UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

Instituto de Biociências
de Botucatu - Unesp

Mutações em genes de predisposição para câncer de mama em pacientes brasileiros de risco.

Daíse Moreno Sás

Botucatu – SP
2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Mutações em genes de predisposição para câncer de mama em pacientes brasileiros de risco.

Mestranda: Daíse Moreno Sás
Orientador: Prof. Dr. Paulo Eduardo Martins Ribolla

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção o título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética).

Botucatu – SP
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Sás, Daíse Moreno.
Mutações em genes de predisposição para câncer de mama em pacientes brasileiros de risco / Daíse Moreno Sás. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla
Capes: 20205007

1. Mamas - Câncer. 2. Mutagênese. 3. Doenças hereditárias. 4. Análise de DNA. 5. Pacientes - Pesquisa.

Palavras-chave: Câncer de mama; Câncer hereditário; Mutações; Pacientes brasileiros; Teste genético.

Dedicatória

À minha irmã Roberta (*in memorian*), meu exemplo e maior incentivadora.

Agradecimentos

Aos meus pais, Izabel e José Roberto, pelo amor, carinho, apoio e confiança.

Às minhas irmãs, Karina e Roberta, (*in memorian*) pela amizade e pelo amor.

À toda a minha família e amigos, que são os mais especial de todos.

Ao meu noivo Caio pelo incentivo, amor, carinho, amizade e principalmente pela paciência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo, pela oportunidade, apoio e confiança.

À todos os amigos do Laboratório Pangene e do Laboratório Genotyping, pela ajuda e pela amizade.

À Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu, pela estrutura cedida.

Ao Laboratório Genotyping pela participação no estudo e pelos dados cedidos.

À Comissão Examinadora, pela disponibilidade e pelas sugestões, comentários e críticas que com toda certeza em muito contribuirão para o enriquecimento desse trabalho.

Às pacientes que aceitaram fazer parte desse estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro concedido em parte deste estudo.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Câncer de Mama Hereditário 1
1.2 Testes Genéticos para Câncer de Mama Hereditário 4
2 OBJETIVO 7
3 MATERIAL E MÉTODOS 9
3.1 Seleção dos Pacientes 9
3.2 O teste genético 9
3.3 Procedimentos Laboratoriais 9
3.3.1 Extração do DNA 9
3.3.2 Construção das bibliotecas de DNA 10
3.4 Análise dos dados 11
4 RESULTADOS 13
4.1 Análise geral dos pacientes 14
4.2 Variantes Identificadas 14
4.3 Variantes Patogênicas 14
4.4 Variantes de Significado Incerto (VUS) 16
5 DISCUSSÃO 22
5.1 Mutações patogênicas 22
5.1.1 Frequência da mutações patogênicas 22
5.1.2 Mutações patogênicas genes *BRCA1* e *BRCA2* 22
5.1.3 Mutações patogênicas no gene *ATM* 23
5.1.4 Mutações patogênicas no gene *BRIP1* 24
5.1.5 Mutações patogênicas no gene *CDH1* 24
5.1.6 Mutações patogênicas no gene *CHEK2* 25
5.1.7 Mutações patogênicas no gene *MUTYH* 25
5.1.8 Mutações patogênicas no gene *PALB2* 26
5.1.9 Mutações patogênicas no gene *PMS2* 26
5.1.10 Mutações patogênicas no gene *RAD51C* 27
5.1.11 Mutações patogênicas no gene *TP53* 27
5.2 Mutações de efeito desconhecido (VUS) 28
6 CONCLUSÃO 30
7 REFERÊNCIAS 33
8 ANEXOS 41
8.1 ANEXO1 41
8.2 ANEXO2 42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da maquinaria de reparo em do DNA pela via BRCA. Revisão dos genes de susceptibilidade ao câncer de mama e ovário e suas funções no reparo do DNA e os mecanismos moleculares subjacentes que envolvem interação dos genes da Anemia Fanconi, os genes *mismatch repair* e outros genes de reparo de DNA com os genes *BRCA1* e *BRCA2* [15] 2

Figura 2: Esquema ilustrando o tratamento do DNA genômico com a transposase e marcação dos fragmentos com sequencias específicas para cada paciente 10

Figura 3: Esquema ilustrando a desnaturação dos fragmentos de DNA, hibridização com as sondas marcadas com biotina e captura com *beads* de estreptavidina 11

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Genes de susceptibilidade para câncer de mama 3

Tabela 2: Critérios de Classificação de Variantes 12

Tabela 3: Variantes detectadas nos pacientes, classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas 15

Tabela 4: Variantes detectadas nos pacientes, classificadas como de significado incerto 17

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distibuição por gene das variantes patogênicas 16

Gráfico 2: Distribuição por gene das variantes de significado incerto 20

RESUMO

O câncer de mama é a forma mais comum de câncer e a segundo causa mais comum de morte por uma doença neoplásica afetando mulheres. Há uma série de fatores de risco reconhecidos para o desenvolvimento do câncer de mama incluindo fatores hereditários, hormonais, reprodutivos e história menstrual, idade, falta de exercício, álcool, radiação, doença benigna da mama, e obesidade. Embora aproximadamente 10% a 30% dos casos de câncer de mama sejam atribuídos a fatores hereditários, apenas 5% a 10% dos casos são identificados com um componente hereditário forte, e apenas uma pequena fração desses (4% a 5%) são explicados por mutações em genes de alta penetrância em uma herança autossômica dominante. Grande parte dos casos de câncer de mama hereditário são atribuídos a mutações germinativas nos genes de alta penetrância *BRCA1* e *BRCA2*, responsáveis pela Síndrome de Câncer de Mama o Ovário Hereditários. Vários estudos têm identificado outros genes de susceptibilidade para o câncer de mama com alta penetrância, mas alguns casos de forte indício para uma síndrome hereditária como causa dos tumores de mama o resultado é negativo para mutações nestes genes. Recentemente, outros genes e marcadores polimórficos comuns também foram associados com aumento pequeno ou moderado no risco para câncer de mama. O sequenciamento de nova geração (NGS) permite analisar múltiplos genes simultaneamente em testes no formato de painéis, a um custo reduzido em comparação com o sequenciamento pela metodologia de Sanger. No entanto, informações clínicas relevantes sobre as variantes encontradas nestes testes estendidos não mantiveram o mesmo ritmo da tecnologia de sequenciamento. Faltam informações importantes como a penetrância das variantes genéticas (em particular, de variantes missense) e o manejo clínico adequado dos portadores destas mutações. O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de modificações genéticas em 17 genes de predisposição para câncer de mama em pacientes brasileiros de risco, indicados para teste genético. O teste genético compreendeu a análise do DNA dos pacientes utilizando um painel oncológico chamado *TruSight™ Cancer Sequencing Panel* desenvolvido pela *Illumina•*. Os dados gerados a partir do sequenciamento NGS foram analisados por ferramentas de bioinformática, utilizando os comandos do programa *MiSeq Reporter - Illumina•*. Uma mutação considerada patogênica foi detectada em 11 dos 17 genes analisados, em 34 dos 319 pacientes estudados (10,7%). Os genes *BRCA1* (31,25%) e *BRCA2* (25%) foram os que mais se apresentaram mutados nos pacientes em estudo, seguidos pelo gene *PALB2* (9,38%). Nenhuma mutação patogênica foi detectada nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PTEN* e *RAD51D*. 80 variantes de significado incerto foram identificadas, em 72 dos 319 pacientes e em 15 dos 17 genes analisados. Acreditamos que este estudo seja o primeiro e mais abrangente descrevendo a prevalência de mutações nestes genes em pacientes brasileiros. Dados publicados sobre os resultados de testes baseados em painéis para genes de câncer da mama hereditário são atualmente muito limitados, mas nos últimos anos essas pesquisas estão ganhando grande dedicação em todo o mundo. Quando dados adicionais sobre o desempenho clínico destes painéis se tornarem disponíveis, acreditamos que serão estabelecidas diretrizes de consenso sobre o uso dos testes e o manejo ideal dos pacientes e o presente estudo contribuirá para este importante avanço.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common form of cancer and the second most common cause of death from a neoplastic disease affecting women. There are a number of recognized risk factors for the development of breast cancer including hereditary factors, hormonal, reproductive and menstrual history, age, lack of exercise, alcohol, radiation, benign breast disease, and obesity. Although approximately 10% to 30% of breast cancer cases are attributed to hereditary factors, only 5% to 10% of cases are identified with a strong genetic component, and only a small fraction of these (4% to 5%) are explained by mutations in high penetrance genes in an autosomal dominant inheritance. Most cases of hereditary breast cancer are attributed to germline mutations in high penetrance genes *BRCA1* and *BRCA2* that are responsible for Breast Cancer Ovary Syndrome the hereditary. Several studies have identified other susceptibility genes for breast cancer with high penetrance, but some cases of strong evidence for a hereditary syndrome as a cause of breast tumors the result is negative for mutations in these genes. Recently, other genes and common polymorphic markers were also associated with small or moderate increase in risk for breast cancer. The next generation sequencing (NGS) allows the analysis of multiple genes simultaneously in tests on panels format whit a reduced cost compared to sequencing by the Sanger methodology. However, relevant clinical information about variants found in these extended tests have not kept the same pace of sequencing technology. Important information such as penetrance genetic variants (in particular, missense variants) and the appropriate clinical management of carriers of these mutations are not availabe. The aim of this study was to evaluate the occurrence of genetic changes in 17 breast cancer predisposition genes in Brazilian risk patients, suitable for genetic testing. Genetic testing included analysis of the DNA of patients using an oncology panel called TruSight ™ Cancer Sequencing Panel developed by Illumina•. The data generated from NGS sequencing were analyzed by bioinformatics tools, using commands of the program MiSeq Reporter-Illumina•. We detected a pathogenic mutationin 11 out of 17 analyzed genes, in 34 of 319 patients (10.7%). The BRCA1 (31.25%) and BRCA2 (25%) genes were the most frequently altered in the patients studied followed by PALB2 (9.38%). No pathogenic mutation was detected in the MLH1, MSH2, MSH6, PTEN and RAD51D genes. 80 variants of uncertain significance were identified in 72 of 319 patients and in 15 of the 17 analyzed genes. We believe that this study is the first and most comprehensive describing the prevalence of mutations in these genes in Brazilian patients. Published data on the results of tests based on panels for hereditary breast cancer genes are currently very limited, but in recent years these surveys are gaining great dedication around the world. When additional data on the clinical performance of these panels become available, we believe that consensus guidelines will be established on the use of tests and the optimal management of patients and this study will contribute to this important advance.

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de Mama Hereditário

O câncer é uma doença genética que se desenvolve a partir de um acúmulo de mutações em múltiplos genes que normalmente regulam o crescimento, a manutenção e a sobrevivência celular [1].

O câncer de mama é a forma mais comum de câncer e a segundo causa mais comum de morte por uma doença neoplásica afetando mulheres. Uma em cada oito mulheres irá desenvolver câncer da mama em sua vida no mundo desenvolvido [2, 3]. No Brasil, as estimativas divulgadas pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) por meio da publicação Estimativa 2014 - Incidência de Câncer no Brasil [4], apontam a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, sendo o câncer de mama feminino o mais incidente.

