

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Síndromes de predisposição hereditária ao câncer de mama e/ou ovário:
análises genômicas, epidemiologia molecular e caracterização clínica**

Bárbara Alemar Beserra Temes

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Orientadora: Prof^a Dr^a Patricia Ashton-Prolla

Porto Alegre, dezembro de 2017.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA); no Departamento de Ciências Populacionais/Divisão Clínica de Genômica do Câncer do *City of Hope Medical Center* (Duarte, EUA), com financiamento do *Breast Cancer Research Foundation/Avon* e do *National Cancer Institute* (NCI); e no Laboratório de Patologia Molecular (Reis-Lab) do *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* (Nova York, EUA).

Dedicatória

Aos pacientes, para os quais dedicamos todos nossos esforços, e sem os quais este trabalho não seria possível.

Agradecimentos

Meu primeiro agradecimento é para a Professora Patricia Ashton-Prolla, pela confiança depositada em mim durante esses anos, pela oportunidade de realizar este trabalho, e pelo crescimento pessoal e profissional que ela me proporcionou. Obrigada por todo seu empenho em tornar este projeto possível, especialmente em um momento tão difícil para fazer Ciência em nosso país. Você é uma inspiração para todos nós.

Aos principais co-autores dos trabalhos apresentados aqui, agradeço pela contribuição valiosa e pela luta incansável em prol do acesso dos pacientes ao teste genético: Dra Cristina Netto, Dra Camila Bittar e toda a equipe de Oncogenética do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Dr Osvaldo Artigalás e Dra Ida Schwartz.

Agradeço às agência de fomento que tornaram este trabalho possível, especialmente ao CNPq, pela bolsa de estudos concedida; à CAPES, pela bolsa de doutorado sanduíche; e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por viabilizar nossos projetos em um momento tão delicado.

À todos os colegas do Laboratório de Medicina Genômica, obrigada pela ajuda e pela força! À Yasminne Costa, muito obrigada pela presteza e pela dedicação aos nossos projetos. À Isabel Bandeira, muito obrigada pelos desabafos, pela força e empenho em ajudar a todos.

Um agradecimento especial aos grandes amigos que a vida acadêmica me deu, e cujo apoio foi essencial para tornar este trabalho possível. Gabriel Macedo, obrigada por compartilhar as risadas, sufocos e expectativas. É uma honra te ter na minha vida. Cleandra Gregório, um presente que o LMG trouxe pra mim em forma de aluna de IC, e com quem agora tenho o prazer de realizar tantos projetos no doutorado. Mariana Fitarelli, que além de exemplo de conduta profissional e ética, é um exemplo de caráter. Fernanda Vianna, obrigada pela inspiração e pela ajuda. A amizade e apoio de vocês foram fundamentais para esta tese. Muito obrigada!

Aos colaboradores do City of Hope, Dr Jeffrey Weitzel e, especialmente, Josef Herzog, meu conselheiro em assuntos de *BRCA*, pela ajuda em diversas etapas deste trabalho. Obrigada pela dedicação, e pela oportunidade.

Ao Dr Jorge Reis-Filho e à Dra Britta Weigelt, agradeço pela paciência e pela oportunidade de colaboração. Aos colegas do Reis-Lab, Jonh Lozada, Fresia Pareja, Alissa Brandes, Anqi Li, Felipe Geyer, Arnauld da Cruz, Rodrigo Gularte e Charles Ashley, pela parceria, ensinamentos e oportunidades, e também pelas risadas, que tornaram a pesada rotina do laboratório tão mais agradável. À Thais Basilli, muito obrigada pela amizade e por me apoiar em uma fase tão difícil. E, é claro, estendo os agradecimentos ao querido Diego Coutinho. Obrigada pelas risadas, amizade e suporte!

À todos os integrantes do Pancreas Team, em especial ao Professor Alessandro Osvaldt e à Simone Machado. Obrigada por entender minha ausência nestes últimos meses, pela perseverança em manter de pé um projeto tão lindo, e por toda a dedicação.

À todos do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (UFRGS), pela excelência e profissionalismo. Um agradecimento especial ao Elmo Cardodo, cuja dedicação ao PPG é incansável, e sem o qual não seríamos quem somos hoje.

Aos diversos colaboradores envolvidos neste projeto, em especial aos membros da Rede Brasileira de Câncer Hereditário e à Dra Edenir Palmero, por viabilizar o alcance deste projeto. E também àqueles que, mesmo de forma indireta, contribuíram de forma tão importante para este trabalho: Professora Ursula Matte, Dra Patricia Koehler, Jefferson Beck e Everaldo Batista. Obrigada! Uma tese de Doutorado é fruto de um trabalho coletivo, e muito suporte. Àqueles que não estão listados aqui mas contribuíram de alguma forma para este trabalho fica aqui registrado o meu muito obrigada!

Um agradecimento especial às minhas musas inspiradoras: à minha mãe, Sandra, que é minha referência em garra, dedicação e perseverança, e que mesmo de longe não mede esforços para ajudar em todas as etapas deste caminho. Minha avó Maria José, a mulher mais linda, forte e guerreira que eu já conheci, e que eu tenho a honra de conviver. Você me faz falta em cada minuto

do meu dia. Obrigada por me ensinar tanto, e sempre. E à minha madrinha, Marta Célia, que tanto me inspira e que foi fundamental para que minha vida acadêmica florescesse. Eu sou o resultado do amor que recebi de vocês. Muito obrigada por isso. E ao meu pai, exemplo de profissionalismo e caráter, e que faz muita falta nessa jornada. À toda minha família e aos meus amigos, pelo apoio incondicional, e por entender minha ausência tantas vezes. Especialmente ao Luca Alemar, Franz Wenzel, Yara Ely, Bruna Temes, Sergio Ilha e Isabelle Mazza. À Maya, minha companheira de quatro patas, agradeço pelo amor, pelo carinho e pela companhia nas longas noites de estudo.

Por fim, agradeço àquele que compartilhou comigo todas as risadas e lágrimas deste caminho, e sem o qual este trabalho não seria possível. Fernando Temes, seu apoio e amor, incondicionais e constantes, foram fundamentais para este trabalho, assim como são fundamentais na minha vida. Obrigada por entender e aceitar as minhas escolhas, e estar ao meu lado sempre!

Sumário

Capítulo I – Introdução	15
1.1 Epidemiologia do câncer de mama e ovário	16
1.1.1 Câncer de mama	16
1.1.2 Câncer de ovário.....	18
1.2 Predisposição hereditária ao câncer	19
1.2.1 Síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário ..	20
1.2.1.1 Critérios de testagem e recomendações de manejo	21
1.2.1.2 O papel <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	30
1.2.1.3 A contribuição de outros genes	34
1.2.1.4 A importância e as limitações dos painéis multigênicos	36
1.2.2 Síndrome de Li-Fraumeni	38
1.2.2.1 Caracterização clínica e o papel de <i>TP53</i>	38
1.2.2.2 Mutações germinativas em <i>TP53</i> e câncer de mama.....	41
1.2.2.3 O perfil somático dos tumores de pacientes Li-Fraumeni.....	42
Capítulo II – Justificativa	46
Capítulo III – Objetivos	49
Capítulo IV – Artigo 1	51
Prevalence of Hispanic <i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i> mutations among hereditary breast and ovarian cancer patients from Brazil reveals differences among Latin American populations.	
Capítulo V – Artigo 2	58
The germline mutational landscape of <i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i> in Brazil.	
Capítulo VI – Artigo 3	63
Sreening and characterization of <i>BRCA2</i> c.156_157insAlu in Brazil: results from over 1000 individuals.	

Capítulo VII – Artigo 4	67
<i>BRCA1</i> and <i>BRCA2</i> mutational profile and prevalence in Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: are international testing criteria appropriate for this specific population?	
Capítulo VIII – Artigo 5	94
Multigene panel testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer in Brazil	
Capítulo IX – Artigo 6	97
Homologous recombination repair genes and inherited breast and ovarian cancer predisposition.	
Capítulo X – Artigo 7	100
The genetic landscape of breast tumors related to the Li-Fraumeni syndrome.	
Capítulo XI – Discussão	102
11.1. Perfil clínico e alterações moleculares de indivíduos que preenchem critérios para a síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário no Brasil	
	103
11.2. Caracterização do repertório de alterações somáticas dos tumores de mama relacionado à síndrome de Li-Fraumeni.....	
	109
Capítulo XII – Perspectivas	111
Capítulo XIII – Referências Bibliográficas	114
Capítulo XIV – Anexos	130

Lista de abreviaturas

ANS	Agência Nacional de Saúde Suplementar
ASBS	<i>American Society of Breast Surgeons</i> (Sociedade Americana de Cirurgiões de Mama)
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i> (Sociedade Americana de Oncologia Clínica)
ATM	Gene <i>ATM</i> (<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>)
BRCA1	Gene <i>BRCA1</i> (<i>Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein</i>)
BRCA2	Gene <i>BRCA2</i> (<i>Breast Cancer Type 2 Susceptibility Protein</i>)
BRIP1	Gene <i>BRIP1</i> (<i>BRCA1-Associated C-Terminal Helicase 1</i>)
CAC	Carcinoma adrenocortical
CDH1	Gene <i>CDH1</i> (<i>Cadherin 1</i>)
CHEK2	Gene <i>CHEK2</i> (<i>Checkpoint Kinase 2</i>)
CM	Câncer de mama
CO	Câncer de ovário
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
HBOC	<i>Hereditary breast and ovarian cancer syndrome</i> (Síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário)
HR	<i>Homologous recombination</i> (Recombinação homóloga)
INCa	Instituto Nacional de Câncer
LFL	Síndrome de Li-Fraumeni-Like
NBN	Gene <i>NBN</i> (<i>Nijmegen Breakage Syndrome 1</i>)
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i> (Rede Nacional de Câncer)
NF1	Gene <i>NF1</i> (<i>Neurofibromatosis-Related Protein NF-1</i>)
NGS	<i>Next generation sequencing</i> (Sequenciamento de nova geração)
NHEJ	<i>Non-homologous end-joining</i> (Junção de extremidades não homólogas)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds-ratio</i> (Razão de chances)
PALB2	Gene <i>PALB2</i> (<i>Partner and Localizer of BRCA2</i>)

<i>PTEN</i>	Gene <i>PTEN</i> (<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>)
<i>RAD51C</i>	Gene <i>RAD51C</i> (<i>RAD51 Paralog C</i>)
<i>RAD51D</i>	Gene <i>RAD51D</i> (<i>RAD51 Paralog D</i>)
RE	Receptores de estrogênio
RNM	Ressonância magnética
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i> (Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais)
SLF	Síndrome de Li-Fraumeni
SSA	<i>Single-strand annealing</i> (Via de anelamento de fita simples)
<i>STK11</i>	Gene <i>STK11</i> (<i>Serine/Threonine Kinase 11</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
<i>TP53</i>	Gene <i>TP53</i> (<i>Tumor Protein P53</i>)
VUS	<i>Variant of uncertain significance</i> (Variante de significado incerto)

Resumo

Uma parcela significativa dos casos de câncer de mama e ovário é consequência de variantes patogênicas germinativas em genes de alta e moderada penetrância, e o diagnóstico molecular é fundamental para definir o manejo adequado dos pacientes e suas famílias. Variantes patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (*BRCA*) são a causa mais comum da síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC), embora outros genes também possam estar envolvidos neste fenótipo. No Brasil, o acesso ao teste genético ainda é muito limitado, e o espectro mutacional de genes relacionados à HBOC é pouco conhecido. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar o perfil clínico, as alterações moleculares e somáticas em indivíduos com síndromes de predisposição hereditária ao câncer de mama e/ou ovário no Brasil.

