiedade, porém nenhum dano físico imediato ou tardio, que comprometa a sua saúde, poderá ser decorrente deste estudo.

5. Benefícios que poderão ser obtidos

Caso seja encontrada alguma mutação patogênica em algum gene de risco para câncer, isso pode ajudar a seu médico a fazer um rastreamento mais adaptado para seu risco hereditário e oferecer essa informação para identificar os familiares que podem ter a mesma herança para risco aumentado de câncer. Podem também ser encontrados resultados de significado incerto, o que não mudará seu acompanhamento, mas permitirá um melhor entendimento dos fatores que podem causar o aparecimento e a evolução do câncer hereditário, desta forma, pode ajudar no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e tratamento mais eficazes no futuro.

6. Salvaguarda de confidencialidade, sigilo e privacidade

A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter seu anonimato. Os dados obtidos pela análise do seu material genético são confidenciais, não sendo divulgada a identificação de nenhum participante ainda que informações dos resultados obtidos sejam utilizadas para publicação.

III. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo, conforme definidos acima, consinto em participar do Projeto de Pesquisa intitulado “**Avaliação de painel multigenes em mulheres brasileiras com câncer de mama**”.

São Paulo, _____ de _____ de 201____.

Assinatura do participante ou responsável legal

Assinatura do Pesquisador

Em caso de dúvidas, por favor entre em contato com a Dra. Dirce Maria Carraro no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C.Camargo Cancer Center pelo telefone: (11) 2198-5023.

Se a pesquisadora responsável não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer – A. C. Camargo/SP pelo telefone (11) 2189-5000, ramais 2069 ou 5020. De segunda-feira à quinta-feira das 7 horas às 18 horas e sexta-feira das 7 horas às 16 horas.