Há uma série de fatores de risco reconhecidos para o desenvolvimento do câncer de mama incluindo fatores hereditários, hormonais, reprodutivos e história menstrual, idade, falta de exercício, álcool, radiação, doença benigna da mama, e obesidade [5]. O risco individual de desenvolvimento da doença aumenta proporcionalmente quando o mesmo apresenta familiares afetados com câncer de mama em idade precoce de início, devido à fatores genéticos hereditários [3]. Embora aproximadamente 10% a 30% dos casos de câncer de mama sejam atribuídos a fatores hereditários, apenas 5% a 10% dos casos são identificados com um componente hereditário forte, e apenas uma pequena fração desses (4% a 5%) são explicados por mutações em genes de alta penetrância em uma herança autossômica dominante [6]. Grande parte dos casos de câncer de mama hereditário são atribuídos a mutações germinativas nos genes de alta penetrância *BRCA1* e *BRCA2*, responsáveis pela Síndrome de Câncer de Mama o Ovário Hereditários [7].

A penetrância de um gene de predisposição para o câncer é uma definição que refere ao seu risco relativo de uma mutação neste gene causar um tipo particular de câncer. Genes de alta penetrância estão associados a um risco relativo de câncer superior a 5, em oposição, os genes de baixa penetrância exibem um risco relativo de cerca de 1,5. Genes de penetrância intermediária exibem um risco relativo de 1,5 a 5 [8].

Vários estudos têm identificado outros genes de susceptibilidade para o câncer de mama com alta penetrância, *TP53*, *PTEN*, *STK11* e *CDH1*, responsáveis pela Síndrome de Li-

Fraumeni, Síndrome de Cowden, Síndrome de Peutz-Jeghers e Câncer Gástrico Difuso Hereditário, respectivamente [9-14].

Em alguns casos de forte indício para uma síndrome hereditária como causa dos tumores de mama o resultado é negativo para mutações nos genes de alta penetrância, no entanto estes indivíduos ainda podem ter uma predisposição hereditária. Mutações em vários genes e marcadores polimórficos comuns foram recentemente associados com aumento pequeno ou moderado no risco para câncer de mama.

Embora mutações germinativas em outros genes de susceptibilidade para câncer de mama tenham sido identificadas, por exemplo nos genes *ATM* e *CHEK2*, essas mutações são raras; assim, testar um gene de cada vez se torna uma estratégia ineficiente e cara. Além disso, recentemente, mutações em outros genes que funcionam na mesma via de reparo de DNA dos genes *BRCA1* e *BRCA2* também foram associadas com o câncer de mama hereditário, *NBN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *PALB2*, *BRIP1*, *BARD1* (figura 1) [15].

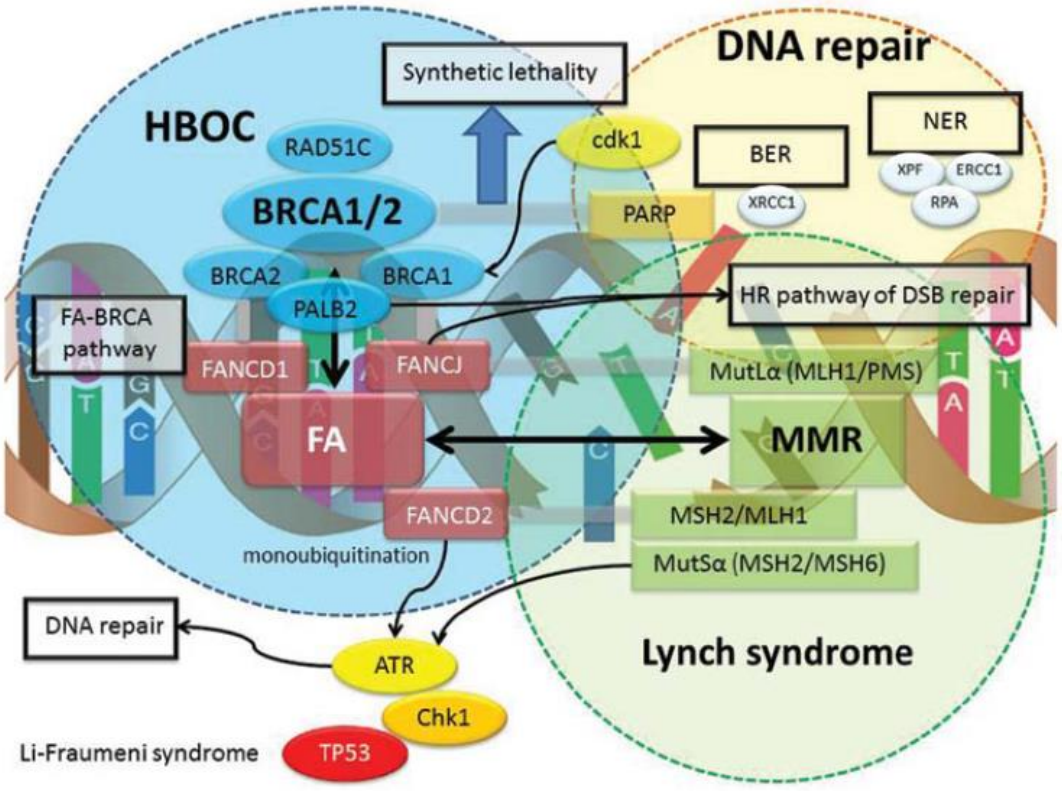


Figura 1. Esquema da maquinaria de reparo do DNA pela via BRCA. Revisão dos genes de susceptibilidade ao câncer de mama e ovário e suas funções no reparo do DNA e os mecanismos moleculares subjacentes que envolvem interação dos genes da Anemia Fanconi (FANCJ = BRIP1), os genes *mismatch repair* e outros genes de reparo de DNA com os genes *BRCA1* e *BRCA2* [15].

A tabela 1 relata os principais genes associados a um risco aumentado para o câncer de mama, incluindo os genes de alta, média e baixa penetrância.

Tabela 1. Genes de susceptibilidade para câncer de mama.

Síndrome	**Gene**	**Neoplasia(s)**	**Risco**	**Referência**
Genes com mutações de alta penetrância				
Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditários	*BRCA1*	Câncer de mama e ovário feminino	40-80%	[1, 6, 29]
	BRCA2	Câncer de mama masculino e feminino e câncer de ovário, próstata e pancreático	20-85%	[1, 6, 29]
Síndrome de Li-Fraumeni	*TP53*	Câncer de mama, sarcoma, leucemia, tumores cerebrais, carcinoma adrenocortical, câncer de pulmão	56-90%	[1, 6, 21, 29, 30]
Síndrome de Cowden	*PTEN*	Câncer de mama, tireoide e endométrio	52-50%	[1, 6, 21, 29, 30]
Síndrome de Peutz-Jeghers	*STK11*	Câncer de mama, ovário, cervical, útero, testículo, intestino e adenocarcinoma de cólon	30-54%	[1, 6, 21, 29, 30]
Câncer Gástrico Hereditário	*CDH1*	Câncer gástrico hereditário difuso, câncer de mama lobular e câncer colorretal	39-60%	[1, 6, 21, 29, 30]
Síndrome de Lynch	*MLH1* *MSH2* *MSH6* *PMS2*	Câncer de mama, ovário, endométrio, colorretal, estômago	15-80%	[1, 30]
Genes com mutações de média e baixa penetrância				
Ataxia telangiectasia	*ATM*	Câncer de mama e ovário	15-52%	[1, 6, 21, 30]
Síndrome de Li-Fraumeni	*CHEK2*	Câncer de mama masculino e feminino, pâncreas, ovário	20-44%	[1, 6, 21, 30]
Anemia Fanconi N	*PALB2*	Câncer de mama masculino e feminino, câncer de ovário e colorretal	20-40%	[1, 6, 21, 30]
Anemia Fanconi J	*BRIP1*	Câncer de mama e ovário	Variável	[1, 6, 21, 30]
Polipose Adenomatose	*MUTYH*	Câncer de mama, ovário, endométrio, tireoide, colorretal	4-100%	[1]
Anemia Fanconi O	*RAD51C*	Risco para câncer de mama e ovário	Variável	[1, 6, 21, 30]
-	*RAD51D*	Risco para câncer de mama e ovário	Variável	[1, 6, 30]

1.2 Testes Genéticos para Câncer de Mama Hereditário

O sequenciamento de nova geração (NGS) permite analisar múltiplos genes simultaneamente em testes no formato de painéis, a um custo reduzido em comparação com o sequenciamento pela metodologia de Sanger [16, 17]. Atualmente é possível aplicar a tecnologia NGS para diagnosticar síndromes de câncer hereditário com precisão [18]. Uma vantagem adicional desta metodologia é a identificação inesperada de portadores de mutação para síndromes bem conhecidas de susceptibilidade ao câncer em famílias com fenótipos atípicos [19, 20]. Como exemplo, um estudo identificou três portadores de mutação deletéria no gene *TP53* sem histórico familiar de síndrome de *Li-Fraumeni* e dois portadores de mutação no gene *MSH6* sem história familiar de síndrome de *Lynch* em um estudo com 360 pacientes com câncer de ovário não selecionados pela idade ou histórico familiar [20].

No entanto, informações clínicas relevantes sobre as variantes encontradas nestes testes estendidos não mantiveram o mesmo ritmo da tecnologia de sequenciamento. Faltam informações importantes como a penetrância das variantes genéticas (em particular, de variantes missense) e o manejo clínico adequado dos portadores destas mutações. A patogenicidade da maioria das variantes missense não foi estabelecida e isto pode ser um desafio para o aconselhamento genético. Orientações adequadas para testes genéticos ainda não estão disponíveis para estes genes [21].

Algumas populações apresentam mutações germinativas com efeito fundador, nos judeus *Ashkenazi* por exemplo, as mutações c.66_67delAG e c.5266dupC no gene *BRCA1* e a mutação c.5946_5946delT no gene *BRCA2* são mutações fundadoras, o que facilita a verificação da susceptibilidade genética em indivíduos de alto risco. Outras mutações fundadoras são a c.1100delC no gene *CHEK2*, identificada em populações europeias, e a mutação p.R337H no gene *TP53*, identificada no sul Brasil [22]. Esses dados apontam a necessidade de estudos de outros genes de predisposição a fim de obter informações que facilitem cada vez mais a interpretação das variantes genéticas e sua ocorrência e efeito em diversas populações.

Os testes em formato de painéis de genes estão agora disponíveis comercialmente, inclusive no Brasil, mas nenhum estudo avaliou ainda a ocorrência de mutações germinativas em diversos genes de susceptibilidade ao câncer de mama em um grupo de indivíduos brasileiros com câncer de mama que foram encaminhados para avaliação genética. Na última década, estudos envolveram a avaliação da população brasileira com fatores que indicavam

hereditariedade para o câncer de mama mas na maioria deles apenas os genes *BRCA1* e *BRCA2* foram analisados [23-25]. Recentemente, um estudo realizado na população brasileira utilizou a metodologia de sequenciamento Sanger para analisar os genes *BRCA1* e *BRCA2* por completo e mutações específicas nos genes *CHEK2* e *TP53*, e a metodologia de hibridização genômica comparativa (array-CGH) para investigar CNVs (*copy number variantions*) em outros 14 genes de predisposição para câncer de mama: *PTEN*, *ATM*, *NBN*, *RAD50*, *RAD51*, *BRIP1*, *PALB2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *TP53*, *CDKN2A*, *CDH1* e *CTNNB1* [26]. Em outro estudo, foi realizado o sequenciamento completo do gene *BRCA1* e a análise de mutações fundadores comuns nos genes *BRCA2*, *CHEK2* e *TP53* [22].