Inicialmente, avaliamos a utilidade clínica de um painel de baixo custo para genotipagem de variantes patogênicas hispânicas recorrentes em *BRCA* (HISPANEL), visando superar uma das principais limitações de acesso ao teste: o custo. Embora seja eficaz em outras populações da América Latina, o painel avaliado apresentou uma baixa capacidade de detecção na nossa população. Apesar de não ser efetivo em seu formato atual, o HISPANEL poderia ser customizado com as variantes patogênicas mais frequentes no Brasil. Assim, buscando identificar estas alterações e caracterizar o perfil mutacional de *BRCA* no Brasil, realizamos uma compilação de 649 mutações reportadas em 11 estados brasileiros. No entanto, os resultados deste trabalho mostraram que são poucas as mutações recorrentes e/ou fundadoras presentes na nossa população. Em um próximo passo, mostramos que a mutação fundadora portuguesa *BRCA2* c.156_157insAlu está presente em 0,65% dos 1.380 probandos testados (com critérios HBOC) não sendo, portanto, tão frequente no Brasil quanto em Portugal. No entanto, ela é a terceira mutação mais frequente de *BRCA2* na nossa população, e tem sido negligenciada no diagnóstico molecular de HBOC. Assim, estes dados ressaltam a importância de sua inclusão nos testes de rotina para este gene. Em um grupo de famílias HBOC do Rio Grande do Sul, caracterizamos o perfil e a prevalência de mutações em *BRCA*, e avaliamos a sensibilidade dos

critérios de testagem empregados atualmente. Ao todo, 19,1% de todos os 418 probandos com critérios HBOC apresentavam mutações em *BRCA*, enquanto 5,7% dos casos possuíam ao menos uma variante de significado incerto (VUS). Além disso, este trabalho demonstrou a importância do detalhamento da história familiar e revelou um subgrupo de critérios com maior chance de identificar uma mutação patogênica em *BRCA*. Em um contexto de recursos limitados, estes critérios podem ser utilizados como uma ferramenta para priorizar a testagem de indivíduos com maior risco.

Através da análise dos dados de painéis multigênicos testados por sequenciamento de nova geração, avaliamos a contribuição de outros genes no fenótipo HBOC, além de *BRCA*. Entre os 358 probandos com critérios HBOC testados, 18,2% apresentavam uma variante patogênica em genes de alto e moderado risco, incluindo *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*, *ATM*, *CHEK2* e *MUTYH*. Embora essa abordagem apresente algumas desvantagens, como o alto número de VUS (identificadas em 35,5% dos probandos), a utilização de painéis multigênicos permite a identificação de mutações em genes não-*BRCA*, beneficiando assim um número maior de pacientes. O papel destes e outros genes, envolvidos no fenótipo HBOC através de sua atuação no reparo de quebras bifilamentares no DNA por recombinação homóloga, foi detalhado em um artigo de revisão.

Finalmente, realizamos um estudo inédito com o objetivo de caracterizar o perfil de alterações somáticas de tumores de mama diagnosticados em pacientes com síndrome de Li-Fraumeni, isto é, portadores de mutações germinativas em *TP53*. Este trabalho mostrou que estes tumores apresentam poucas mutações recorrentes, e uma carga mutacional alta, em comparação com tumores de mama esporádicos. Além disso, os tumores de mama relacionados à mutações germinativas em *TP53* possuem uma contribuição significativa da assinatura 3 (típica de tumores relacionados à perda de função em *BRCA1* e *BRCA2*), além de assinaturas mutacionais nunca descritas em tumores de mama esporádicos. Juntos, esses resultados sugerem que tumores de mama de pacientes com mutações germinativas em *TP53* podem ser deficientes na via de recombinação homóloga.

Abstract

An important fraction of all breast and ovarian cancers can be attributed to germline mutations in high and moderate penetrance cancer genes, and the identification of such mutations is essential to define the management and genetic counseling of these patients and their families. Germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* (*BRCA*) are the most common cause of hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC), but mutations in other genes can also be associated with this phenotype. In Brazil, there is very limited access to genetic testing, and the mutational profile of HBOC-related genes is largely unknown. Thus, in this work we aimed to characterize the clinical profile, the germline and somatic mutations in individuals at-risk for hereditary breast and/or ovarian cancer predisposition in Brazil.

We evaluate the clinical utility of a low-cost panel designed to genotype *BRCA1* and *BRCA2* recurrent Hispanic mutations (HISPANEL). Although this is a sensitive tool in other Latin-American populations, the HISPANEL had a low mutation detection-rate among our cohort, precluding its use as a screening tool in its current composition. This panel, however, could be customized to include recurrent Brazilian mutations which would likely increase its sensitivity. Thus, we next sought to identify recurrent and/or founder mutations, and characterized the mutational landscape of *BRCA* variants in Brazil. We compiled data from 649 *BRCA* mutations reported in patients from 11 Brazilian States, and these results showed a highly heterogeneous profile, and only few recurrent mutations.

Next, we screened 1,380 HBOC probands for the Portuguese founder mutation *BRCA2* c.156_157insAlu, and found a mutational prevalence of 0.65%, far less than observed in Portugal. Despite its overall low frequency, this is the third most frequent *BRCA2* mutation in Brazil, and it has been neglected in the molecular testing of HBOC, since a specific protocol is required for its detection. This data highlights the importance of including specific testing for this mutation in routine HBOC testing in Brazil.

The characterization of the *BRCA* molecular profile of probands from Southern Brazil showed a prevalence of pathogenic mutations variants of

uncertain significance (VUS) of 19.1% and 5.7% of 418 tested HBOC probands, respectively. We also characterize the clinical profile of this cohort, and the evaluation of international testing criteria revealed a set of high-sensitivity criteria, which enables the prioritization of high-risk individuals as a first step towards offering testing in a scenario of limited resources.

Aiming to assess the contribution of germline mutations in cancer predisposing genes to the HBOC phenotype, we evaluated multigene panel sequencing results from 358 probands. Among them, 18.2% carried a pathogenic germline mutation in high and moderate risk genes, including *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*, *ATM*, *CHEK2* and *MUTYH*. Although this approach has some caveats, such as the high number of VUS (reported in 35.5% of all probands), the use of multigene panels allows the identification of mutations in several non-BRCA genes, and may benefit a large number of patients.

Finally, considering the paucity of information about breast cancers arising in carriers of TP53 germline mutations (i.e. Li-Fraumeni syndrome patients), we sought to define the repertoire of somatic genetic alterations and the mutational signatures underpinning these tumors. The analyses revealed that these breast tumors harbored only few recurrent mutations, and present an increased burden of somatic mutations and copy number alterations. Interestingly, most tumors had a significant contribution of Signature 3, and many had a high large-scale transitions score. Breast cancers from germline *TP53* mutation carriers might have an impairment in the homologous recombination repair pathway.

Capítulo I – Introdução

1. Introdução

Em seu relatório mais recente, o *World Cancer Report 2014*, a Organização Mundial da Saúde (OMS) mostra que 14 milhões de novos casos e oito milhões de mortes por câncer foram reportados em 2012, reforçando o impacto do câncer como um problema de saúde pública. Estima-se ainda que o número de novos casos cresça nas próximas duas décadas, e em 2035 são estimados 23 milhões de casos novos e 14 milhões de óbitos relacionados ao câncer no mundo, não considerando tumores de pele não-melanoma. Em 2012, os tipos mais comuns de câncer em homens foram pulmão (16,7% do total de casos), próstata (15%), colorretal (10%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Entre as mulheres, os tumores mais frequentes foram mama (25%), colorretal (9,2%), pulmão (8,7%), colo de útero (7,9%) e estômago (4,8%) (SEER, 2017; Stewart & Wild, 2014).

Enquanto os países mais desenvolvidos apresentam as maiores taxas de incidência da doença, bem como sistemas de saúde mais organizados e que facilitam a detecção e o tratamento, mais de 60% dos tumores são diagnosticados na África, Ásia e nas Américas Central e do Sul, que juntas respondem por 70% de todos os óbitos por câncer (SEER, 2017; Stewart & Wild, 2014).

1.1 Epidemiologia do câncer de mama e ovário

1.1.1 Câncer de mama

O câncer de mama (CM) é o tipo de câncer mais frequente entre as mulheres em todo o mundo, em países desenvolvidos ou não. No último levantamento global estimou-se que cerca de 1,67 milhão de casos novos dessa neoplasia foram diagnosticados mundialmente. As taxas de incidência de câncer de mama variam entre as diferentes regiões do mundo, sendo as maiores taxas na América do Norte (91.6/100 mil) e as menores taxas no Leste e Centro da Ásia (28.5/100 mil) (Stewart & Wild, 2014).

No ano de 2017, de acordo com os registros do *Surveillance, Epidemiology and End Results* (SEER) nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que

252.710 mulheres (30% de todos os novos casos de câncer entre mulheres) e 2.470 homens serão diagnosticadas com câncer de mama, o que corresponde a 15% de todos os novos casos de câncer do país. Entre todos estes casos, estima-se que mais de 41 mil mortes serão decorrentes da doença. Embora a idade média dos pacientes ao diagnóstico nos EUA seja de 62 anos, 10,5% dos casos de câncer de mama no país são diagnosticados em mulheres abaixo dos 45 anos de idade (SEER, 2017; Siegel *et al.*, 2017).

No Brasil, através dos dados gerados pelos Registros de Câncer de Base Populacional, o Instituto Nacional de Câncer (INCa) estima que 57.960 novos casos de câncer de mama foram diagnosticados em mulheres em 2016, correspondendo a 28,1% de todos os casos de câncer entre mulheres. As taxas de incidência variam entre as diversas regiões do país, sendo 68, 74, 56, 39 e 22 casos a cada 100 mil habitantes nas regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste, Nordeste e Norte, respectivamente. No Rio Grande do Sul, as estimativas de câncer de mama são alarmantes, e comparada às demais capitais, Porto Alegre apresenta as maiores taxas de incidência da doença, com aproximadamente 131 novos casos a cada 100 mil habitantes em 2016 (INCA, 2016).

Enquanto em países desenvolvidos as taxas de mortalidade por câncer de mama vem diminuindo ao longo dos anos (IARC, 2017), um estudo exploratório realizado por Rocha-Brischiliari e colaboradores que avaliou as taxas de mortalidade por câncer de mama entre 1996 a 2013 e incluiu dados de mais de 130 mil mulheres de todas as regiões do Brasil, revelou um aumento contínuo nas taxas de mortalidade. Algumas regiões apresentaram, no entanto, um declínio nas taxas de mortalidade em anos específicos, e a região Sudeste foi a única com taxas de mortalidade estáveis nos anos analisados. Assim como a média nacional, as demais regiões apresentaram um aumento em suas taxas de mortalidade, especialmente em mulheres jovens (diagnosticadas entre os 20-49 anos) (Rocha-Brischiliari *et al.*, 2017). Achados similares foram publicados em outros estudos, que revelaram uma estabilização ou declínio nas taxas de mortalidade por câncer de mama nos Estados da região Sudeste, e um aumento significativo nas taxas de mortalidade das demais regiões, especialmente Norte e Nordeste (Cecilio *et al.*, 2015; Freitas-Junior *et al.*, 2012).

As variações nas taxas de mortalidade, tanto entre países quanto entre regiões, são um provável reflexo da inequidade de acesso ao diagnóstico e tratamento. Sendo um país de dimensão continental, o Brasil apresenta diferenças regionais e sociais importantes, que se refletem na eficácia do sistema de saúde (Paim *et al.*, 2011). De fato, um estudo recente mostrou que os Estados brasileiros com as maiores taxas de mortalidade por câncer de mama são aqueles com os mais baixos Índices de Desenvolvimento Humano (Gonzaga *et al.*, 2015).

1.1.2 Câncer de ovário

Estima-se que 238 mil mulheres foram diagnosticadas com câncer de ovário em 2012, em todo o mundo, correspondendo a 3.6% de todas as neoplasias diagnosticadas em mulheres. As mais altas taxas de incidência foram observadas na Europa e na América do Norte (Stewart & Wild, 2014). Nos EUA, estima-se que em 2017 serão diagnosticados 22.440 novos casos de câncer de ovário, correspondendo a 1.3% de todos os novos casos de câncer, entre os quais 14.080 devem ir a óbito. A faixa etária com maior incidência de novos casos é 55-64 anos, que corresponde a 24,3% dos diagnósticos, sendo 63 anos a idade média ao diagnóstico (SEER, 2017; Siegel *et al.*, 2017). No Brasil, estima-se que 6.150 mulheres foram diagnosticadas com câncer de ovário em 2016, correspondendo a uma incidência média estimada em 6 casos a cada 100 mil habitantes. O câncer de ovário é o quinto mais incidente na região Centro-Oeste brasileira, com um risco estimado aproximado de 7/100 mil. Nas regiões Sul (7/100 mil), Sudeste (7/100 mil) e Nordeste (5/100 mil), é o sétimo mais comum, enquanto na região Norte ocupa a oitava posição, com uma incidência estimada de aproximadamente 3/100 mil (INCA, 2016). Nos últimos anos, embora as taxas de mortalidade por câncer de ovário tenham declinado nos EUA (SEER, 2017) e em outros países desenvolvidos (IARC, 2012), no Brasil os dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade do Instituto Nacional de Câncer (INCa) revelam um aumento entre 1979 e 2014 (INCA, 2017).