São raros ou inexistentes estudos que incluam o sequenciamento completo de diversos genes descritos com risco aumentado para câncer de mama em pacientes do Brasil, e, sabendo que as diferenças étnicas na incidência do câncer são resultados da interação entre o fator de risco genético e epidemiológicos [27, 28], é fundamental caracterizar uma população específica em relação às mutações germinativas, o que permitirá uma avaliação de riscos mais precisa e adequada para o aconselhamento genético dos indivíduos.

Objetivo

2 OBJETIVO

Com o advento do sequenciamento de nova geração (NGS), o sequenciamento simultâneo de múltiplos gene de suscetibilidade ao câncer está disponível através de painéis. No entanto, testar simultaneamente múltiplos genes cria o potencial de descobertas inesperadas, bem como a identificação de variantes genéticas que não apresentam a conduta clínica definida.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a ocorrência de modificações genéticas em 17 genes de predisposição para câncer de mama em pacientes brasileiros de risco, indicados para teste genético.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Seleção dos Pacientes

Os pacientes foram avaliados por um médico oncogeneticista e por serem classificados no grupo de risco ao desenvolvimento de câncer de mama por fatores hereditários, foram encaminhados para teste genético de predisposição.

Os critérios de inclusão, considerados pelo oncogeneticista, incluem pelo menos um dos seguintes: a) mulheres com história de dois ou mais familiares com câncer de mama e/ou de ovário em parentes de primeiro grau; b) câncer de mama ao longo de três ou mais gerações; c) parentes do sexo masculino com câncer de mama; d) casos de câncer de mama bilateral; todos de preferência ocorridos em idade precoce (menos de 50 anos).

Os pacientes foram orientados quanto à inclusão dos resultados do teste neste estudo, e em acordo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1). A realização deste projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu (ANEXO 2).

3.2 O teste genético

O teste genético compreendeu a análise do DNA dos pacientes utilizando um painel oncológico chamado *TruSight™ Cancer Sequencing Panel* desenvolvido pela *Illumina•* em colaboração com o professor Nazneen Rahman e o grupo do Instituto de Pesquisa em Câncer (ICR) de Londres. Este teste utiliza a técnica de sequenciamento de nova geração (NGS) para analisar a região codificadora de 94 genes relacionados com predisposição ao desenvolvimento de diversos tipos câncer, além de 283 SNPs associados com câncer através de *Genome Wide Association Studies* (*GWAS*) [31]. No presente estudo analisamos a região codificante e a região flanqueadora dos éxons, contendo os sítios de *splicing*, de 17 genes relacionados com predisposição para câncer de mama, indicados na tabela 1.

O teste genético indicado pelo médico foi realizado pela Genotyping Diagnósticos Genéticos, sediada na cidade de Botucatu – SP, colaboradora neste estudo.

3.3 Procedimentos Laboratoriais

3.3.1 Extração do DNA

As amostras biológicas (saliva) foram coletadas no coletor Oragene•DNA (DNA genotek). O procedimento de extração de DNA utilizado foi o indicado pelo fabricante do

coletor. Em seguida o DNA foi quantificado por fluorescência utilizando o reagente Qubit™ dsDNA BR Assay Kits e o equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer ((Invitrogen™).

3.3.2 Construção das bibliotecas de DNA

Para a construção das bibliotecas de DNA para sequenciamento NGS os reagentes utilizado foram fornecidos pela *Illumina*•, *TruSight Rapid Capture Kit* e *TruSight™ Cancer Sequencing Panel*.

O DNA genômico foi tratado com uma transposase originando fragmentos médios de 300bp, em seguida estes fragmentos foram marcados com sequencias específicas para cada paciente através da utilização de diferentes *primers* em uma reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR). Após desnaturação, os fragmentos amplificados foram hibridizados com as sondas contendo as regiões gênicas de interesse (94 genes inteiros - *TruSight™ Cancer Sequencing Panel)* (figura 2).

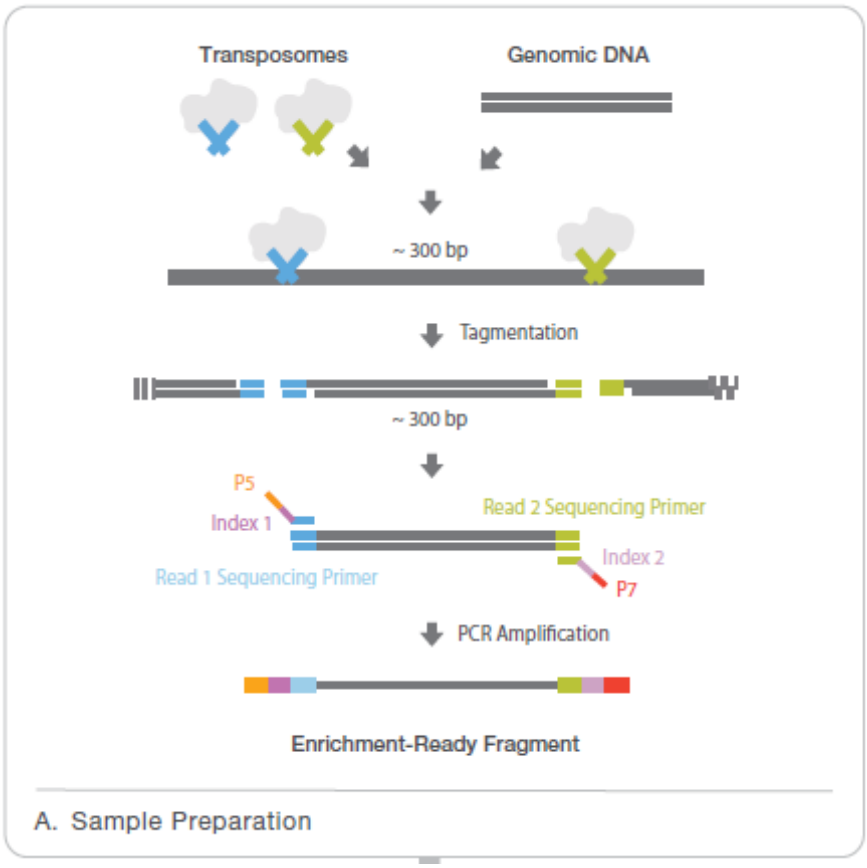


Figura 2. Esquema ilustrando o tratamento do DNA genômico com a transposase e marcação dos fragmentos com sequencias específicas para cada paciente (FONTE: *TruSight Rapid Capture* datasheet)

Estas sondas são marcadas com biotina, o que nos permitiu capturar apenas estas regiões de interesse através da utilização de *beads* de estreptavidina, que possuem afinidade pela biotina. Após a captura da regiões de interesse, utilizamos uma estante magnética para separar o DNA das *beads* (figura 3). Em seguida a biblioteca foi sequenciada no equipamento *MiSeq* da *Illumina*• utilizando o *MiSeq Reagent Kit V2 – 300 cycles*.

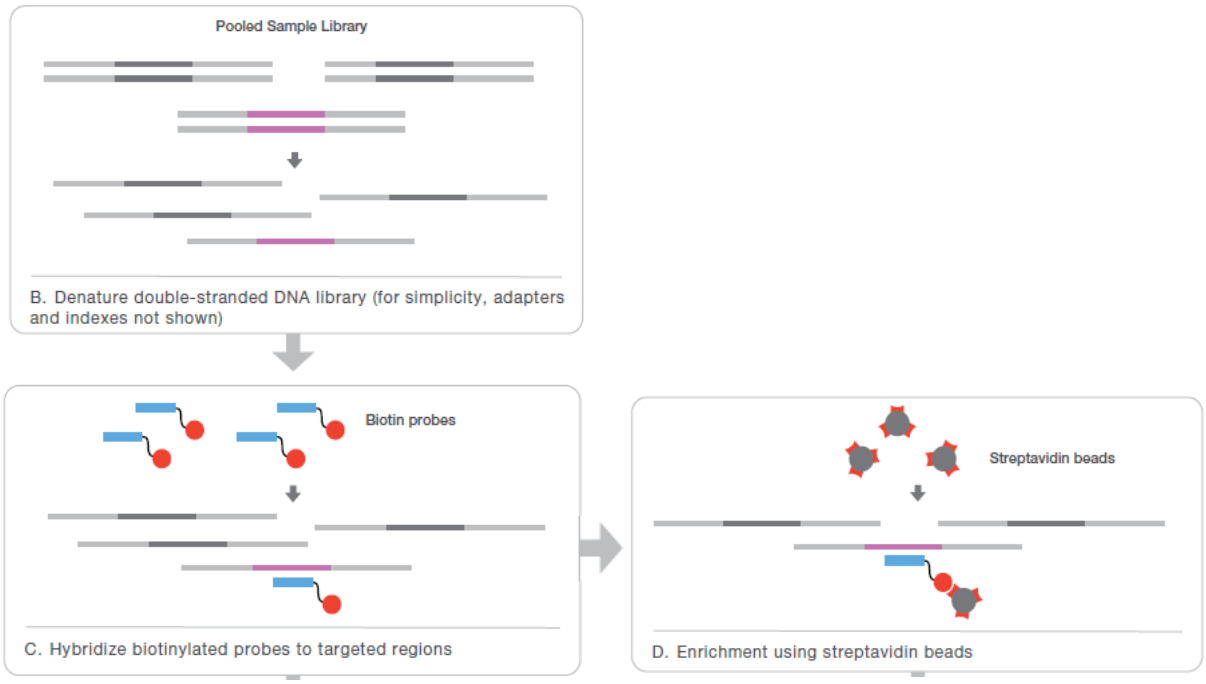


Figura 3. Esquema ilustrando a desnaturação dos fragmentos de DNA, hibridização com as sondas marcadas com biotina e captura com *beads* de estreptavidina (FONTE: *TruSight Rapid Capture* datasheet).

3.4 Análise dos dados

Os dados gerados a partir do sequenciamento NGS estavam no formato .fastq. Estes dados foram analisados por ferramentas de bioinformática, utilizando os comandos do programa *MiSeq Reporter - Illumina*•, que promoveu a limpeza das sequencias descartando aquelas com qualidade (Q) menor que 30, o alinhamento das sequências geradas contra a sequências de referência do genoma humano hg19, identificou SNPs e pequenas deleções e gerou um arquivo no formato .vcf contendo as variantes encontradas.

As variantes presentes nos 17 genes avaliados neste estudo foram filtradas manualmente, nomeadas de acordo com a *Human Genome Variation Society* (HGVS), analisadas uma a uma quanto à seu tipo e classificadas de acordo com sua patogenicidade baseado nos depósitos de bancos de dados (tabela 2). As variantes que não estavam depositadas ou classificadas pelos

bancos de dados, assim como aquelas classificadas como de significado incerto (VUS) foram avaliadas nos programas preditores de efeito de variantes *Sift* [32] e *PolyPhen* [33].