1.2 Predisposição hereditária ao câncer

O primeiro relato de uma família com predisposição hereditária ao câncer foi feito pelo médico francês Pierre Paul Broca, em 1866. Sua esposa desenvolveu câncer de mama em idade jovem, e uma análise cuidadosa da sua história familiar revelou que diversos familiares haviam sido diagnosticados com esta e outras neoplasias ao longo de quatro gerações, levando Broca a postular a possibilidade de uma forma hereditária de câncer (Broca, 1866). Pouco tempo depois, no Rio de Janeiro, o oftalmologista brasileiro Hilário de Gouvêa iniciou o acompanhamento de uma família com diagnóstico de múltiplos retinoblastomas. Tendo realizado a enucleação ocular do pai afetado em 1872, Gouvêa atende posteriormente dois de seus filhos, diagnosticados com a mesma doença e sendo um deles com tumores bilaterais (Monteiro & Waizbort, 2007). O caso é reportado em 1886 nos Boletins da Sociedade de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro, e só é publicado internacionalmente em 1910 (de Gouvea, 1886; de Gouvêa, 1910). Nesta mesma época, outros relatos de retinoblastoma hereditário já haviam sido reportados (Marshall, 1897; Thompson & Knapp, 1874; von Graefe, 1868). Quase um século mais tarde, o retinoblastoma se tornaria o modelo ideal para explicar a inativação de genes supressores de tumor, servindo de base para a hipótese de dois eventos descrita por Alfred Knudson em 1971. Segundo este modelo, a predisposição hereditária ao câncer é dada por uma mutação germinativa em um dos alelos de um gene supressor de tumor, enquanto a iniciação da tumorigênese requer que o segundo alelo seja inativado por evento somático (Knudson, 1971). Nesta mesma época, a observação da recorrência de determinados tipos tumorais, do diagnóstico em idade precoce e o número de gerações afetadas por câncer em algumas famílias despertaram a atenção da comunidade médica e científica, fornecendo mais evidências sobre a existência de diversas síndromes de predisposição hereditária aos mais diversos tipos de câncer (Li *et al.*, 1988; Lynch *et al.*, 1966). As alterações genéticas que provocavam cada uma destas síndromes, no entanto, só foram descobertas anos mais tarde, nos anos 1980 e 1990 (Foulkes, 2008).

Atualmente, são reconhecidas várias síndromes de predisposição hereditária ao câncer que incluem alto risco para câncer de mama e/ou de ovário, como a síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (OMIM #604370 e #612555) e a síndrome de Li-Fraumeni (OMIM #151623). Em ambas, mutações germinativas em genes de alta penetrância são responsáveis por uma parcela significativa dos casos, embora frequentemente não seja possível identificar uma alteração genética em famílias que preenchem critérios clínicos para a síndrome em questão (“*missing heritability*”) (Southey *et al.*, 2013).

A identificação de indivíduos em risco para câncer hereditário é importante para viabilizar uma conduta adequada de aconselhamento e testagem genética, possibilitando o manejo adequado da família em risco. Por ser uma síndrome hereditária, a identificação de um indivíduo portador de uma mutação patogênica em um gene de predisposição ao câncer leva à indicação do teste genético para seus familiares, para que seja possível definir o risco individual de cada um. Indivíduos portadores de mutações patogênicas apresentam um risco cumulativo vital muito superior ao da população geral para vários tipos de câncer, e devem ser manejados através de condutas clínicas específicas, que envolvem medidas de rastreamento intensivo e intervenções preventivas eficazes na redução do risco de câncer (Euhus & Robinson, 2013). Por outro lado, a identificação de um indivíduo não-portador da mutação em uma família onde a mutação já foi detectada (casos verdadeiros negativos), indica um risco cumulativo vital igual ao da população geral, permitindo sua tranquilização e eliminando os custos e complicações envolvidas no rastreamento e intervenções preventivas.

1.2.1 Síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário

A OMS preconiza que ao menos 30% de todos os casos de câncer podem ser evitados, uma vez que modificar ou evitar potenciais fatores de risco pode reduzir significativamente o surgimento da doença (IARC, 2012). Assim, a identificação de fatores e grupos de risco é fundamental para possibilitar intervenções adequadas de prevenção e rastreamento, além de otimizar o

diagnóstico precoce. Alguns fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama e ovário estão bem descritos na literatura, como gênero, idade, etnia, densidade do tecido mamário, determinadas condições benignas (lesões proliferativas com e sem atipia) e fatores relacionados ao estilo de vida (nuliparidade, idade de menarca e menopausa, uso de hormônios sintéticos, amamentação, alcoolismo, obesidade). No entanto, tanto para o câncer de mama quanto para o câncer de ovário, uma forte história familiar de câncer de um destes (ou de ambos) tumores é o fator preditivo de risco mais relevante (Cannistra, 2004; McPherson *et al.*, 2000). Estudos de risco empírico, considerando apenas história familiar de 1º grau, mostram que mulheres que tenham familiares de 1º grau diagnosticadas com câncer de mama antes dos 60 anos tem um risco aproximadamente duas vezes maior de desenvolver a doença, quando comparadas à população em geral. Ainda, ter dois familiares de 1º grau com a doença eleva o risco em três vezes (CGHFBC, 2001).

A síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC, do inglês *hereditary breast and ovarian cancer syndrome*) é uma das mais bem conhecidas síndromes de predisposição hereditária ao câncer, com um padrão autossômico dominante e risco de recorrência de 50%. Sua causa mais comum é a presença de mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (coletivamente chamados de genes *BRCA* daqui em diante), mas alterações germinativas em outros genes também ocorrem, embora sejam menos frequentes (Lindor *et al.*, 2008). Em pacientes com câncer de mama e ovário não selecionados pela história familiar de câncer, mutações nos genes *BRCA* são identificadas em até 10% (*Cancer Genome Atlas*, 2012; Nik-Zainal *et al.*, 2016), e 8-15% dos casos, respectivamente (Pal *et al.*, 2005; Risch *et al.*, 2001; Rubin *et al.*, 1998).

1.2.1.1 Critérios de testagem e recomendações de manejo

A identificação de uma família em risco para câncer hereditário se inicia a partir de um caso índice (também chamado de probando), cujas características

clínicas (história pessoal de determinado tumor e idade ao diagnóstico) e história familiar levam à suspeição de uma síndrome hereditária de predisposição ao câncer. Atualmente, existem diversos critérios clínicos de suspeição de HBOC, que definem quais indivíduos devem ser testados para mutações patogênicas nos genes *BRCA*. Estes critérios variam entre as instituições proponentes, sendo os critérios mais aceitos os propostos pela Rede Nacional de Câncer dos Estados Unidos (*National Comprehensive Cancer Network, NCCN*), que são atualizados regularmente (NCCN, 2017). De acordo com sua versão mais recente (2018.1), indivíduos que preencham um ou mais dos critérios descritos no Quadro 1 devem ser testados para mutações germinativas em *BRCA1* e *BRCA2*.

Quadro 1. Critérios de testagem de *BRCA1* e *BRCA2*, de acordo com as diretrizes da NCCN, versão 2018.1.

- Indivíduo de uma família com uma mutação patogênica conhecida em *BRCA1* ou *BRCA2*.
- História pessoal de câncer de mama, e um ou mais dos critérios abaixo:
 - Diagnóstico ≤ 45 anos;
 - Diagnóstico ≤ 50 anos e um ou mais dos critérios abaixo:
 - E um câncer de mama adicional primário;
 - ≥ 1 familiar próximo com câncer de mama em qualquer idade;
 - ≥ 1 familiar próximo com câncer de pâncreas;
 - ≥ 1 familiar próximo com câncer de próstata (escore de Gleason ≥ 7 ou metastático);
 - História familiar limitada ou desconhecida.
- Diagnóstico ≤ 60 anos de câncer de mama triplo negativo.
- Diagnóstico em qualquer idade e um dos critérios abaixo:
 - ≥ 2 familiares próximos com câncer de mama, pâncreas ou próstata (escore de Gleason ≥ 7 ou metastático) em qualquer idade;
 - ≥ 1 familiar próximo diagnosticado com câncer de mama ≤ 50 anos;
 - ≥ 1 familiar próximo com carcinoma de ovário;
 - Um familiar próximo com câncer de mama masculino;
 - Etnia associada a uma alta frequência mutacional (Judeus Ashkenazi, por exemplo);
- História pessoal de carcinoma de ovário.
- História pessoal de câncer de mama masculino.
- História pessoal de câncer de próstata (escore de Gleason ≥ 7 ou metastático) em qualquer idade e ≥ 1 familiar próximo com carcinoma de ovário em qualquer idade ou câncer de mama ≤ 50 anos ou dois familiares com câncer de mama, pâncreas ou próstata (escore de Gleason ≥ 7 ou metastático) em qualquer idade.
- História pessoal de câncer de próstata metastático (com evidência radiológica ou biópsia).
- História pessoal de câncer de pâncreas em qualquer idade e ≥ 1 familiar próximo com carcinoma de ovário em qualquer idade ou câncer de mama ≤ 50 , ou dois familiares com câncer de mama, pâncreas ou próstata (escore de Gleason ≥ 7 ou metastático) em qualquer idade.
- História pessoal de câncer de pâncreas e ancestralidade Judaica Ashkenazi.
- Mutação somática patogênica em *BRCA1* ou *BRCA2* (análise do tumor), na ausência de análise da linhagem germinativa.
- Apenas história familiar, e um dos critérios abaixo:
 - Familiar de primeiro ou segundo grau preenchendo algum dos critérios acima;
 - Familiar de terceiro grau diagnosticado com câncer de mama e/ou carcinoma de ovário, e que tenha ≥ 2 familiares próximos com câncer de mama (sendo ao menos um diagnosticado 50 anos) e/ou carcinoma de ovário.

Os conjuntos de critérios propostos por outras instituições, como aqueles publicados pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica (American Society of Clinical Oncology, ASCO) (ASCO, 1996; Lu et al., 2014), pela Sociedade Americana de Cirurgiões de Mama (American Society of Breast Surgeons, ASBS) (ASBS, 2012), e pelo Instituto de Pesquisa em Câncer do Reino Unido (The Institute of Cancer Research, ICR/NHS Foundation Trust) (ICR, 2015), também são amplamente aceitos e utilizados. De fato, a decisão sobre qual conjunto de critérios deve ser utilizado é uma decisão do médico geneticista e/ou da Instituição responsável pelo atendimento ao paciente. A Sociedade Européia de Oncologia Médica considera que os critérios clínicos amplamente aceitos para indicar o teste genético incluem famílias com a) três ou mais casos de câncer de mama e/ou ovário, sendo ao menos um caso diagnosticado antes dos 50 anos; b) dois casos de câncer de mama antes dos 40 anos; c) câncer de mama masculino; d) câncer de ovário; e) câncer de mama em idade jovem; f) ascendência Ashkenazi e diagnóstico de câncer de mama antes dos 60 anos; g) câncer de mama bilateral em idade jovem; ou h) câncer de mama e ovário na mesma paciente (Balmaña et al., 2011).

No Brasil, o Sistema Único de Saúde (SUS) não disponibiliza a testagem genética de *BRCA1* e *BRCA2* em sua lista de procedimentos e, portanto, não há uma definição de critérios de testagem. No âmbito da saúde suplementar, a Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS) determina que a realização de testes genéticos para mutações germinativas em *BRCA* seja de cobertura obrigatória pelos planos de saúde, respeitando os critérios específicos, que foram estabelecidos com contribuição da Sociedade Brasileira de Genética Médica a partir de pequenas modificações dos critérios propostos pela NCCN (ANS, 2016). Os critérios vigentes da ANS em 2017 são mostrados no Quadro 2.

Quadro 2. Critérios de testagem de *BRCA1* e *BRCA2*, de acordo com as diretrizes da ANS, versão 2016.