Tabela 2. Critérios de Classificação de Variantes

Classificação	**Descrição**
Patogênica	Variante reportadas pelos bancos de dados e reconhecidas como de significância clínica patogênica.
Provavelmente Patogênica	Variante não reportadas pelos bancos de dados mas que por seu tipo podem ser patogênicas (*nonsense*, *frameshift*, sítios de *splicing*).
Significado Incerto (VUS)	Variante reportadas pelos bancos de dados mas sem consenso sobre sua significância clínica.
Benignas	Variante reportadas pelos bancos de dados e classificadas como benignas, por não conferirem patogenicidade.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Análise geral dos pacientes

Um total de 319 mulheres participaram do estudo, com idade entre 20 e 65 anos. A média de idade de aparecimento do câncer foi 44 anos.

147 dos pacientes (46,08%) tiveram mais de um parente de primeiro-grau diagnosticado com câncer de mama, 29 dos pacientes (9,09%) tiveram parentes acometidos por câncer de mama e ovário, 6 dos pacientes (1,88%) tiveram homens afetados com câncer de mama na família, 23 dos pacientes (7,21%) tiveram câncer de mama bilateral e os demais, 114 pacientes (35,74%), apresentavam casos de câncer de mama ao longo de pelo menos três gerações.

4.2 Variantes Identificadas

Para efeito de visualização, as variantes encontradas foram separadas em 2 tabelas, de acordo com a sua classificação: a tabela 3 contém todas as variantes consideradas patogênicas ou provavelmente patogênicas; a tabela 4 apresenta todas as variantes classificadas como de significado incerto ou não reportadas pelos bancos de dados.

Nenhuma variante patogênica ou de efeito desconhecido foi identificada no gene *RAD51D*.

4.3 Variantes Patogênicas

Uma mutação considerada patogênica foi detectada em 11 dos 17 genes analisados, em 34 dos 319 pacientes estudados (10,7%) (Tabela 3). 31 desses pacientes apresentaram uma única mutação patogênica e 3 apresentaram duas (um paciente apresentou as variantes c.146C>G (p.Ser49Cys) no gene *ATM* e c.3817C>T (p.Gln1273Ter) no gene *BRCA1*; outro apresentou as variantes c.4165_4166delAG (p.Ser1389Terfs) no gene *BRCA1* e c.1240C>T (p.Arg414Ter) no gene *PALB2*; e o terceiro apresentou as variantes c.1333delT (p.Tyr445ThrfsX23) no gene *CHEK2* e c.2186_2187delCT (p.Leu729GlnfsX5) no gene *PMS2*.

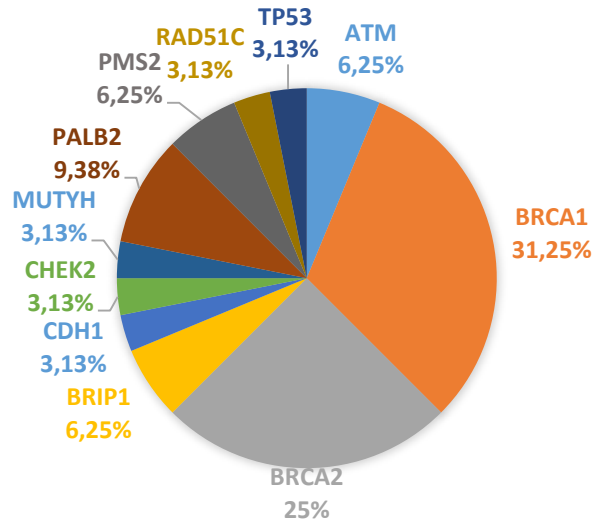
A variante c.146C>G (p.Ser49Cys) no gene *ATM*, considerada um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama, foi detectada em 4 pacientes, sendo a mais ocorrente. A variante c.1187G>A (p.Gly396Asp) no gene *MUTYH* e a variante c.2186_2187delCT (p.Leu729GlnfsX5) no gene *PMS2* foram detectadas em dois pacientes.

Tabela 3. Variantes detectadas nos pacientes, classificadas como patogênicas ou provavelmente patogênicas.

Paciente(s)	Gene	Éxon	Variante	Tipo	Classificação	Referência
134, 241, 465, 471	*ATM*	3	c.146C>G (p.Ser49Cys)	*missense*	Fator de risco	ClinVar[34]
336	*ATM*	26	c.3801delG (p.Glu1267fs)	*frameshift*	Patogênica	ClinVar[34]
11	*BRCA1*	5	c.188T>A (p.Leu63Ter)	*stop codon*	Patogênica	BIC[35]
75	*BRCA1*	8	c.470_471delCT (p.Ser157Ter)	*frameshift*	Patogênica	BIC[35]
117	*BRCA1*	11	c.798_799delTT (p.Ser267Lysfs)	*frameshift*	Patogênica	BIC[35]
224	*BRCA1*	11	c.3331_3334delCAAG (p.Gln1111Asnfs)	*frameshift*	Patogênica	BIC[35]
483	*BRCA1*	11	c.791_794delGTTC (p.Ser264Metfs)	*frameshift*	Patogênica	BIC[35]
471	*BRCA1*	11	c.3817C>T (p.Gln1273Ter)	*stop codon*	Patogênica	BIC[35]
163	*BRCA1*	12	c.4165_4166delAG (p.Ser1389Ter)	*frameshift*	Patogênica	BIC[35]
230	*BRCA1*	17	c.5030_5033delCTAA (p.Thr1677Ilefs)	*frameshift*	Patogênica	BIC[35]
15	*BRCA1*	18	c.5123C>A (p.Ala1708Glu)	*missense*	Patogênica	BIC[35]
443	*BRCA1*	20	c.5266dupC (p.Gln1756Profs)	*frameshift*	Patogênica	BIC[35]
436	*BRCA2*	7	c.584C>G (p.Ser195Ter)	*stop codon*	-	-
226	*BRCA2*	10	c.1238delT (p.Leu413Hisfs)	*frameshift*	Patogênica	BIC[35]
441	*BRCA2*	11	c.2806_2809delAAAC (p.Ala938Profs)	*frameshift*	Patogênica	BIC[35]
183	*BRCA2*	11	c.4535delG (p.Arg1512Leufs)	*frameshift*	-	-
14	*BRCA2*	11	c.5946delT (p.Ser1982Argfs)	*frameshift*	Patogênica	BIC[35]
131	*BRCA2*	11	c.6405_6409delTAACT (p.Asn2135Lysfs)	*frameshift*	Patogênica	BIC[35]
207	*BRCA2*	20	c.8489G>A (p.Trp2830Ter)	*stop codon*	Patogênica	BIC[35]
485	*BRCA2*	25	c.9382C>T (p.Arg3128Ter)	*stop codon*	Patogênica	BIC[35]
17	*BRIP1*	Íntron 6	c.628-1G>T	sitio de *splicing*	-	-
376	*BRIP1*	17	c.2392C>T (p.Arg798Ter)	*stop codon*	Patogênica	ClinVar[34]
194	*CDH1*	3	c.271insT (p.Phe91Asnfs)	*frameshift*	-	-
511	*CHEK2*	12	c.1333delT (p.Tyr445Thrfs)	*frameshift*	-	-
255, 351	*MUTYH*	13	c.1187G>A (p.Gly396Asp)	*missense*	Patogênica	LOVD[36]
391	*PALB2*	4	c.1042C>T (p.Gln348Ter)	*stop codon*	-	-
163	*PALB2*	4	c.1240C>T (p.Arg414Ter)	*stop codon*	Patogênica	LOVD[36]
387	*PALB2*	5	c.1706_1707delAA (p.Lys569Argfs)	*frameshift*	-	-
343	*PMS2*	2	c.137G>T (p.Ser46Ile)	*missense*	Provavelmente patogênica	LOVD[36]
275, 511	*PMS2*	13	c.2186_2187delCT (p.Leu729Glnfs)	*frameshift*	Patogênica	LOVD[36]
510	*RAD51C*	1	c.3G>A (p.Met1Ile)	*start codon*	-	-
212	*TP53*	10	c.1010G>A (p.Arg337His)	*missense*	Fator de risco	IARC[37]

O gráfico 1 ilustra a distribuição por gene das variantes patogênicas, sendo os genes *BRCA1* (31,25%) e *BRCA2* (25%) os que mais se apresentaram mutados nos pacientes em estudo, seguidos pelo gene *PALB2* (9,38%). Nenhuma mutação patogênica foi detectada nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PTEN* e *RAD51D*.

GRÁFICO 1. DISTIBUIÇÃO POR GENE DAS VARIANTES PATOGÊNICAS.



Uma mutação foi detectada em 10 dos pacientes que apresentavam histórico de câncer de mama ao longo de três gerações, em 4 pacientes com câncer de mama bilateral, em 7 pacientes com casos de câncer de mama e ovário na família, em 11 dos pacientes com pelo menos dois parentes de primeiro grau afetados pelo câncer de mama e em 5 pacientes com câncer de mama antes dos 30 anos.

4.4 Variantes de Significado Incerto (VUS)

80 variantes de significado incerto foram identificadas, em 72 dos 319 pacientes (22,6%) e em 15 dos 17 genes analisados (Tabela 4). 33 das VUSs identificadas (41,3%) não estão depositadas ou classificadas pelos bancos de dados.

Após a avaliação do efeito destas variantes pelos preditores *SIFT* e *PolyPhen*, 30 variantes (37,5%) foram consideradas deletérias por ambos os programas.

As variantes c.5062_5064delGTT (p.Val1688delVal) no gene *BRCA1*, c. 884A>G (p.Lys295Arg) no gene *MSH6*, c.1460C>T (p.Ser487Phe) no gene *MUTYH* e c.431T>C (p.Ile144Thr) no gene *RAD51C* foram identificadas cada uma em 2 pacientes.

Tabela 4. Variantes detectadas nos pacientes, classificadas como de significado incerto. Em negrito as variantes detectadas em mais de um paciente.