- Cobertura obrigatória para mulheres com diagnóstico atual ou prévio de câncer de mama quando preenchido pelo menos um dos seguintes critérios:
 - Diagnóstico de câncer de mama em idade ≤ 35 anos;
 - Diagnóstico de câncer de mama em idade ≤ 50 anos e mais um dos seguintes critérios:
 - Um segundo tumor primário da mama;
 - ≥ 1 familiar com câncer de mama e/ou ovário;
 - Diagnóstico de câncer de mama em idade ≤ 60 anos se câncer de mama triplo negativo;
 - Diagnóstico de câncer de mama em qualquer idade e mais um dos seguintes:
 - ≥ 1 familiar com câncer de mama feminino em idade ≤ 50 anos;
 - ≥ 1 familiar com câncer de mama masculino em qualquer idade;
 - ≥ 1 familiar com câncer de ovário em qualquer idade;
 - ≥ 2 familiares do mesmo lado da família com câncer de mama em qualquer idade;
 - ≥ 2 familiares do mesmo lado da família com câncer de pâncreas ou próstata (escore de Gleason > 7) em qualquer idade.
- Cobertura obrigatória para mulheres com diagnóstico atual ou prévio de câncer de ovário (tumor epitelial) em qualquer idade e independente da história familiar.
- Cobertura obrigatória para homens com diagnóstico atual ou prévio de câncer de mama em qualquer idade e independente da história familiar.
- Cobertura obrigatória para pacientes com câncer de pâncreas e ≥ 2 familiares do mesmo lado da família com câncer de mama e/ou ovário e/ou pâncreas ou próstata (escore de Gleason ≥ 7) em qualquer idade.
- Cobertura obrigatória para pacientes com câncer de próstata (escore de Gleason ≥ 7) e ≥ 2 familiares do mesmo lado da família com câncer de mama e/ou ovário e/ou pâncreas ou próstata (escore de Gleason ≥ 7) em qualquer idade.
- Cobertura obrigatória para teste das 3 mutações fundadoras Ashkenazi nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes de origem judaica Ashkenazi quando preenchido pelo menos um dos seguintes critérios:
 - Câncer de mama em qualquer idade e independente da história familiar;
 - Câncer de ovário em qualquer idade e independente da história familiar;
 - Câncer de pâncreas em qualquer idade com ≥ 1 familiar com câncer de mama, ovário, pâncreas ou próstata (escore Gleason ≥ 7).
- Cobertura obrigatória para pacientes maiores de 18 anos, diagnosticados ou não com câncer, independente do sexo, quando houver mutação deletéria em *BRCA1* ou *BRCA2* em familiar de 1º, 2º e 3º graus.
- Cobertura obrigatória para indivíduos com câncer de mama, mas com estrutura familiar limitada ausência de 2 familiares do sexo feminino em uma das linhagens – materna ou paterna - que tenha vivido além dos 45 anos de idade).

Além dos critérios clínicos, é possível utilizar algoritmos que estimam a probabilidade de portar uma mutação nos genes *BRCA*, a partir da história familiar e pessoal de câncer de um determinado indivíduo. Em geral, estes algoritmos consideram, em cada família, o número de indivíduos afetados por câncer de mama ou ovário (podendo ainda considerar a história familiar de outros tumores, como câncer de próstata, pâncreas e câncer de mama masculino), e as idades ao diagnóstico. Estima-se, por exemplo, que probandos diagnosticados com câncer de mama aos 36 anos e sem história familiar de câncer ovário e/ou câncer de mama masculino tenham uma probabilidade de portar uma mutação em *BRCA* de 10,1%, enquanto em famílias com dois ou mais casos de câncer ovário a probabilidade mutacional pode chegar a 45% (Meindl *et al.*, 2011).

Os modelos mais utilizados atualmente são o Penn II (PennII, 2017), desenvolvido pela Universidade da Pensilvânia (EUA), o BRCAPro, criado pela Universidade de Harvard (EUA), o Manchester Score (Evans *et al.*, 2004) e o BOADICEA, que além de estimar a probabilidade de portar uma mutação em um dos genes *BRCA* calcula também os riscos de desenvolvimento de câncer de mama e ovário, baseado na história familiar reportada (Lee *et al.*, 2014). As tabelas publicadas pelo laboratório Myriad também podem auxiliar a estimar a prevalência de mutações nos genes *BRCA*, de acordo com a história pessoal ou familiar de câncer (Frank *et al.*, 2002). A probabilidade mínima para indicar o teste genético para identificação de mutações nos genes *BRCA* varia entre diferentes instituições e países, e enquanto alguns consideram que indivíduos com probabilidade de mutação igual ou superior a 10% devem ser testados (ASCO, 1996; Meindl *et al.*, 2011), outros recomendam a testagem apenas para indivíduos com ao menos 20% de probabilidade mutacional (NICE, 2013). Apesar de gerar um custo mais elevado, a adoção de critérios menos específicos (como probabilidade mutacional de 10%, e não 20%, de acordo com algoritmos de predição) pode possibilitar a detecção de mutações em indivíduos sem história familiar da doença, ou com uma história familiar limitada. Além disso, embora existam diversos conjuntos de critérios clínicos disponíveis, idealmente os critérios de testagem devem ser elaborados considerando as características locais de cada população, como por exemplo a prevalência de mutações. De fato,

a sensibilidade dos critérios de testagem mais amplamente utilizados varia de 45 a 90%, revelando que uma parcela importante dos portadores de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* não preenchem os critérios utilizados hoje na prática clínica (Grindedal *et al.*, 2017). Assim, é necessário que cada país/região avalie a acurácia dos critérios utilizados para possibilitar uma otimização do rastreamento.

Além das recomendações sobre critérios clínicos de testagem, as instituições também publicam diretrizes para o manejo clínico destes pacientes. Mais uma vez, as diretrizes mais aceitas e aplicadas são aquelas propostas pela NCCN, que propõem estratégias específicas de rastreamento e medidas para redução do risco de desenvolvimento da doença em portadores de mutações nos genes *BRCA*. O protocolo recomenda salpingo-ooforectomia redutora de risco (SORR) entre os 35-40 ou 40-45 anos para mulheres portadoras de mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente, ou após ter completado sua história reprodutiva (NCCN, 2017). A eficácia da redução de risco de câncer de ovário promovida pela SORR, que pode chegar a 80%, foi demonstrada em diversos estudos (Domchek *et al.*, 2006; Finch *et al.*, 2006; Kauff *et al.*, 2002; Rebbeck *et al.*, 2009; Rebbeck *et al.*, 2002). Além de reduzir o risco para câncer de ovário, a SORR também parece estar associada a uma redução no risco de câncer mama, pelo menos em portadoras de alguns tipos de mutação, além de reduzir a mortalidade por câncer de mama e câncer de ovário (Domchek *et al.*, 2006; Domchek *et al.*, 2010). As mulheres que optarem por não realizar SORR podem ser acompanhadas com ecografia transvaginal combinada com aferição de CA-125, a partir dos 30-35 anos, embora não exista evidência de eficácia destas medidas de rastreamento (NCCN, 2017).

Assumindo uma posição mais conservadora, a NCCN não recomenda mastectomia redutora de risco, embora sugira que seus riscos e benefícios devam ser discutidos com cada paciente (NCCN, 2017), e esta decisão deve-se a inexistência de evidências contundentes acerca da eficácia desta intervenção em reduzir mortalidade. Por outro lado, a Sociedade de Cirurgia Oncológica (nos EUA) e o Instituto Nacional de Saúde e Cuidados de Excelência (no Reino Unido), recomendam o procedimento para mulheres com alto risco de desenvolver câncer de mama (Giuliano *et al.*, 2007; NICE, 2013). De fato, diversos estudos tem

demonstrado que a mastectomia bilateral redutora de risco leva à uma redução superior a 90% no risco de câncer de mama em mulheres portadoras de mutações germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2*, quando comparadas à portadoras que não realizaram a cirurgia (Domchek *et al.*, 2010; Meijers-Heijboer *et al.*, 2001; Rebbeck *et al.*, 2004).

As estratégias não-cirúrgicas disponíveis para manejo de portadoras de mutações em *BRCA* visam identificar a doença em um estágio inicial e ainda curável (Roukos & Briasoulis, 2007), e incluem, resumidamente: autoexame das mamas a partir dos 18 anos; exames clínicos das mamas a cada 6-12 meses, a partir dos 25 anos; ressonância magnética (RNM) com contraste, anualmente, entre os 25-29 anos (ou mamografia, preferencialmente com tomossíntese, se a RNM não estiver disponível); RNM com contraste e mamografia (preferencialmente com tomossíntese) anualmente entre os 30 e o 75 anos. A partir desta idade, o manejo das portadoras deve ser individualizado (NCCN, 2017).

A quimioprevenção através do uso de moduladores seletivos de receptores de estrogênio (RE), como o tamoxifeno, tem mostrado resultados positivos na redução do risco de desenvolvimento de tumores invasivos da mama, em mulheres pós-menopáusicas com alto risco para desenvolvimento de câncer de mama (Cummings *et al.*, 1999; Cuzick *et al.*, 2013; Lippman *et al.*, 2006; Vogel *et al.*, 2010). Entre mulheres com mutações em *BRCA*, no entanto, os dados são limitados, e não há uma indicação formal da NCCN, por exemplo, para esta abordagem terapêutica. Estudos caso-controle com tamanho amostral modesto mostraram que o uso de tamoxifeno tem um efeito protetor contra o desenvolvimento de câncer de mama contralateral com um *odds-ratio* (OR) de 0,38 (intervalo de confiança 95% IC 95% 0,19-0,74) a 0,50 (IC 95% 0,30-0,85) em portadoras de mutação de mutações em *BRCA1*, e 0,42 (IC 95% 0,17–1,02) a 0,63 (IC 95% 0,20 – 1,50) em portadoras de mutações em *BRCA2* (Gronwald *et al.*, 2006; Narod *et al.*, 2000).

Sendo supressores de tumor, a perda do alelo selvagem dos genes *BRCA* é um evento crucial para o desenvolvimento de tumores em portadores de mutações germinativas nestes genes, e este evento ocorre na maioria dos

tumores de mama e ovário que acometem estes pacientes (Maxwell *et al.*, 2017). Como consequência da função primordial dos genes *BRCA* no reparo de quebras de fita dupla e de forquilhas de replicação em colapso por recombinação homóloga, células com perda bi-alélica destes genes não são competentes nesta via (Prakash *et al.*, 2015). Estudos *in vitro* publicados em 2005 mostraram que este defeito pode ser explorado através do conceito de letalidade sintética, que é um fenômeno biológico onde a inibição simultânea de duas vias (ou genes) leva à morte celular, enquanto a inibição de apenas uma delas não causa este efeito (Lord & Ashworth, 2017). Mais especificamente, estes estudos demonstraram que células deficientes nos genes *BRCA* são incapazes de reparar quebras de fitas duplas e forquilhas de replicação em colapso e, portanto, são sensíveis ao tratamento com inibidores de enzimas da família PARP (Bryant *et al.*, 2005; Farmer *et al.*, 2005). Essas enzimas são responsáveis pelo reparo de quebras de fita simples, e sua inibição leva a um acúmulo destes defeitos e ao colapso de forquilhas de replicação, que por fim resultarão em quebras de fita dupla. Como células com perda bi-alélica de *BRCA* são incapazes de reparar tais quebras bifilamentares, o tratamento com inibidores de PARP leva a um acúmulo de danos incompatíveis com a viabilidade celular. De fato, drogas explorando este conceito se mostraram eficientes em pacientes com mutações germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2*, especialmente no tratamento de tumores de ovário (Fong *et al.*, 2009).

Em 2014, o inibidor de PARP olaparib foi aprovado nos Estados Unidos e na Europa para o tratamento de tumores de ovário (com indicações diferentes nos EUA e Europa), em pacientes portadores de mutações em *BRCA1* ou *BRCA2* (EMA, 2014; Kim *et al.*, 2015). No Brasil, esta droga foi aprovada no início de 2017, especificamente para o tratamento de manutenção de pacientes com carcinoma de ovário seroso de alto grau recidivado e sensível a tratamentos com platina, incluindo carcinomas das trompas uterinas e de peritônio (ANVISA, 2017). Além disso, um estudo clínico recente mostrou que este tratamento também é eficaz em um subgrupo de pacientes com câncer de mama metastático (Robson *et al.*, 2017). Finalmente, é importante notar que diversos estudos tem demonstrado que a perda de função de outros genes da via de reparo por recombinação homóloga (além de *BRCA1* e *BRCA2*) levam à deficiência desta

via, de forma que estes tumores são potenciais candidatos aos tratamentos com inibidores de PARP (Mutter *et al.*, 2017; Riaz *et al.*, 2017).

1.2.1.2 O papel *BRCA1* e *BRCA2*

Embora a suspeita da existência de uma síndrome de predisposição hereditária em famílias com diversos casos de câncer de mama fosse uma ideia antiga, a identificação dos genes envolvidos na síndrome é um evento recente. Somente na década de 1990, estudos de ligação envolvendo dezenas de famílias com múltiplos casos de câncer de mama em idade jovem (< 50 anos) levaram à identificação dos dois principais genes responsáveis pelo fenótipo HBOC: *BRCA1* e *BRCA2* (Miki *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1995).