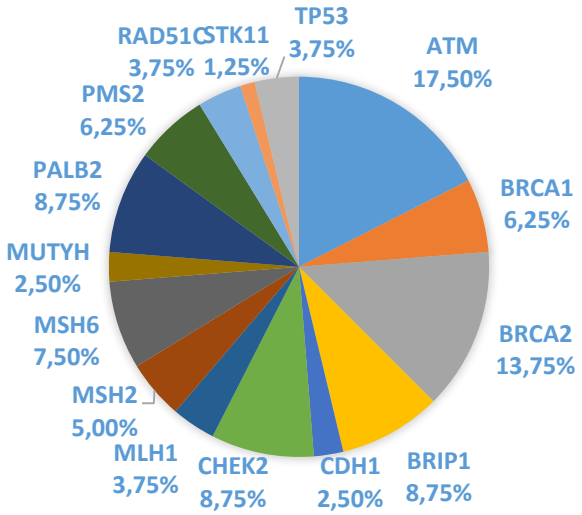
Paciente	Gene	Exon	Variante	Tipo	Classificação	Referência	SIFT	PolyPhen
102	*ATM*	10	c.1229T>C (p.Val410Ala)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	deletéria	benigna
370	*ATM*	11	c.1273G>T (p.Ala425Ser)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna
156	*ATM*	11	c.1741T>G (p.Leu581Val)	*Misense*	-	-	deletéria	benigna
324	*ATM*	15	c.2289T>A (p.Phe763Leu)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	benigna
163	*ATM*	17	c.2542G>C (p.Glu848Gln)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna
066	*ATM*	23	c.3307T>G (p.Asp1103Ala)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna
002	*ATM*	27	c.4064C>A (p.Ala1355Glu)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna
351	*ATM*	28	c.4198A>C (p.Lys1400Gln)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna
200	*ATM*	29	c.4414T>G (p.Leu1472Val)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	deletéria	provavelmente prejudicial
169	*ATM*	40	c.5975A>C (p.Lys1992Thr)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	benigna
004	*ATM*	41	c.6067G>A (p.Gly2023Arg)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	deletéria	provavelmente prejudicial
309	*ATM*	52	c.7651G>C (p.Asp2551His)	*Misense*	-	-	deletéria	provavelmente prejudicial
461	*ATM*	58	c.8495G>A (p.Arg2832His)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	benigna
167	*ATM*	58	c.8560C>T (p.Arg2854Cys)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	deletéria	provavelmente prejudicial
094	*BRCA1*	11	c.1819A>G (p.Lys607Glu)	*Misense*	-	-	deletéria	provavelmente prejudicial
149	*BRCA1*	11	c.3758C>G (p.Ser1253Cys)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	deletéria	provavelmente prejudicial
001	*BRCA1*	16	c.4823C>T (p.Ala1608Val)	*Misense*	VUS	BIC[35]	tolerada	benigna
343	*BRCA1*	17	c.5006C>T (p.Ala1669Val)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna
405, 489	***BRCA1***	**17**	**c.5062_5064delGTT (p.Val1688delVal)**	***in frame deletion***	**VUS**	**BIC[35]**	-	-
007	*BRCA2*	10	c.1353C>A (p.Ser451Arg)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna
001	*BRCA2*	10	c.1627C>A (p.His543Asn)	*Misense*	VUS	BIC[35]	tolerada	benigna
007	*BRCA2*	11	c.1964C>G (p.Pro655Arg)	*Misense*	VUS	BIC[35]	tolerada	benigna
262	*BRCA2*	11	c.2969T>C (p.Met990Thr)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna
002	*BRCA2*	11	c.4106C>A (p.Ser1369Tyr)	*Misense*	-	-	deletéria	benigna
400	*BRCA2*	11	c.4272T>G (p.Ser1424Ala)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna

272	*BRCA2*	15	c.7559G>C (p.Arg2520Pro)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	deletéria	provavelmente prejudicial
102	*BRCA2*	18	c.8009C>G (p.Ser2670Trp)	*Misense*	-	-	deletéria	provavelmente prejudicial
017	*BRCA2*	20	c.8626C>A (p.His2876Asn)	*Misense*	-	-	deletéria	benigna
053	*BRCA2*	22	c.8942A>G (p.Glu2981Gly)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	benigna
272	*BRCA2*	26	c.9628G>A (p.Gly3210Ser)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna
054	*BRIP1*	14	c.1941G>T (p.Trp647Cys)	*Misense*	VUS	LOVD[36]	deletéria	provavelmente prejudicial
326	*BRIP1*	15	c.2220G>T (p.Gln740His)	*Misense*	VUS	LOVD[36]	deletéria	provavelmente prejudicial
006	*BRIP1*	18	c.2564G>A (p.Arg855His)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	deletéria	provavelmente prejudicial
393	*BRIP1*	20	c.3275C>T (p.Pro1092Leu)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	benigna
209	*BRIP1*	20	c.3523A>G (p.Thr1175Ala)	*Misense*	-	-	deletéria	benigna
363	*BRIP1*	20	c.3590G>A (p.Gly1197Glu)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	benigna
037	*BRIP1*	20	c.3651C>A (p.Trp1217Cys)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna
026	*CDH1*	3	c.313T>A (p.Ser105Thr)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna
083	*CDH1*	10	c.1423G>A (p.Val475Met)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	deletéria	provavelmente prejudicial
127	*CHEK2*	2	c.134C>T (p.Thr45Met)	*Misense*	-	-	deletéria	provavelmente prejudicial
484	*CHEK2*	4	c.557A>G (p.Asn186Ser)	*Misense*	-	-	tolerada	provavelmente prejudicial
271	*CHEK2*	12	c.1270T>C (p.Tyr424His)	*Misense*	VUS	LOVD[36]	deletéria	provavelmente prejudicial
171	*CHEK2*	12	c.1298A>C (p.Tyr433Ser)	*Misense*	-	-	deletéria	provavelmente prejudicial
076	*CHEK2*	12	c.1317C>A (p.Gln439His)	*Misense*	-	-	deletéria	provavelmente prejudicial
395	*CHEK2*	14	c.1510G>C (p.Glu504Gln)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	benigna
167	*CHEK2*	15	c.1711G>A (p.Glu571Lys)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	provavelmente prejudicial
216	*MLH1*	Íntron 11	c.1038+4A>C	*Intrônica*	-	-	-	-
181	*MLH1*	13	c.1421C>G (p.Arg474Gly)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna
395	*MLH1*	14	c.1637A>G (p.Lys546Arg)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	benigna
044	*MSH2*	16	c.2717T>C (p.Ile906Thr)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	benigna
072	*MSH2*	Íntron 3	c.645+3A>G	sítio de *splicing*	VUS	LOVD[36]	-	-
292	*MSH2*	10	c.1595T>C (p.Val532Ala)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna
055	*MSH2*	12	c.1787A>G (p.Asn596Ser)	*Misense*	VUS	LOVD[36]	tolerada	benigna
336, 439	***MSH6***	**4**	**c. 884A>G (p.Lys295Arg)**	***Misense***	**VUS**	**LOVD[36]**	**deletéria**	**provavelmente prejudicial**

190	*MSH6*	4	c.1844G>C (p.Cys615Ser)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	benigna
167	*MSH6*	4	c.2107A>G (p.Met703Val)	*Misense*	-	-	deletéria	benigna
387	*MSH6*	8	c.3788G>A (p.Arg1263His)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	provavelmente prejudicial
250	*MSH6*	9	c.4000C>T (p.Arg1334Trp)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	deletéria	provavelmente prejudicial
344	*MSH6*	Íntron 9	c.4001+2_4001+5insTAAC	Inserção	-	-	-	-
386	*MUTYH*	15	c.1258C>G (p.Leu420Val)	*Misense*	-	-	deletéria	benigna
192, 237	***MUTYH***	**16**	**c.1460C>T (p.Ser487Phe)**	***Misense***	**-**	**-**	**deletéria**	**benigna**
151	*PALB2*	2	c.87C>G (p.Ser29Arg)	*Misense*	-	-	deletéria	provavelmente prejudicial
477	*PALB2*	4	c.656A>G (p.Asp219Gly)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	benigna
199	*PALB2*	4	c.1066A>G (p.Lys356Glu)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna
447	*PALB2*	5	c.2509G>A (p.Glu837Lys)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	benigna
262	*PALB2*	8	c.2816T>G (p.Leu939Trp)	*Misense*	VUS	LOVD[36]	deletéria	provavelmente prejudicial
332	*PALB2*	9	c.2897T>C (p.Ile966Thr)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	provavelmente prejudicial
196	*PALB2*	13	c.3428T>A (p.Leu1143His)	*Misense*	VUS	LOVD[36]	tolerada	provavelmente prejudicial
143	*PMS2*	2	c.53T>C (p.Ile18Thr)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	deletéria	provavelmente prejudicial
042	*PMS2*	6	c.647G>T (p.Cys216Phe)	*Misense*	VUS	LOVD[36]	deletéria	provavelmente prejudicial
222	*PMS2*	10	c.1004A>G (p.Asn335Ser)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	deletéria	provavelmente prejudicial
117	*PMS2*	11	c.1491G>A (p.Gly497Asp)	*Misense*	-	-	tolerada	benigna
391	*PMS2*	11	c.1715C>T (p.Ala572Val)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	benigna
067	*RAD51C*	2	c.376G>A (p.Ala126Thr)	*Misense*	VUS	LOVD[36]	tolerada	benigna
013, 026	***RAD51C***	**3**	**c.431T>C (p.Ile144Thr)**	***Misense***	**VUS**	**ClinVar[34]**	**tolerada**	**provavelmente prejudicial**
034	*RAD51C*	5	c.790G>A (p.Gly264Ser)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]		
271	*STK11*	7	c.877G>A (p.Glu293Lys)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	deletéria	benigna
078	*TP53*	3	c.100C>G (p.Pro34Ala)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	benigna
094	*TP53*	6	c.572C>G (p.Pro191Arg)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	provavelmente prejudicial
066	*TP53*	8	c.847C>T (p.Arg283Cys)	*Misense*	VUS	ClinVar[34]	tolerada	benigna

A maioria das VUSs foram identificadas nos genes *ATM* e *BRCA2* (somando 31%), seguidos pelos genes *BRIP1*, *CHEK2* e *PALB2*, cada um com 9% das variantes (Gráfico 2).

GRÁFICO 2. DISTRIBUIÇÃO POR GENE DAS VARIANTES DE SIGNIFICADO INCERTO.



Discussão

5 DISCUSSÃO

5.1 Mutações patogênicas

5.1.1 Frequência da mutações patogênicas

No Brasil, são raros os estudos que reportam a prevalência de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e praticamente inexistentes os que analisam outros genes relacionados ao câncer de mama. Alguns estudos relataram frequências baixas de pacientes com mutações no genes *BRCA1* e *BRCA2* [38, 39], mas um estudo recente identificou uma prevalência de 26% de mutações germinativas nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* (mutação c.1100delC) e *TP53* (mutação p.Arg337His) em 120 pacientes brasileiros classificados com alto risco para o desenvolvimento de câncer de mama e ovário [26]. O presente estudo encontrou uma taxa de detecção de mutação de 5,65% nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e de 10,7% nos 17 genes analisados. Os critérios de inclusão e classificação dos pacientes explicam estas divergências, alguns dos estudos citados incluem apenas pacientes de alto risco, enquanto este também inclui paciente de médio risco.

Em 2014, um trabalho que testou 6 genes (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN*, *STK11* e *CDH1*) em pacientes com risco de câncer de mama nos EUA detectou mutações apenas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, com uma taxa de detecção de mutação de 5,2% [29].

Recentemente, um estudo também nos EUA, detectou uma taxa de mutação de 13,5%, em uma pesquisa envolvendo 1781 pacientes indicados para teste genético de predisposição para câncer de mama com 25 genes analisados, sendo que assim como no presente estudo, a maioria destas mutações foram identificadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (33%). Este mesmo estudo também encontrou que depois do genes *BRCA1* e *BRCA2*, o que mais apresentou mutações patogênicas foi o gene *PALB2*, o que também corrobora com o resultado encontrado neste estudo [41].

Nossos resultados também são consistentes com a frequência de 4,3% de mutações germinativas em genes adicionais de suscetibilidade ao câncer de mama detectadas pelo Projeto *The Cancer Genome Atlas (TCGA)*[42].

5.1.2 Mutações patogênicas genes *BRCA1* e *BRCA2*

Todas as variantes patogênicas encontradas no gene *BRCA1* estavam depositadas e classificadas no bando de dados BIC [35] e apenas 2 das variantes patogênicas

encontradas no gene *BRCA2* não estavam depositadas nos bancos de dados (c.584C>G (p.Ser195Ter) e c.4535delG (p.Arg1512Leufs)). Encontramos apenas um depósito da segunda variantes feito pelo laboratório *Invitae* dos EUA no banco de dados do ClinVar [34], sem descrição de sua patogenicidade. Acreditamos que seja uma descrição inédita da ocorrência destas variantes em pacientes de risco para o câncer de mama.

Um resultado interessante foi que este estudo não identificou um número grande de pacientes com a mesma mutação, como observado por alguns pesquisadores que identificaram, por exemplo, uma grande ocorrência da variante fundadora da população de judeus *Ashkenazi* p.5382insC [25, 26, 38, 43]. Esta é uma das mutações mais comuns identificada em todo o mundo no gene *BRCA1* e é encontrada principalmente entre judeus *Ashkenazi* e mulheres de origem eslava [44, 45]. Um estudo de 2014, com a população do nordeste brasileiro também não identificou esta variantes em nenhum paciente [22]. A variante c.3331_3334delCAAG (p.Gln1111Asnfs) no gene *BRCA1* que neste estudo foi identificada em apenas 1 paciente também já foi identificada em alta frequência em estudos anteriores com a população mundial e na população brasileira [22, 38, 46, 47].

Este resultado podem ser ocasionados pela diversidade da população brasileira, dificilmente os pacientes analisados terão a mesma origem étnica. Além disso são poucos os centros de estudos de tumores hereditários no Brasil, portanto espera-se que os pacientes atendidos por estes centros também sejam diversificados, encaminhados de diferentes regiões e estados do país.

Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis pela maioria dos casos de famílias de alto risco com aparecimento precoce do câncer de mama, mutações germinativas nestes dois genes explicam ~ 25% dos casos de câncer de mama familial [48, 49].

5.1.3 Mutações patogênicas no gene *ATM*

A mutação patogênica com maior ocorrência entre os pacientes estudados foi a c.146C>G (p.Ser49Cys). Esta variante é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de mama [34, 50], no entanto um estudo já a descreveu com baixo aumento no risco para câncer de mama [51].

A outra variante identificada no gene *ATM* (c.3801delG (p.Glu1267fs)) foi depositada por dois diferentes laboratórios no *ClinVar* e está classificada como patogênica, relacionada com predisposição para câncer hereditário. Esta variante foi

associada em estudos anteriores com susceptibilidade para câncer pancreático familial [52] e risco para câncer de mama [53].

O *ATM* é um genes de susceptibilidade para câncer para mama de moderada penetrância e confere risco aumentado de aproximadamente 3 vezes. Mutações neste gene são responsáveis por aproximadamente metade das mutações identificadas em pacientes testados, quando desconsideramos os genes *BRCA1* e *BRCA2* [54, 55].

5.1.4 Mutações patogênicas no gene *BRIP1*

Duas (2) mutações patogênicas foram detectadas no gene *BRIP1*. A variante c.628-1G>T trata-se de uma mutação intrônica, que altera o sítio de *splicing* e por este motivo foi considerada patogênica neste estudo, apesar de não ter sido reportada pelos bancos de dados ou pela literatura científica. A variante c.2392C>T (p.Arg798Ter) está depositada e classificada pelo *ClinVar* como patogênica e já foi descrita em muitos estudos de avaliação do gene *BRIP1* como de susceptibilidade para o câncer de mama. Esta é a mutação germinativa mais comum identificada no gene *BRIP1* [56]. Foi encontrada pela primeira vez em pacientes com Anemia Fanconi do grupo J [57], mais tarde identificado em pacientes com câncer de mama [58] e câncer de próstata [59].

Notou-se que em famílias com mutações no gene *BRIP1* e vários casos de câncer de mama, houve segregação incompleta da mutação com o câncer, indicando um alelo de baixa penetrância, semelhante ao observado com o gene *CHEK2*. [60]

5.1.5 Mutações patogênicas no gene *CDH1*

Apenas uma mutação patogênica foi identificada no gene *CDH1* (c.271insT (p.Phe91Asnfs)). Esta variante não foi localizada em nenhum banco de dados e não encontramos registros na literatura científica. Trata-se de uma variante do tipo *frameshift*, que promove um códon de terminação prematuro e a interrupção da síntese proteica, sendo assim foi considerada patogênica neste estudo.

O gene *CDH1* foi inicialmente conhecido como o gene de susceptibilidade principal para câncer gástrico do tipo difuso, mas o excesso de cânceres de mama do tipo lobular em famílias com o gene *CDH1* alterado levou os pesquisadores a identificá-lo também como um gene de susceptibilidade para o carcinoma lobular invasivo. O risco de

carcinoma lobular invasivo é alta em portadores do sexo feminino com mutação, cerca de 50% desenvolverá a doença [61].

5.1.6 Mutações patogênicas no gene *CHEK2*

A variante patogênica identificada no gene *CHEK2* (c.1333delT (p.Tyr445Thrfs)) também não está descrita por bancos de dados e não encontramos registros na literatura. Por se tratar de uma variante do tipo *frameshift* foi considerada patogênica neste estudo.

As mutações germinativas mais frequentes no gene *CHEK2* em todo o mundo, são c.1100delC, c.444 + 1G>A e p.I157T [62, 63]. Estas variantes não foram encontrados em nenhum dos pacientes analisados. Um estudo com a população brasileira realizado em 2014 também variantes no gene CHEK2 [22]. Temos que considerar que a presença destas mutações pode estar relacionado com o padrão da mistura da população. Outros estudos apresentaram resultados semelhantes a este, [64, 65] e no Brasil, poucos estudos identificaram a variante c.1100delC [26, 66].

As mutações germinativas de *CHEK2*, especialmente as que originam proteínas truncadas, como a detectada em nosso estudo, conferem baixa penetrância na predisposição ao câncer de mama mas a presença destas mutações em famílias de alto risco e as interações entre o *CHEK2* mutado com outros genes pode estar relacionada com o desenvolvimento do câncer de mama [67].

5.1.7 Mutações patogênicas no gene *MUTYH*

A única variante patogênica identificada no gene *MUTYH* foi a c.1187G>A (p.Gly396Asp). Esta variante é classificada como patogênica por conferir risco para o câncer colorretal (Síndrome polipose associada ao *MYH*). No entanto a ocorrência de predisposição se deve a mutações bialélicas (homozigose) e no presente estudo as variantes identificadas se apresentaram em heterozigose.

O câncer de mama tem sido relatado em famílias com síndromes de predisposição hereditária para câncer colorretal, incluindo síndrome de *Lynch* e a polipose associada ao *MYH*, mas nenhuma relação concreta foi estabelecida [1]. Um estudo recente não identificou mutações germinativas no gene *MUTYH* em nenhum dos pacientes estudados,

indicando que as mutações bialélicas no gene *MUTYH* não são uma causa comum para o desenvolvimento de carcinomas papilares da mama [68].

5.1.8 Mutações patogênicas no gene *PALB2*

O gene *PALB2* foi o que apresentou o maior número de mutações patogênicas depois dos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Das variantes identificadas, apenas a c.1240C>T (p.Arg414Ter) está depositada no banco de dados, relacionada com predisposição para o câncer de mama. Esta variantes já foi detectada em outros estudos [69, 70] com pacientes de risco para câncer de mama e coincidentemente foi relacionada com casos de câncer de mama bilateral [69], que é o caso da paciente do presente estudo que apresentou esta variante. No entanto, outros pacientes com câncer de mama bilateral não apresentaram mutações neste gene.

As demais variantes identificadas, c.1042C>T (p.Gln348Ter) e c.1706_1707delAA (p.Lys569Argfs) não estão descritas nos bancos de dados e literatura.

Embora os estudos iniciais tenham sugerido que o risco de câncer de mama com mutações *PALB2* é moderado [71] outros trabalhos sugerem que algumas mutações conferem um alto risco [72, 73].

Mutações truncadas no gene *PALB2* são uma importante causa do câncer de mama hereditário, no que diz respeito à frequência de mutações e ao risco de predisposição associado a elas. Os dados de um trabalho publicado recentemente [74] sugerem que o risco de câncer da mama para portadores de mutação no *PALB2* pode sobrepor-se ao risco para portadores de mutação no *BRCA2*.

5.1.9 Mutações patogênicas no gene *PMS2*

No presente trabalhos encontramos 2 mutações patogênicas no gene *PMS2*. A variante missense c.137G>T (p.Ser46Ile) e a variantes frameshift c.2186_2187delCT (p.Leu729Glnfs). Estas variantes estão depositadas no banco de dados *LOVD* [36], classificadas como patogênicas e associadas com a Síndrome de *Lynch* (câncer colorretal não-poliposo).

Um estudo do papel do gene *PMS2* na Síndrome de *Lynch* encontrou um risco relativo de 3,8 para o desenvolvimento do câncer da mama em pacientes com mutação

neste gene, o que sugere que a síndrome *Lynch* pode ser um fator de risco de baixa ou moderada penetrância para o câncer de mama [75].

5.1.10 Mutações patogênicas no gene *RAD51C*

A variante detectada no gene *RAD51C* (c.3G>A (p.Met1Ile)) trata-se de uma alteração do aminoácido inicial, responsável pelo início da transcrição, sendo assim foi classificada como patogênica neste estudo.

Inicialmente, um estudo encontrou seis mutações no gene *RAD51C*, em 1,3% das famílias com câncer de mama e ovário, sendo relacionado com uma possível susceptibilidade genética. Curiosamente, nenhuma mutações patogênicas foi identificada em famílias de alto risco apenas para câncer de mama [76]. Posteriormente, outros estudos confirmaram a ocorrência de *RAD51C* predominantemente em famílias com casos de câncer de mama e ovário, embora com diferentes frequências [77, 78, 79].

Sugere-se que as mutações no gene *RAD51C* ocorram em uma frequência muito baixa. Neste contexto, novos estudos genômicos em famílias de alto risco precisam ser realizados para a identificação de portadores de mutação.

5.1.11 Mutações patogênicas no gene *TP53*

O presente estudo identificou a mutação c.1010G>A (p.Arg337His) no gene *TP53*, em apenas 1 paciente.

Mutações germinativas no gene *TP53* são responsáveis por causar a Síndrome de *Li-Fraumeni*, uma síndrome rara de predisposição para câncer, associada com cerca de 1% dos casos de câncer de mama [80]. Mulheres com câncer de mama associados à Síndrome de *Li-Fraumeni* tem a tendência de apresentar o câncer em idade muito jovem (20 a 30 anos) [81]. Essas mulheres diagnosticadas com câncer de mama em idade inferior a 30 anos normalmente não têm um histórico familiar significativo de câncer e de 3-8% apresentam uma mutação patogênica no gene *TP53* [82, 83]. Pacientes com câncer de mama de início precoce estão agora sendo incluídos nos critérios do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) para a realização de testes genéticos no gene *TP53*, mesmo se não houver nenhuma outra história familiar de câncer [84].

Um estudo em famílias com predisposição para câncer no Brasil identificou a mutação detectada no presente estudo (c.1010G>A (p.Arg337His)) com uma prevalência

mais elevada do que outras mutações germinativas no mesmo gene [85]. Recentemente, um estudo também em pacientes brasileiros, identificou esta variantes em 2,5% dos pacientes com risco para câncer de mama [26].

5.2 Mutações de efeito desconhecido (VUS)

Um dos principais problemas no diagnóstico molecular de mutações em genes de predisposição é o efeito das mutações de efeito desconhecido na função das proteínas. Várias abordagens têm sido utilizadas para determinar a patogenicidade das VUSs, incluindo a investigação de co-segregação, frequência em controles saudáveis, falta de co-ocorrência com mutações patogênicas, e análise *in silico*, tais como a conservação de aminoácidos e a gravidade das alterações de aminoácidos [86]. Conforme os critérios adotados neste estudo, de avaliação *in silico* utilizando os programas preditores *SIFT* e *PolyPhen*, 30 das variantes classificadas como VUS tiveram efeito negativo na função proteica.