BRCA1 é um gene supressor de tumor localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21), contém 23 éxons mas apenas 22 são codificantes. O alelo selvagem produz um RNA mensageiro de 7,8 kb, que codifica a proteína *breast cancer type 1 susceptibility protein* (BRCA1). A proteína BRCA1 é composta de 1.863 aminoácidos, organizados em diferentes domínios protéicos: um *RING-finger* próximo à cadeia amino-terminal e com atividade E3 ubiquitina ligase, dois domínios de localização nuclear no éxon 11, um domínio *coiled coil* onde se liga PALB2, e o domínio BRCT na porção C-terminal (Narod & Foulkes, 2004; Roy *et al.*, 2012). Através de seus vários domínios, BRCA1 interage com proteínas supressoras de tumor, proteínas de reparo de dano ao DNA e proteínas reguladoras do ciclo celular. Estas interações são fundamentais para sua participação em várias vias de reparo ao DNA, como a recombinação homóloga (HR, do inglês, *homologous recombination*), a junção de extremidades não homólogas (NHEJ, do inglês, *non-homologous end-joining*) e a via de anelamento de fita simples (SSA, do inglês, *single-strand annealing*) (Roy *et al.*, 2012). Além do prejuízo às vias de reparo, as células com perda de função de BRCA1 apresentam defeitos de transcrição, duplicação anormal do centrôssomo, defeitos de pontos de checagem de ciclo celular (G2/M), entre outros (Murphy & Moynahan, 2010).

O gene *BRCA2* está localizado no braço longo do cromossomo 13 (13q12.3), e foi relacionado ao câncer de mama em 1995 (Wooster *et al.*, 1995). O gene contém 27 éxons, sendo 26 codificantes. O alelo selvagem produz um RNA mensageiro de 10,4 kb que codifica uma proteína de 3.418 aminoácidos, a *breast cancer type 2 susceptibility protein* (BRCA2) (Tavtigian *et al.*, 1996; Wooster & Weber, 2003). BRCA2 é uma proteína supressora de tumor, mas ao contrário de BRCA1, que exerce múltiplas funções, o principal papel de BRCA2 é na recombinação homóloga. BRCA2 media o recrutamento da recombinase RAD51 às quebras de fita dupla, uma etapa fundamental da recombinação homóloga onde o pareamento com a cromátide irmã permite que esta seja usada como um molde no reparo da fita danificada, assegurando a fidelidade do reparo (Nielsen *et al.*, 2016). BRCA2 e BRCA1 interagem indiretamente através de sua ligação com PALB2. A interação BRCA1-PALB2 é fundamental para o recrutamento de BRCA2 e RAD51 ao sítio danificado, sendo assim essencial para o reparo de dano ao DNA por recombinação homóloga e para o reparo de quebras bifilamentares (Murphy & Moynahan, 2010). A Figura 1 mostra os domínios funcionais de BRCA1 e BRCA2, ilustrando os sítios de interação com diversas proteínas parceiras.

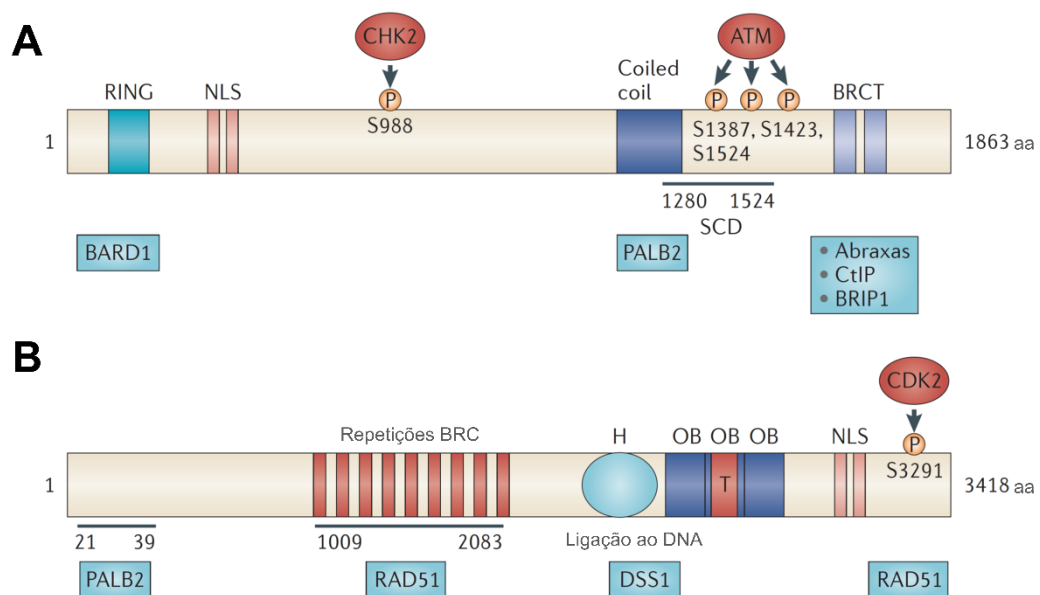


Figura 1. Domínios funcionais de BRCA1 e BRCA2. A) A região amino-terminal de BRCA1 contém um domínio RING, que interage com BARD1, e um domínio de

localização nuclear (NLS). A região central da proteína contém um sítio de fosforilação de CHK2, enquanto a região carboxi-terminal contém um domínio *coiled-coil* (que se associa a PALB2), sítios de fosforilação de ATM, e um domínio BRCT, que interagem com diversas proteínas, como BRIP1, o complexo CtBP e Abraxas. B) A região amino-terminal de BRCA2 se liga à PALB2, enquanto oito domínios BRC são o sítio de ligação à RAD51. O domínio de ligação ao DNA contém três domínios OB (*oligonucleotide binding*) e um domínio *tower* (T). A região carboxi-terminal contém um domínio NLS, e um sítio de fosforilação, que também se liga a RAD51 (Adaptado de (Roy *et al.*, 2012)).

Mutações germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* são os principais fatores de risco genético para o desenvolvimento de câncer de mama e ovário. O risco cumulativo vital de câncer de mama para mulheres portadoras de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* é de 57-65% e 45-55%, respectivamente, até os 70 anos de idade, e 72% e 69% até os 80 anos. Além disso, o risco de desenvolvimento de câncer de mama contralateral até 20 anos depois do primeiro diagnóstico é de 40% e 26%, para mulheres portadoras de mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente. Para portadoras de mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, o risco de câncer de ovário até os 70 anos é de 39-59% e 11-18%, respectivamente (Antoniou *et al.*, 2003; Chen & Parmigiani, 2007; Kuchenbaecker *et al.*, 2017; Mavaddat *et al.*, 2013). Além disso, o risco para câncer de mama e ovário parece estar associado à localização da mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, uma vez que mutações em regiões específicas dos genes conferem um risco maior para o desenvolvimento destes tumores (Kuchenbaecker *et al.*, 2017; Rebbeck *et al.*, 2015).

O risco cumulativo de câncer de mama também é impactado significativamente pela história familiar, uma vez que mulheres com dois ou mais familiares (de primeiro ou segundo grau) diagnosticados com câncer de mama apresentam um maior risco cumulativo até os 70 anos, quando comparadas a mulheres sem história familiar da doença. Para portadoras de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* com história familiar de câncer de mama o risco cumulativo é 73% e 65%, respectivamente, enquanto o risco de portadoras sem história familiar é de 53% e 39%, respectivamente. Por outro lado, o risco de câncer de ovário não

parece ser impactado pela história familiar da doença (Kuchenbaecker *et al.*, 2017).

Portadores de mutações em *BRCA1* ou *BRCA2* apresentam ainda um risco maior para o desenvolvimento de outros tumores, como de próstata, pâncreas e melanoma (Levy-Lahad & Friedman, 2007; Mersch *et al.*, 2015; Moran *et al.*, 2012; van Asperen *et al.*, 2005). Além disso, mutações germinativas em *BRCA2* contribuem significativamente para um aumento no risco de desenvolvimento de tumores de mama em homens, de até 8% ao longo da vida. Embora estes tumores correspondam a menos de 1% dos casos de câncer de mama, uma proporção significativa dos casos de câncer de mama masculino surge em um contexto de história familiar de câncer de mama e ovário (Lynch *et al.*, 1999). Mutações em *BRCA1* também estão relacionadas ao câncer de mama masculino, embora em um menor número de casos (Tai *et al.*, 2007).

Mutações em *BRCA1* e *BRCA2* são identificadas em aproximadamente 20% das famílias com critérios clínicos HBOC (Frank *et al.*, 2002; Kast *et al.*, 2016), de forma que aproximadamente 80% das famílias com suspeita da síndrome ou tem mutações em outros genes ou permanece sem um diagnóstico molecular. A maior parte das mutações encontradas nestes genes são pequenas deleções e inserções, mutações sem sentido e em sítios de *splicing*. A frequência das mutações pode variar entre populações, de acordo com critérios utilizados na seleção dos indivíduos para testagem, e também como resultado de mutações fundadoras. Na população de Judeus Ashkenazi, por exemplo, três mutações (*BRCA1* c.68_69delAG e c.5266dupC; *BRCA2* c.5946delT) correspondem à aproximadamente 80% das mutações identificadas nestes genes (Frank *et al.*, 2002). Quando em homozigose, mutações germinativas em *BRCA2* causam anemia de Fanconi, uma síndrome de instabilidade cromossômica que, entre outros sintomas, predispõe ao desenvolvimento de diversos tumores ao longo da vida (Howlett *et al.*, 2002). Mutações bi-alélicas em *BRCA1* são frequentemente embrionárias letais, já que ao menos um alelo selvagem de *BRCA1* parece ser necessário durante a embriogênese. No entanto, recentemente dois relatos de caso revelaram pacientes com mutações em homozigose, apresentando fenótipos

graves, semelhantes à anemia de Fanconi (Domchek *et al.*, 2013; Sawyer *et al.*, 2015).

No Brasil, poucos estudos avaliaram mutações em *BRCA1* e *BRCA2* (Carraro *et al.*, 2013; Dillenburg *et al.*, 2012; Dufloth *et al.*, 2005; Esteves *et al.*, 2009; Ewald *et al.*, 2011; Felix *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2007; Lourenço *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2014), e um número ainda menor de estudos realizou sequenciamento completo destes genes (Carraro *et al.*, 2013; Felix *et al.*, 2014; Fernandes *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2014), de modo que o perfil de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes brasileiros permanece pouco conhecido.

1.2.1.3 A contribuição de outros genes

Além de *BRCA1* e *BRCA2*, diversos outros genes tem sido associados à predisposição hereditária ao câncer de mama e/ou ovário, sendo classificados como genes de risco alto (mais do que 4 vezes o risco da população geral) ou intermediário (2 a 4 vezes o risco da população geral). Entre os mais importantes estão os genes *ATM*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *NBN*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD51C* e *RAD51D*, *STK11* e *TP53* (Apostolou & Fostira, 2013). Alguns destes genes são associados a síndromes específicas, como Li-Fraumeni (*TP53*), Cowden (*PTEN*), anemia de Fanconi (*PALB2* e *BRIP1*) e Peutz-Jeughers (*STK11*), e até recentemente eram testados de maneira individual, mas pouco incorporados à prática clínica (Lindor *et al.*, 2008; Mavaddat *et al.*, 2010). Nos últimos anos, o avanço no desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento e a implementação do sequenciamento de nova geração na rotina laboratorial possibilitou a análise simultânea de diversos genes, permitindo que diferentes genes com relevância clínica possam ser testados simultaneamente, a um custo razoável (Tucker *et al.*, 2009).