Mais testes e estudos que abranjam estes genes acabarão por reclassificar essas variantes como mutações deletérias ou polimorfismos benignos. Experiência com os genes *BRCA1* e *BRCA2* sugerem que a maioria vai ser reclassificada como polimorfismos benignos, considerando que, inicialmente, cerca de 20% dos indivíduos testados para *BRCA1* e *BRCA2* tinha uma VUS e atualmente, apenas cerca de 2% recebem tal resultado através de testes comerciais oferecidos em laboratórios nos EUA [87, 88].

Segundo recomendações do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN), uma VUS não deve ser usada para aconselhar os pacientes; o histórico familiar deve orientar as recomendações de vigilância e prevenção para esses indivíduos [84, 89].

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Acreditamos que este estudo seja o primeiro descrevendo a prevalência de mutações em 17 genes de predisposição para câncer de mama em pacientes brasileiros. Apesar da alta prevalência de câncer de mama na população brasileira, nenhum estudo tão abrangente tinha sido realizado anteriormente envolvendo esta população.

A maioria dos pacientes que procuram aconselhamento genético de risco aumentado para câncer são pacientes com histórico pessoal e familiar de câncer de mama. O câncer da mama pode ser observado em várias síndromes hereditárias de predisposição ao câncer e estas síndromes são causadas por mutações em diferentes genes. Após uma cuidadosa avaliação clínica do histórico pessoal e familiar os testes tradicionalmente têm começado com a avaliação dos genes *BRCA1* e *BRCA2* e, em seguida, testes adicionais em gene único. No entanto, os avanços na tecnologia de sequenciamento e a utilização do sequenciamento NGS tornaram mais viável, tecnologicamente e economicamente, a análise de múltiplos genes de predisposição para câncer de mama, em formato de painéis.

Os ensaios de múltiplos genes para câncer de mama hereditário oferecem a oportunidade de identificar mutações em genes menos comuns de susceptibilidade, resultando na gestão médica mais específica da doença. Outra vantagem da utilização de painéis de genes seria proporcionar aos pacientes incorporar os resultados dos testes em suas decisões cirúrgicas nos casos de um câncer de mama diagnosticado precocemente.

No entanto também existem desvantagens e dúvidas na utilização dos painéis de genes. Ainda não existem estimativas de risco precisas para mutações em todos esses genes, essas informações são necessárias para personalização de tratamento, e recomendações de redução de risco. As opções de gerenciamento disponíveis para médicos são para portadores de variantes nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e estas podem ser diferentes daquelas para os pacientes que carregam mutações em outros genes de susceptibilidade hereditária para o câncer da mama. Outra dúvida é em relação à cobertura destes exames por seguradoras de saúde, e a complexidade dos resultados gerados para médicos e pacientes, já que provavelmente os avanços em pesquisas irão alterar constantemente os genes incluídos nestas análises. Além disso há a desvantagem de não conhecermos o efeito das VUSs detectadas.

Apesar de todas as divergências em relação à aplicação clínica imediata dos testes de múltiplos genes não há dúvidas de que pesquisas que avaliem esses genes são de extrema importância para os avanços na área de oncologia hereditária. Dados publicados

sobre os resultados de testes baseados em painéis para genes de câncer da mama hereditário são atualmente muito limitados, mas nos últimos anos essas pesquisas estão ganhando grande dedicação em todo o mundo. Quando dados adicionais sobre o desempenho clínico destes painéis se tornarem disponíveis, acreditamos que serão estabelecidas diretrizes de consenso sobre o uso dos testes e o manejo ideal dos pacientes e o presente estudo contribuirá para este importante avanço.

Referências

7 REFERÊNCIAS

[1] Rich T A, Woodson A H, Litton J, Arun B. Hereditary Breast Cancer Syndromes and Genetic Testing. Journal of Surgical Oncology, 2015;111:66 – 80

[2] Ferlay J, Parkin D M, Steliarova-Foucher E. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. European Journal of Cancer, 2010; vol. 46, no. 4, pp. 765–781.

[3] Lalloo F, Evans D G. Familial breast cancer. Clinical Genetics, 2012; vol. 82, no. 2, pp. 105–114.

[4] Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) – Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil - Disponível em http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/, acessado em 04 de outubro de 2014.

[5] Yang X R, Chang-Claude J, Goode E L et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the breast cancer association consortium studies. Journal of theNational Cancer Institute, 2011; vol. 103, no. 3,pp. 250–263.

[6] Apostolou P, Fostira F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. BioMed Research International, 2013; vol. 2013, Article ID 747318.

[7] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. CA Cancer J Clin, 2013; 63(1):11–30.

[8] Jorde L, Carey J, Bamshad M, White R, editors, Medical genetics 2nd ed., Mosby; 2000.

[9] Chompret A, Brugieres L, Ronsin M, et al. P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. British Journal of Cancer, 2000; 82(12), 1932–1937.

[10] Daly M, Axilbund J, Buys S, Crawford B. Genetics/familial high-risk assessment: Breast and Ovarian, Version 1.2014: National Comprehensive Cancer Network, Inc.

[11] Fitzgerald R C, Hardwick R, Huntsman D, Carneiro F, Guilford P, Blair V, International Gastric Cancer Linkage C. Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. Journal of Medical Genetics, 2010; 47(7), 436–444. doi:10.1136/jmg.2009.074237.

[12] Gonzalez K D, Noltner K A, Buzin C H, et al. Beyond li fraumeni syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. Journal of Clinical Oncology, 2009; 27(8), 1250–1256. doi:10.1200/JCO.2008.16.6959.

[13] Hearle N, Schumacher V, Menko F H, et al. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. Clinical Cancer Research, 2006; 12(10), 3209–3215. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0083.

[14] Tan, M H, Mester J L, Ngeow J, et al. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. Clinical Cancer Research, 2012; 18(2), 400–407. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2283.

[15] Kobayashi H.; Ohno S.; Sasaki Y.; Matsuura M. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (Review). ONCOLOGY REPORTS, 2013; 30: 1019-1029.

[16] Walsh T, Lee M K, Casadei S, 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; 107: 12629 – 12633.

[17] Ku C S, Cooper D N, Iacopetta B, et al. Integrating next-generation sequencing into the diagnostic testing of inherited cancer predisposition. Clin Genet, 2013; 83: 2 – 6.

[18] Domchek S M, Bradbury A, Garber J E et al. Multiplex genetic testing for cancer susceptibility: out on the high wire without a net? J Clin Oncol, 2013; 31: 1267 – 1270.

[19] Pritchard C C, Smith C, Salipante S J, et al. ColoSeq provides comprehensive lynch and polyposis syndrome mutational analysis using massively parallel sequencing. J Mol Diagn, 2012; 14:357–366.

[20] Walsh T, Casadei S, Lee M K, et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. Proc Natl Acad Sci USA, 2011; 108:18032–18037.

[21] Tung N, Battelli C, Allen B, 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. Wiley Online Library, 2014; 10.1002/cncr.29010

[22] Felix G E S, Abe-Sandes C, Machado-Lopes T M B, et al. Germline mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population. Human Genome Variation 1, 2014; 14012; doi:10.1038/hgv.2014.12

[23] Vargas F R, Bines J, et al. BRCA1 mutations in Brazilian patients. Genetics and Molecular Biology, 2004; 27:500-504.

[24] Simon S D, Molina A, Moreira-Filho C A: Mutations of BRCA1/2 genes in Brazil. ASCO Annual Meeting New Orleans, USA; 2003.

[25] Gomes M C, Costa M M, Borojevic R, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil. Breast Cancer Res Treat, 2007; 103(3):349-53.

[26] Silva F C, Lisboa B C G, Figueiredo M C P, et al. Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. BMC Medical Genetics, 2014; 15:55.

[27] Gilliland F D. Ethnic differences in cancer incidence: a marker for inherited susceptibility? Environ Health Perspect, 1997; 105: 897–900.

[28] Neuhausen S L. Ethnic differences in cancer risk resulting from genetic variation. Cancer, 1999; 86: 2575–2582.

[29] Doherty J, Bonadies D C, Matloff E T. Testing for Hereditary Breast Cancer: Panel or Targeted Testing? Experience from a Clinical Cancer Genetics Practice. J Genet Counsel, 2014; DOI 10.1007/s10897-014-9796-2

[30] Economopoulou P, Dimitriadis G, Psyrri A. Beyond BRCA: New hereditary breast cancer susceptibility genes. Cancer Treatment Reviews, 2015; Vol. 41, 1–8.

[31] Illumina TruSight Câncer – Disponível em http://www.illumina.com/products/trusight_cancer.html - Acessado em 27/04/2015.

[32] Sorting Intolerant From Tolerant. [http://sift.jcvi.org/www/SIFT_BLink_submit.html]

[33] Polyphen-2. [http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/]

[34] ClinVar – Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/ - Acessado em 27/04/2015.

[35] Breast Cancer Information Core (BIC) - Disponível em: https://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/ - Acessado em 03/05/2015.

[36] LOVD mutation database – Disponível em http://www.lovd.nl/3.0/home - Acessado em 03/05/2015.

[37] IARC TP53 Database – Disponível em http://p53.iarc.fr/ - Acessado em 03/05/2015.

[38] Esteves V F, Thuler L C, Amêndola L C, et al. Brazilian Network of Breast and Ovarian Familial Cancer Aggregation: Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in families with medium and high risk of breast and ovarian cancer in Brazil. Braz J Med Biol Res, 2009; 42(5):453–457.

[39] Ewald I P, Izetti P, Vargas F R, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil. Breast Cancer Res Treat, 2007; 103:349e53.

[41] Tung, N, Battell C, Allen B, 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. Wiley Online Library, 2014. Disponível em: wileyonlinelibrary.com.

[42] Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. Nature, 2012; 490:61-70.

[43] Ewald I P, Vargas F R, Moreira M A, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 founder mutations in Brazilian hereditary breast and ovarian câncer families. J Clin Oncol 2008; 26 (Suppl 15): 22108

[44] Finkelman B S, Rubinstein W S, Friedman S, et al. Breast and Ovarian Cancer Risk and Risk Reduction in Jewish BRCA1/2 Mutation Carriers. J Clin Oncol, 2012; 30(12):1321–1328.

[45] Hamel N, Feng B J, Foretova L,et al. On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations. Eur J Hum Genet, 2011; 19(3):300–306.

[46] Rodríguez A O, Pardo G G, Royer R, Larson G, Weitzel J N et al. BRCA1 and BRCA2 mutations among ovarian cancer patients from Colombia. Gynecol Oncol, 2012; 124: 236–243.

[47] Lourenço J J, Vargas F R, Bines J, et al. BRCA1 mutations in Brazilian patients. Genet Mol Biol, 2004; 27: 500–504.

[48] Didraga M A, van Beers E H, Joosse S A, et al. A non-BRCA1/2 hereditary breast cancer sub-group defined by aCGH profiling of genetically related patients. Breast Cancer Res. Treat., 2011; 130, 425–436.

[49] Yiannakopoulou E. Etiology of familial breast cancer with undetected BRCA1 and BRCA2 mutations: clinical implications. Cell Oncol. (2014) 37:1–8

[50]. Johnson N, Fletcher O, Palles C, et al. Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility. Hum Mol Genet, 2007; 16:1051–7.

[51] Fletcher O, Johnson N, Silva I S, et al. Missense Variants in ATM in 26.101 Breast Cancer Cases and 29.842 Controls. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010; 19(9): 2143–2151.

[52] Roberts N J, Jiao Y, Yu J, et al. ATM mutations in hereditary pancreatic cancer patients. Cancer Discov, 2012; 2(1): 41–46

[53] Goldgar D E , Healey S , Dowty J G, et al. Rare variants in the ATM gene and risk of breast câncer. Breast Cancer Research, 2011; 13:R73.

[54] Renwick A, Thompson D, Seal S, et al. ATM mutations that cause ataxia telangiectasia are breast cancer susceptibility alleles. Nat Genet, 2006; 38:873-875.

[55] Thompson D, Duedal S, Kirner J, et al. Cancer risks andmortality in heterozygous ATM mutation carriers. J NatlCancer Inst, 2005; 97:813-822.

[56] Cantor S B, Guillemette S. Hereditay breast câncer and the BRCA1-associated FANCJ/BACH1/BRIP1. Future Oncol, 2011; 7(2): 253–261.

[57] Levran O, Attwooll C, Henry R T, et al. The BRCA1-interacting helicase BRIP1 is deficient in Fanconi anemia. Nat. Genet, 2005; 37(9):931–933.

[58] Seal S, Thompson D, Renwick A, et al. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene *BRIP1* are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. Nat. Genet, 2006; 38(11):1239–1241.

[59] Kote-Jarai Z, Jugurnauth S, Mulholland S, et al. A recurrent truncating germline mutation in the*BRIP1/FANCJ* gene and susceptibility to prostate cancer. Br. J. Cancer, 2009; 100(2):426–430.

[60] Seal S, Thompson D, Renwick A, et al.: Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. Nat Genet, 2006; 1239-41.

[61] Dossus L, Benusiglio P R. Lobular breast câncer: incidence and genetic and non-genetic risk fator. Breast Cancer Res, 2015; 17(1): 37.

[62] Allinen M M, Huusko P, Mäntyniemi S, Launonen V, Winqvist R. Mutation analysis of the CHEK2 gene in families with hereditary breast cancer. Br J Cancer, 2001; 85: 209–212.

[63] 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; 75: 1131–1135.

[64] Friedman L, Ostermeyer E A, Szabo C I, et al. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. Nat Genet, 1994; 8: 399–404.

[65] Carraro D M, Folgueira M A A K, Lisboa B C G, 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: e57581.

[66] Abud J, Prolla J C, Rossi C, et al. CHEK2 1100DELC germline mutation: a frequency study in hereditary breast and colon câncer Brazilian families. Arq Gastroenterol, 2012; 49: 273–278.

[67] Bąk A, Janiszewska H, Junkiert-Czarnecka A, et al. A risk of breast cancer in women - carriers of constitutional CHEK2 gene mutations, originating from the North - Central Poland. Hereditary Cancer in Clinical Practice, 2014; 12:10.

[68] Boesaard E P, Vogelaar I P, Bult P, et al. Germline MUTYH gene mutations are not frequently found in unselected patients with papillary breast carcinoma. Hereditary Cancer in Clinical Practice, 2014; 12:21.

[69] Bogdanova N, Sokolenko A P, Iyevleva A G. PALB2 mutations in German and Russian patients with bilateral breast câncer. Breast Cancer Res Treat, 2011; 126:545–550.

[70] Slater E P, Langer P, Niemczyk E, Strauch K, Butler J, et al. PALB2 mutations in European pancreatic cancer families. Clin Genet. 2010; 78:490–494

[71] Rahman N, Seal S, Thompson D, et al. PALB2, which encodes a BRCA2 interacting protein, is a breast cancer susceptibility gene. Nat Genet, 2007; 39:165-167.

[72] Southey M C, Teo Z L, Dowty J G, et al. A PALB2 mutation associated with high risk of breast cancer. Breast Cancer Res, 2010; 12:R109.

[73] Heikkinen T, Karkkainen H, Aaltonen K, et al. The breast cancer susceptibility mutation PALB2 1592delT is associated with na aggressive tumor phenotype. Clin Cancer Res. 2009;15:3214-3222.

[74] Antoniou A C, Casadei S, Heikkinen T, et al. Breast-Cancer Risk in Families with Mutations in PALB2. N Engl J Med, 2014; 371:497-506.

[75] Daniels M S, Lu K H. Clearer Picture of PMS2-Associated Lynch Syndrome Is Emerging. Journal of Clinical Oncology, 2014; Vol 32.

[76] Meindl A, Hellebrand H, Wiek C, Erven V, et al. Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. Nat Genet, 2010; 42(5):410–4.

[77] Blanco A, Gutierrez-Enriquez S, Santamarina M, et al. RAD51C germline mutations found in Spanish site-specific breast cancer and breast–ovarian cancer families. Breast Cancer Res Treat, 2014; 147(1):133–43.

[78] Osorio A, Endt D, Fernandez F, Eirich K, et al. Predominance of pathogenic missense variants in the RAD51C gene occurring in breast and ovarian cancer families. Hum Mol Genet, 2012; 21(13):2889–98.

[79] Rashid M U, Muhammad N, Faisal S, Amin A, Hamann U. Deleterious RAD51C germline mutations rarely predispose to breast and ovarian cancer in Pakistan. Breast Cancer Res Treat, 2014; 145(3):775–84.

[80] Gonzalez K D, Noltner K A, Buzin C H, et al. Beyond Li Fraumeni syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. J Clin Oncol, 2009; 27(8):1250–6.

[81] Melhem-Bertrandt A, Bojadzieva J, Ready KJ, et al. Early onset HER2-positive breast cancer is associated with germline TP53 mutations. Cancer, 2012; 118(4):908–13.

[82] McCuaig J M, Armel S R, Novokmet A, et al. Routine TP53 testing for breast cancer under age 30: Ready for prime time? Fam Cancer, 2012; 11:607–613.

[83] Mouchawar J, Korch C, Byers T, et al.: Population-based estimate of the contribution of TP53 mutations to subgroups of early-onset breast cancer: Australian Breast Cancer Family Study. Cancer Res, 2010; 70:4795–4800.

[84] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology for Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian V.1.2014. © National Comprehensive Cancer Network, Inc. 2014. All rights reserved. Acessado em 06/05/2015.

[85] Achatz M I, Hainaut P, Ashton-Prolla P: Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? Lancet Oncol, 2009; 10(9):920–925.

[86] Caputo S, Benboudjema L, Sinilnikova O, Rouleau E, Béroud C, Lidereau R, French BRCA GGC Consortium. Description and analysis of genetic variants in French hereditary breast and ovarian cancer families recorded in the UMD BRCA1/BRCA2 databases. Nucleic Acids Res, 2012; 40(Database issue):D992–D1002. doi: 10.1093/nar/gkr1160. Epub 2011.

[87] Frank T S, Deffenbaugh A M, Reid J E, et al. Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. J Clin Oncol, 2002; 20:1480-1490.

[88] Eggington J M, Bowles K R, Moyes K, et al. A comprehensive laboratory-based program for classification of variants of uncertain significance in hereditary cancer genes. Clin Genet, 2014; 86:229-237.

[89] National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Fort Washington, PA: NCCN; 2014. All rights reserved. Acessado em 06/05/2015.

Anexos

8 ANEXOS

8.1 ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O sr(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa chamada **"Estudo de SNPs associados com câncer na população brasileira de risco"**, que pretende estudar variantes no DNA (SNPs) que já foram relacionados à predisposição para o desenvolvimento de câncer em estudos com outras populações, buscando avaliar a distribuição destes SNPs na população brasileira.

O sr(a) foi selecionado(a) a participar dessa pesquisa pois o seu médico o avaliou, através de seus dados clínicos como análise do histórico familiar e pessoal de casos de câncer, que você apresenta características importantes que sugerem a presença de variações no DNA que podem aumentar o risco para o desenvolvimento de câncer. O exame indicado pelo seu médico, que será realizado pela empresa Inteligene Genética Integrada, divisão de saúde da empresa Genotyping Laboratório de Biotecnologia LTDA, fornecerá os dados de sequenciamento do DNA para este estudo e o seu médico fornecerá a informação do histórico de câncer desenvolvido por você e seus familiares.

Não será necessário coletar mais nenhum material biológico além do já coletado e enviado à empresa para realização do seu exame. Nenhum procedimento, além do solicitado por você será realizado com o material coletado. Portanto este estudo não envolve manipulação da amostra já que utilizará apenas os dados de sequenciamento gerados pelo seu exame.

Acreditamos que o conhecimento destas características e variações do DNA poderá auxiliar estudos posteriores destes SNPs como marcadores de suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer na população brasileira. A importância de se identificar marcadores genéticos de predisposição ao desenvolvimento de câncer é valida-los e posteriormente utiliza-los para o diagnóstico em pacientes e familiares que apresentam características sugestivas de câncer hereditário. Este diagnóstico tem importância para o acompanhamento do paciente, possibilitando medidas preventivas e a identificação precoce da doença, o que pode impedir o desenvolvimento, além de melhorar o tratamento e as chances de cura do câncer.

Caso você não queira participar da pesquisa, é seu direito e isso não vai interferir com seu tratamento ou preferência de agendamento médico, assim como interferências trabalhistas. Você poderá retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem nenhum prejuízo.

É garantido total sigilo do seu nome, imagem, resultado de exame ou doença, em relação aos dados relatados nesta pesquisa.

Você receberá uma via deste termo, e outra via será mantida em arquivo pelo pesquisador por cinco anos.

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3880-1608 / 1609.

CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA

Nome:_____
Assinatura:_____

Pesquisadora: Daíse Moreno Sás
Data: ____/____/____ Assinatura:_____

Contatos:
Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla, IBTEC - Instituto de Biotecnologia da Unesp, Alameda das Tecomarias, S/N, Chácara Capão Bonito, CEP: 18607-440, Distrito de Rubião Junior, Botucatu – SP.
Fone: (14) 3880-0849. E-mail: pribolla@ibb.unesp.br
Pesquisadora: Daíse Moreno Sás, IBTEC - Instituto de Biotecnologia da Unesp, Alameda das Tecomarias, S/N, Chácara Capão Bonito, CEP: 18607-440, Distrito de Rubião Junior, Botucatu – SP.
Fone: (18) 3880-0849. E-mail: daisesas@gmail.com

8.2 ANEXO 2

FACULDADE DE MEDICINA DE BOTUCATU -UNESP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de SNPs associados com câncer na população brasileira de risco

Pesquisador: Daíse Morenos Sás

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

Considerações Finais a critério do CEP:
Projeto de Pesquisa APROVADO em reunião EXTRAORDINÁRIA do CEP de 20 de maio de 2014, sem necessidade de envio à CONEP.

BOTUCATU, 21 de Maio de 2014

Assinado por:
Eliana Aguiar Petri Nahas
(Coordenador)

Endereço: Chácara Butignolli , s/n
Bairro: Rubião Junior **CEP:** 18.618-970
UF: SP **Município:** BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1608 **E-mail:** capellup@fmb.unesp.br