Estudos recentes, que investigam a contribuição destes outros genes (além de *BRCA1* e *BRCA2*) no fenótipo das famílias com critérios clínicos HBOC, revelam que embora raras individualmente, coletivamente as alterações em genes de penetrância alta e moderada correspondem a 25-50% de todas as mutações

identificadas nestas famílias (Buys *et al.*, 2017; Eliade *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2016; Rummel *et al.*, 2017; Walsh *et al.*, 2011). Em um dos primeiros estudos utilizando sequenciamento de painéis multigênicos, Walsh e colaboradores identificaram mutações patogênicas em 10 outros genes, além de *BRCA1* e *BRCA2*, entre 360 indivíduos com câncer de ovário (incluindo também carcinomas de trompas uterinas e peritoneais), correspondendo a uma prevalência mutacional de 6,1% (Walsh *et al.*, 2011). Utilizando uma abordagem semelhante em uma coorte de 708 pacientes com critérios clínicos para HBOC, Castéra e colaboradores identificaram 69 mutações germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* (9,7%), além de 36 mutações em outros genes de risco alto e moderado (6,4%), sendo o maior percentual de mutações (depois de *BRCA1* e *BRCA2*) encontrado em *PALB2* (1%), *TP53* (0,8%), *ATM* (0,7%) e *CHEK2* (0,7%) (Castéra *et al.*, 2014). Outros dois estudos reportaram uma prevalência de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* de 9%, enquanto outros genes respondiam por uma parcela menor, embora significativa, dos casos investigados (Lincoln *et al.*, 2015; Schroeder *et al.*, 2015). Mais recentemente, um estudo envolvendo mais de 35 mil mulheres diagnosticadas com câncer de mama, das quais 93,2% preenchiam critérios HBOC-NCCN, encontrou uma prevalência mutacional de 9,3%, considerando as variantes patogênicas encontradas em todos os genes de um painel de 25 genes. Ao todo, 51,5% das variantes patogênicas identificadas estavam em genes que não *BRCA1* e *BRCA2* (Buys *et al.*, 2017). A Figura 2 mostra a distribuição das mutações identificadas neste estudo. Assim como em outros estudos, os genes mais frequentemente mutados são, além de *BRCA1* e *BRCA2*, *ATM*, *CHEK2* e *PALB2* (Buys *et al.*, 2017; Lincoln *et al.*, 2015; Schroeder *et al.*, 2015).

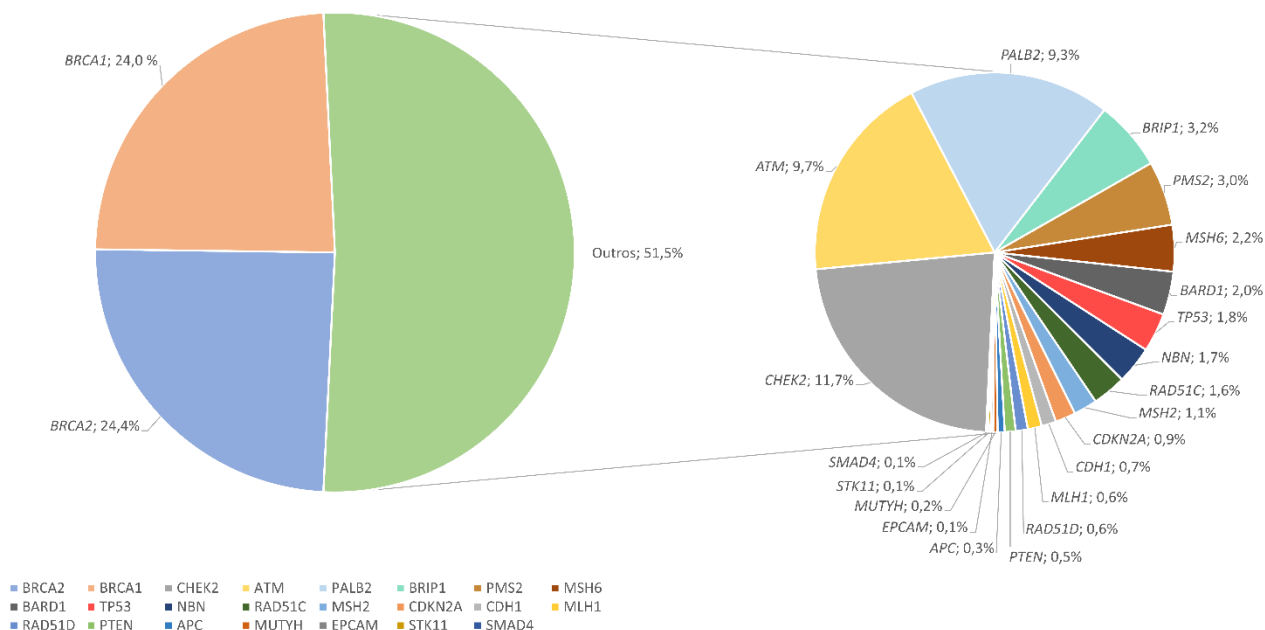


Figura 2. Contribuição de genes de predisposição ao câncer em um grupo de 35.409 mulheres diagnosticadas com câncer de mama, testadas com um painel de 25 genes (Baseado nos dados de Buys *et al.*, 2017).

1.2.1.4 A importância e as limitações dos painéis multigênicos

O uso de painéis multigênicos na prática clínica tem inúmeros benefícios, sendo particularmente interessante no contexto da síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário, uma vez que esta é uma condição que pode ser causada por múltiplos genes (Easton *et al.*, 2015). A identificação de mutações nestes genes, por sua vez, pode levar a uma modificação na conduta clínica, com recomendações específicas de rastreamento e prevenção (NCCN, 2017), reforçando a importância de um teste genético mais amplo, e não limitado apenas a *BRCA1* e *BRCA2*. De fato, diversos estudos envolvendo pacientes sem alterações em *BRCA1* e *BRCA2* demonstram que a prevalência de variantes patogênicas em outros genes varia entre 3 a 16% (Castéra *et al.*, 2014; Crawford *et al.*, 2017; SY *et al.*, 2016; Thompson *et al.*, 2016). Além disso, não raramente uma família preenche critérios clínicos de mais de uma síndrome de

predisposição ao câncer, e requer uma análise extensiva de seu perfil genético para definir o manejo adequado. O uso de painéis pode, ainda, revelar a presença de uma síndrome para a qual sequer havia uma suspeita (Hall *et al.*, 2014).

Por outro lado, a adoção do sequenciamento de painéis multigênicos apresenta limitações, e gera preocupações relevantes. Os avanços na tecnologia de sequenciamento tem permitido que os laboratórios comerciais incluam um número cada vez maior de genes em seus painéis sem que isso represente um impacto muito expressivo no preço do produto. No entanto, não há diretrizes de manejo para muitos dos genes atualmente incluídos nos painéis (Easton *et al.*, 2015). Em face da disponibilidade de testes mais amplos a um custo acessível, diversos estudos apontam para uma preferência dos médicos pela requisição de painéis maiores (Mauer *et al.*, 2014; O'Leary *et al.*, 2017). Embora esteja claro que o sequenciamento de painéis multigênicos resulta em um aumento da taxa de identificação de mutações patogênicas, a identificação de mutações em genes para os quais não há diretrizes de manejo específicas (especialmente genes de baixa e moderada penetrância) gera incertezas no paciente, e pode induzir a um erro de manejo, especialmente se o médico responsável não estiver familiarizado com genética médica (Hall *et al.*, 2014).

Por fim, a utilização de painéis maiores resulta em um número maior de variantes de significado incerto (VUS, do inglês *variants of uncertain significance*). As VUS são variantes cuja patogenicidade é desconhecida, devido à ausência de informações genéticas e clínicas suficientes para determinar sua associação causal com a doença. A maior parte das VUS são pequenas inserções e deleções que não alteram o quadro de leitura (*in-frame*), variantes de sentido trocado (missense) ou silenciosas, ou ainda alterações em íntrons e regiões regulatórias (Carvalho *et al.*, 2007; Millot *et al.*, 2012). Estima-se que VUS sejam identificadas em 15% dos testes de *BRCA1* e *BRCA2* (Radice *et al.*, 2011). As VUS são ainda mais comuns em populações não-caucasianas, com frequências tão altas quanto 46% em afro-americanos (nos Estados Unidos) (Nanda *et al.*, 2005) e 22% entre a população hispânica (Weitzel *et al.*, 2005). O sequenciamento de painéis multigênicos aumenta significativamente a probabilidade de identificação de uma VUS em outros genes além de *BRCA1* e *BRCA2*, em parte porque grande parte

dos genes incluídos nos painéis ainda não foi bem caracterizada. Em 2015, Lincoln e colaboradores mostraram que, entre 1.062 pacientes que realizaram sequenciamento de um painel de 29 genes, 41% apresentaram uma VUS em pelo menos um dos genes do painel, sendo que 11,4% tinham duas ou mais VUS (Lincoln *et al.*, 2015). Este e outros trabalhos mostraram ainda que a frequência das VUS é proporcional ao tamanho do painel sequenciado, o que representa uma desvantagem importante dos painéis multigênicos (Lincoln *et al.*, 2015; O'Leary *et al.*, 2017). A identificação de uma VUS é um problema significativo tanto para o médico quanto para o paciente, uma vez que não há uma conduta de vigilância ou profilaxia bem estabelecida para portadores deste tipo de variante.

1.2.2 Síndrome de Li-Fraumeni

1.2.2.1 Caracterização clínica e o papel de *TP53*

Entre as síndromes de predisposição hereditária ao câncer que incluem alto risco para câncer de mama, a síndrome de Li-Fraumeni (SLF) se destaca por sua agressividade e pela ocorrência de tumores em idade muito jovem (Kamihara *et al.*, 2014). A SLF foi descrita em 1969 por Li e Fraumeni, que observaram quatro famílias com alta incidência de sarcoma de tecidos moles em crianças (Li & Fraumeni, 1969). A SLF possui um padrão de herança autossômico dominante e tem manifestações clínicas bastante heterogêneas. Preenchem os critérios da definição clássica da síndrome as famílias com um indivíduo diagnosticado com sarcoma antes dos 45 anos, que possua ao menos um familiar de primeiro grau com um tumor de qualquer tipo e diagnosticado antes dos 45 anos, além de um terceiro familiar (de primeiro ou segundo grau) diagnosticado com um tumor antes dos 45 anos, ou um sarcoma em qualquer idade (Li *et al.*, 1988). Alguns anos após definição destes critérios, estudos adicionais mostraram que eles eram muito restritos e excluía um grande número de famílias com características muito sugestivas de SLF. O processo de atualização dos critérios da SLF levou à proposição de diversos conjuntos de critérios clínicos, como os critérios de Birch (Birch *et al.*, 1994), Eeles (Eeles, 1995) e Chompret (Tinat *et al.*, 2009), sendo

este último amplamente aceito e utilizado na prática clínica atualmente. Os critérios de Chompret definem um fenótipo chamado síndrome de Li-Fraumeni-Like (LFL), que é caracterizado, de um modo geral, por conjunto de critérios menos estritos.

Em ambas as síndromes (SLF e LFL) os indivíduos apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de um amplo espectro de tumores, sendo sarcomas de tecidos moles, osteossarcomas, câncer de mama pré-menopausa, tumores de sistema nervoso central e carcinomas adrenocorticais os tumores mais frequentes (Malkin, 2011). Em um elegante trabalho publicado recentemente, Amadou e colaboradores demonstraram a existência de padrões temporais no acometimento de tumores relacionados à síndrome. A primeira fase (0 a 15 anos) é caracterizada por quatro tipos tumorais (carcinoma adrenocortical, carcinoma de plexo coroide, rabdomiossarcoma e meduloblastoma), que juntos correspondem a 22% de todos os tumores. Na fase seguinte, entre os 16 e os 50 anos, são diagnosticados 51% de todos os tumores relacionados à síndrome, sendo o câncer de mama o tumor mais prevalente, diagnosticado em 26,4% dos casos. Osteossarcomas, leucemias, astrocitomas, glioblastomas, câncer colorretal e de pulmão, além de diferentes subtipos de sarcomas também são característicos desta fase. A fase mais tardia, após os 51 anos, apresenta um amplo espectro tumoral, embora tumores de próstata e pâncreas sejam os mais frequentes (Amadou *et al.*, 2017).

Em 1990, mutações germinativas no gene *TP53* foram descritas como causa da SLF/LFL (Malkin *et al.*, 1990). Enquanto 70% dos pacientes com critérios clássicos da SLF portam mutações patogênicas neste gene, tais mutações são identificadas em apenas 29 a 35% dos pacientes com LFL (Varley, 2003). Portadores de uma mutação germinativa em *TP53* apresentam, em média, 50% de chance de desenvolver câncer antes dos 40 anos de idade, comparado com 1% da população geral. Além disso, estima-se que 90% dos portadores de mutação serão diagnosticados com câncer até os 60 anos de idade (Birch *et al.*, 1998; Strong *et al.*, 1992). A penetrância total varia de acordo com o sexo, e também de acordo com o tipo de mutação (Amadou *et al.*, 2017). *TP53* está localizado no cromossomo 17 (17p13.1) e é um gene supressor tumoral

conhecido como “O Guardiã do Genoma” devido ao seu papel fundamental em diversos processos celulares. Classicamente, a proteína p53, que é produto do gene *TP53*, é ativada em situações de estresse celular, e está envolvida no controle de diversos processos celulares tais como replicação e reparo ao DNA, parada no ciclo celular, apoptose, autofagia, senescência, diferenciação e metabolismo oxidativo (Bieging *et al.*, 2014; Sablina *et al.*, 2005; Zilfou & Lowe, 2009). Aproximadamente 70% das mutações germinativas em *TP53* são de sentido trocado, e aproximadamente 20% são mutações sem sentido ou em sítios de *splicing* (Amadou *et al.*, 2017).

Embora inicialmente tenham sido consideradas raras (1 a cada 5.000-10.000 indivíduos, correspondendo a 0,02 – 0,01% dos indivíduos) (Lalloo *et al.*, 2006), um estudo recente mostrou que alterações germinativas em *TP53* podem ser mais comuns do que se pensava. De Andrade e colaboradores avaliaram três bancos de dados populacionais, totalizando quase 64 mil indivíduos não relacionados e não selecionados pela história familiar de câncer, e encontraram uma prevalência de mutações patogênicas em *TP53* de 0,2% (de Andrade *et al.*, 2017). Esta frequência é bem próxima à frequência da mutação fundadora brasileira R337H (c.1010G>A; p.Arg337His), presente em aproximadamente 0,3% dos indivíduos do Sul e do Sudeste do país, levando a uma estimativa de aproximadamente 300.000 brasileiros com a síndrome (Custódio *et al.*, 2013). As mutações de *TP53* estão frequentemente localizadas na região correspondente ao domínio de ligação ao DNA, correspondendo aos éxons 5 ao 8 e chamadas de mutações “clássicas” (Lalloo *et al.*, 2003). A mutação fundadora R337H, por outro lado, está localizada no éxon 10, fora do domínio de ligação ao DNA e é considerada uma mutação parcialmente funcional (Ribeiro *et al.*, 2001; Wasserman *et al.*, 2015). De fato, análises de heredogramas revelam diferenças significativas entre portadores de mutações clássicas e portadores de R337H (Kratz *et al.*, 2017). Enquanto a penetrância estimada de câncer antes dos 30 anos é de 50% para os portadores de mutações clássicas, portadores de R337H apresentam uma penetrância reduzida, de 15-20% (Garritano *et al.*, 2010). Tendo sido inicialmente descrita como tecido-específica e relacionada apenas ao desenvolvimento de carcinoma adrenocortical (CAC) (Figueiredo *et al.*, 2006;

Ribeiro *et al.*, 2001), esta mutação foi posteriormente identificada em pacientes com outros tumores relacionados à síndrome, como carcinoma de plexo coroide e câncer de mama (Assumpção *et al.*, 2008; Custodio *et al.*, 2011; Gomes *et al.*, 2012; Latronico *et al.*, 2001; Seidinger *et al.*, 2011).

1.2.2.2 Mutações germinativas em *TP53* e câncer de mama

Mutações germinativas em *TP53* são uma das principais causas de predisposição hereditária ao câncer de mama em idade jovem. Estudos mostram que 5 a 8% das mulheres diagnosticadas com câncer de mama ≤ 35 anos e sem mutações em *BRCA1* e *BRCA2* tem uma mutação patogênica em *TP53*, e estes resultados são consistentes mesmo entre indivíduos não selecionados pela história familiar (Lalloo *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2012; Ruijs *et al.*, 2010; Tinat *et al.*, 2009). Enquanto em *BRCA1* e *BRCA2* mutações *de novo* raramente são reportadas, mutações germinativas *de novo* em *TP53* correspondem a 7-20% dos casos de pacientes com câncer de mama em idade jovem e portadoras de mutações neste gene. Esse achado ressalta a importância do teste de *TP53* em pacientes jovens diagnosticadas com câncer de mama, mesmo na ausência de história familiar de câncer (Gonzalez *et al.*, 2009).

Em famílias com a mutação germinativa R337H, tumores de mama representam 30,4% de todos os tumores descritos (Achatz *et al.*, 2007), e um estudo recente mostrou uma alta prevalência desta mutação (12,1%) em mulheres diagnosticadas com câncer de mama antes ou aos 45 anos de idade, e não selecionadas pela história familiar (Giacomazzi *et al.*, 2014). Entre mulheres diagnosticadas com câncer de mama e testadas através de painéis multigênicos, a prevalência de mutações germinativas em *TP53* é bastante baixa, não atingindo, na maior parte dos estudos, 1% dos casos. De fato, em um estudo envolvendo mais de 35 mil mulheres com câncer de mama unilateral onde 93% dos casos preenchem critérios HBOC (de acordo com os critérios NCCN), apenas 61 mutações em *TP53* foram identificadas (0,17%) (Buys *et al.*, 2017).

De acordo com os dados do *National Cancer Institute – Li-Fraumeni Syndrome Cohort*, em mulheres com mutações germinativas em *TP53* o risco de

câncer de mama aumenta significativamente após a segunda década de vida, e a penetrância de câncer de mama é de 85% até ao 60 anos (Mai *et al.*, 2016). Entre portadoras, a idade média de diagnóstico destes tumores é 33 anos (Amadou *et al.*, 2017). Por essas razões, os protocolos de manejo recomendam que a mastectomia redutora de risco seja discutida com portadoras de mutações em *TP53*. Além disso, a diretriz da NCCN recomenda ressonância magnética com contraste anual entre os 20-29 anos, e ressonância magnética e mamografia com consideração de tomossíntese entre os 30-75 anos. Além das medidas específicas para o manejo do risco de câncer de mama, existem outras recomendações relacionadas ao manejo do risco para o desenvolvimento de outros tumores (NCCN, 2017).

Assim como os carcinomas de mama invasivos, a maioria dos carcinomas ductais *in situ* de pacientes com mutações em *TP53* é positivo para a expressão de receptores de estrógeno, progesterona e superexpressão/amplificação de HER2 (Masciari *et al.*, 2012; Melhem-Bertrandt *et al.*, 2012). Curiosamente, um estudo recente mostrou que enquanto os tumores de mama de pacientes com mutações germinativas não-R337H superexpressam HER2 em 75% dos casos, apenas 22,7% dos tumores com a mutação R337H apresentavam a proteína superexpressa ($P < 0,001$) (Fitarelli-Kiehl *et al.*, 2015), revelando diferenças fenotípicas importantes entre os grupos.

1.2.2.3 O perfil somático dos tumores de pacientes Li-Fraumeni

Enquanto as alterações germinativas em *TP53* são raras, as alterações somáticas são muito frequentes e ocorrem em mais de 50% de todos os tumores invasivos. Sendo um supressor tumoral, a inativação de *TP53* é um evento comum na carcinogênese, chegando a mais de 90% dos casos em tumores de ovário, pulmão, útero e glioma (Kandoth *et al.*, 2013). Apesar de haver uma ampla caracterização genômica de tumores esporádicos, principalmente através da publicação dos resultados do consórcio *The Genome Cancer Atlas*, muito pouco

se sabe sobre o perfil mutacional somático de tumores hereditários, como os que acometem pacientes com mutações germinativas em *TP53*.

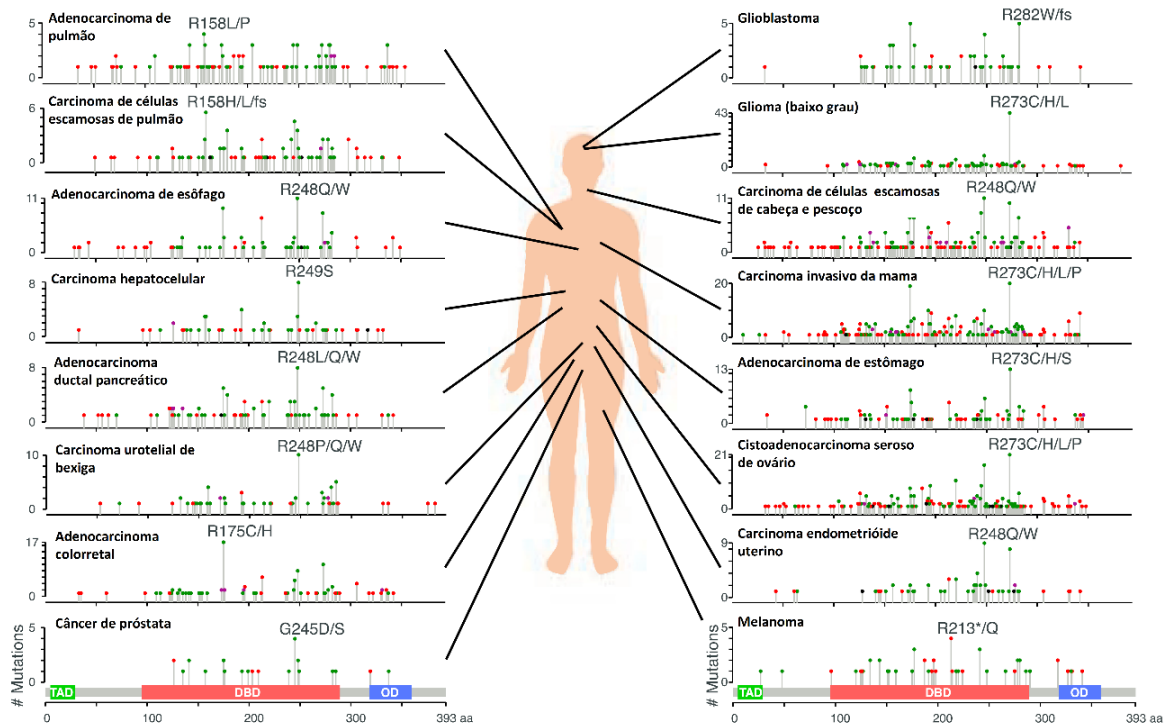


Figura 3. Distribuição de mutações somáticas em *TP53* entre 16 tipos tumorais.

Cada histograma mostra o número de mutações encontradas em cada posição ao longo da sequência codificante, equivalente aos domínios mostrados (TAD, domínio de transaminação; DBD domínio de ligação ao DNA; OD, domínio de oligomerização). A cor de cada símbolo indica o tipo de mutação, incluindo missense (verde), sem sentido (vermelha), indels sem alteração no quadro de leitura (preto), ou múltiplos tipos (roxo). Adaptado de (Kasthuber & Lowe, 2017).

Em 2012, Rausch e colaboradores sequenciaram pela primeira vez o genoma de um tumor de um paciente com uma mutação germinativa em *TP53*. O sequenciamento de DNA desta amostra única de meduloblastoma tipo SHH revelou massivos e complexos rearranjos cromossômicos, incluindo a formação de estruturas extra-cromossômicas, chamadas de “*double minutes*”, em um evento raro conhecido como cromotripse. Ao ampliar a coorte com a inclusão de 98 novos casos de meduloblastomas de diferentes subtipos, o grupo demonstrou uma forte associação entre mutações germinativas em *TP53* e cromotripse em

meduloblastomas tipo SHH. Enquanto todos os meduloblastomas deste subtipo apresentaram cromotripse e mutações em *TP53*, os outros tumores raramente apresentaram os rearranjos ou mutações germinativas em *TP53* (Rausch *et al.*, 2012). A cromotripse é um evento raro e estima-se que só ocorre em aproximadamente 2-3% de todos os tumores, com exceção dos tumores ósseos, onde ocorre em 25% dos casos (Stephens *et al.*, 2011). Tradicionalmente, a carcinogênese é pensada como um processo que progride através de uma série de eventos genéticos (Fearon & Vogelstein, 1990) sendo, portanto, bem diferente da cromotripse, onde os rearranjos massivos (também chamados de “catastróficos”) são gerados em um único evento (Stephens *et al.*, 2011). Provavelmente como decorrência da alteração na função de diversos genes importantes, a cromotripse parece estar relacionada a um pior prognóstico em certos tipos tumorais, como mielomas (Magrangeas *et al.*, 2011), melanomas (Hirsch *et al.*, 2013) e neuroblastomas (Molenaar *et al.*, 2012). A identificação de tumores com cromotripse é importante porque pode impactar no prognóstico de diversas maneiras, já que terapias contra oncogenes presentes em tumores com cromotripse podem ser uma opção terapêutica para estes pacientes. Além disso, a grande quantidade de rearranjos presentes nestes tumores pode torna-los mais suscetíveis a terapias imunes, como as bem-sucedidas terapias baseadas em bloqueio imunológico dos pontos de checagem, utilizadas no tratamento de tumores com um grande número de alterações somáticas decorrentes de defeitos no sistema de reparo de bases mal pareadas (Le *et al.*, 2017). Uma vez estabelecida a relação entre mutações germinativas em *TP53* e cromotripse, estes pacientes podem se beneficiar com o uso de tratamentos que não envolvam dano ao DNA e/ou radioterapia, para reduzir o potencial de resistência às terapias (Rode *et al.*, 2016).

Utilizando sequenciamento de genoma ou exoma de amostras de carcinoma adrenocortical pediátrico, um estudo recente mostrou perda de heterozigosidade em todos os tumores provenientes de pacientes com mutações germinativas ou somáticas de *TP53*. O estudo mostra ainda que ao perder o alelo selvagem estes clones se tornam mais instáveis e mais propensos ao acúmulo de mutações, característica que foi observada em todos os tumores com mutações

germinativas em *TP53*. Além disso, outros achados revelaram diferenças importantes entre tumores com e sem mutações germinativas em *TP53*, como as mutações somáticas em *CTNNB1* (β -catenina), identificadas apenas em tumores sem mutações germinativas em *TP53*, sugerindo mecanismos de carcinogênese distintos. Este estudo analisou também amostras de portadores da mutação fundadora brasileira, R337H, mas não revelou diferenças significativas entre os tumores de portadores desta mutação ou de mutações clássicas (Pinto *et al.*, 2015).

Embora esteja bem estabelecido que mutações germinativas em *TP53* promovem a tumorigênese, os eventos somáticos envolvidos no desenvolvimento destes tumores não são completamente compreendidos, e apenas os dois estudos mencionados acima (Pinto *et al.*, 2015; Rausch *et al.*, 2012) investigaram o perfil de molecular somático de tumores (carcinomas adrenocorticais e meduloblastomas) de pacientes com mutações germinativas em *TP53*.

Capítulo II – Justificativa

No contexto da síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário, os benefícios da identificação de portadores de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* são bem estabelecidos. Apesar da importância do diagnóstico molecular de indivíduos em risco para a síndrome, o acesso a esses testes ainda é muito limitado no Brasil, por várias razões. A primeira delas e talvez a mais impactante é o alto custo do teste genético, que faz com que o Sistema Único de Saúde não disponibilize o mesmo, deixando aproximadamente 70% da população brasileira sem o atendimento adequado. Neste contexto, a utilização de painéis de baixo custo e capazes de genotipar dezenas de mutações surge como uma oportunidade valiosa, uma vez que estes podem ser utilizados como teste de rastreamento, em uma primeira abordagem das famílias em risco. No entanto, a eficácia na utilização dos painéis depende da existência, na população alvo, de mutações fundadoras e/ou recorrentes, que sejam responsáveis por um percentual significativo das mutações identificadas nesta população. A identificação de tais mutações, por sua vez, depende de um extenso conhecimento acerca do perfil genético da população. No Brasil, poucos estudos avaliaram a prevalência de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* por sequenciamento completo dos genes, de forma que o espectro mutacional na nossa população é amplamente desconhecido.

Em um cenário de recursos financeiros limitados, uma outra abordagem possível é a disponibilização da testagem apenas para indivíduos com risco mais alto, ou seja, aqueles com maior chance de portar uma mutação. Embora não seja ideal, essa abordagem pode ser útil em um primeiro momento, até que os avanços tecnológicos tornem o teste genético ainda mais acessível. Para tanto, é necessário avaliar, em cada população, quais são os critérios clínicos associados a uma maior probabilidade mutacional. Finalmente, embora *BRCA1* e *BRCA2* sejam responsáveis pela maior parte dos casos HBOC, diversos estudos demonstram que outros genes de penetrância alta e moderada tem um papel importante no desenvolvimento da síndrome. O conhecimento acerca da contribuição individual de cada gene é essencial para auxiliar no desenvolvimento de painéis multigênicos específicos para nossa população.

Atualmente, pacientes com câncer de mama e ovário e portadores de mutações germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2* podem se beneficiar de tratamentos que exploram este defeito (como os inibidores de PARP), ilustrando a união bem sucedida entre a genômica e a medicina personalizada. Por outro lado, pacientes com tumores de mama relacionados a mutações germinativas em *TP53* recebem o mesmo tratamento de pacientes que não possuem tais mutações, em decorrência da falta de conhecimento acerca dos eventos somáticos envolvidos nos tumores de mama da síndrome de Li-Fraumeni. Não é sabido, por exemplo, se a perda do alelo selvagem é um evento necessário em todos os tumores de mama da SLF, e quais são os eventos que se seguem a este. Estes eventos podem estar relacionados à mutações em genes essenciais para a progressão do tumor e que podem, por sua vez, ser alvo de uma droga específica. Assim, a identificação destas alterações é uma oportunidade para o desenvolvimento de tratamentos e condutas terapêuticas específicas, e pode, em última análise, impactar significativamente no prognóstico de um paciente.

Capítulo III – Objetivos

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil clínico, alterações moleculares e somáticas em indivíduos com síndromes de predisposição hereditária ao câncer de mama e/ou ovário no Brasil.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Avaliar a utilidade clínica de um painel de espectrometria de massa de baixo custo no rastreamento de mutações específicas em *BRCA1* e *BRCA2*;

3.2.2. Realizar uma caracterização do espectro de variantes patogênicas identificadas em *BRCA1* e *BRCA2* no Brasil, e avaliar a possível presença de mutações fundadoras e/ou recorrentes;

3.2.3. Investigar a prevalência da mutação fundadora portuguesa *BRCA2* c.156_157insAlu em uma larga coorte de indivíduos com critérios clínicos para a síndrome HBOC e avaliar, nos casos positivos, se estes compartilham o mesmo haplótipo ancestral português.

3.2.4. Descrever o perfil clínico e estimar a prevalência e o espectro de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* em indivíduos que preenchem critérios para a síndrome HBOC em uma amostra do Rio Grande do Sul;

3.2.5. Correlacionar estes achados moleculares com as características clínicas e história familiar dos pacientes, avaliando se os critérios clínicos internacionais para HBOC são adequados à população estudada;

3.2.6. Avaliar a contribuição e o perfil mutacional de outros genes de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário, além de *BRCA1* e *BRCA2*, através de painéis multigênicos incluindo principalmente genes de alta penetrância (*CDH1*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11* e *TP53*);

3.2.7. Revisar, através de dados publicados na lit

3.2.8. Investigar o repertório de eventos somáticos envolvidos na carcinogênese de tumores de mama relacionados à síndrome de Li-Fraumeni, e determinar as assinaturas moleculares destes tumores.

Capítulo IV – Artigo 1

Prevalence of Hispanic *BRCA1* and *BRCA2* mutations among hereditary breast and ovarian cancer patients from Brazil reveals differences among Latin American populations.

Artigo publicado na revista *Cancer Genetics*. 2016 Sep;209(9):417-422.



ELSEVIER



CrossMark

Cancer Genetics 209 (2016) 417–422

**Cancer
Genetics**

ORIGINAL ARTICLE

Prevalence of Hispanic *BRCA1* and *BRCA2* mutations among hereditary breast and ovarian cancer patients from Brazil reveals differences among Latin American populations

Bárbara Alemar ^{a,b}, Josef Herzog ^c, Cristina Brinckmann Oliveira Netto ^d, Osvaldo Artigalás ^e, Ida Vanessa D. Schwartz ^{a,d,f}, Camila Matzenbacher Bittar ^a, Patricia Ashton-Prolla ^{a,b,d,f,*}, Jeffrey N. Weitzel ^c

^a Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500—Prédio 43323M, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91501-970, Brazil; ^b Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90035-903, Brazil; ^c Department of Population Sciences, Division of Clinical Cancer Genetics, City of Hope, 1500 East Duarte Road, Duarte, CA 91010, USA; ^d Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90035-903, Brazil; ^e Hospital Moinhos de Vento (HMV), Rua Ramiro Barcelos, 910, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91790-560, Brazil; ^f Departamento de Genética, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9500—Prédio 43323M, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91501-970, Brazil

Germline mutations in *BRCA1* or *BRCA2* (*BRCA*) are responsible for 5–15% of breast (BC) and ovarian cancers (OC), predisposing to the development of early onset and often multiple primary tumors. Since mutation carriers can benefit from risk-reducing interventions, the identification of individuals with hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome has a significant clinical impact. We assessed whether a panel assay for recurrent Hispanic *BRCA* mutations (HISPANEL) has an adequate breadth of coverage to be suitable as a cost effective screening tool for HBOC in a cohort of patients from Southern Brazil. A multiplex, PCR-based panel was used to genotype 232 unrelated patients for 114 germline *BRCA* mutations, finding deleterious mutations in 3.5% of them. This mutation prevalence is within the range detected by the HISPANEL among BC patients unselected for family history in other Latin American settings. The HISPANEL would have accounted for 27% of the *BRCA* mutations detected by complete sequencing in a comparison cohort (n = 193). This prevalence may be region-specific since significant differences in population structure exist in Brazil. Comprehensive analysis of *BRCA* in a larger set of HBOC patients from different Brazilian regions is warranted, and the results could inform customization of the HISPANEL as an affordable mutation screening tool.

Keywords Hereditary breast and ovarian cancer, *BRCA1*, *BRCA2*

© 2016 Published by Elsevier Inc.

Background

Breast cancer is the most prevalent cancer type in women worldwide (1). In the United States, 246,660 new female breast

cancer cases and 22,280 new ovarian cancer cases were expected for 2016 (2). In Latin America, approximately 115,000 new breast cancer cases are diagnosed each year (3), and Brazil is responsible for roughly 50% of these. The Brazilian National Cancer Institute estimates that 57,960 and 6150 new breast and ovarian cancers will be diagnosed in 2016, respectively, corresponding to 19.2% and 2.05% of all malignancies in women (4). Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) is mainly associated with germline muta-

Received January 28, 2016; received in revised form June 7, 2016; accepted June 9, 2016.

* Corresponding author.

E-mail address: pprolla@gmail.com

2210-7762/\$ - see front matter © 2016 Published by Elsevier Inc.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cancergen.2016.06.008>

tions in the *BRCA1* and *BRCA2* (*BRCA*) genes, although less frequent disease-causing mutations have been described in other genes (5). Approximately 5% of all breast and 15% of all ovarian cancers, regardless of age at diagnosis and cancer family history, are attributed to germline *BRCA* mutations (6). The type and location of *BRCA* mutations have an influence on cancer risk (7) but in general, female carriers have a lifetime risk of 50%–85% and 10%–40% of developing breast and ovarian cancer, respectively. Increased risk for prostate and pancreatic cancer has been described for *BRCA2* carriers (5,8,9).

The molecular diagnosis of HBOC in patients is important with regard to the development of management strategies, and also to allow genetic counseling for additional at-risk relatives. Although *BRCA* mutations occur in all ethnic groups, their prevalence varies among different populations. Common recurring *BRCA* mutations have been observed in Latin America, although the prevalence varies among different countries and also within the same country (10–13). Despite evidence supporting the use and efficacy of genetic counseling and testing (14), there is very limited access in the majority of Latin American countries. This is primarily due to the high costs for genetic testing, insufficient training of health care professionals and a paucity of clinical and laboratory personnel trained in cancer genetics. Coupled with clinical training (15), the use of a rapid and affordable mutation screening panel could be advantageous as it could be offered to a large number of patients at a low cost, depending on the proportion of mutations in a given population that are represented in the panel.

In this study we used a previously developed *BRCA* mutation screening panel for Latin American populations (HISPANEL) to assess mutation prevalence and evaluate clinical utility in a HBOC cohort from Southern Brazil.

Materials and methods

Unrelated patients fulfilling the clinical criteria for *BRCA1* and *BRCA2* testing established by the National Comprehensive Cancer Network (NCCN, www.nccn.org) signed an informed consent and were enrolled in an Institutional Ethics Committee-approved protocol for *BRCA* testing. Information on family history and clinical data (age, gender, tumor diagnosis) were obtained from a review of medical records. In addition to the NCCN criteria, probands were classified by the ASCO (16,17) criteria and had their *a priori* mutation probabilities estimated using the Myriad mutation prevalence tables (18,19) and the Penn II model (<http://www.afcri.upenn.edu/tacc/penn2/>). While the ASCO criteria (1996) are more restrictive, the NCCN guidelines are less stringent and include other tumors besides breast and ovarian cancers. The ASCO criteria consider for genetic analysis only families with (1) >2 breast cancer cases and one or more cases of ovarian cancer diagnosed at any age; or (2) >3 breast cancer cases diagnosed before age 50; or (3) sister pairs with two breast cancers, two ovarian cancers, or a breast and ovarian cancer diagnosed before age 50 years. NCCN (version 2.2014) criteria consider several aspects of the patient's personal and family history including other HBOC-related tumors (i.e. prostate and pancreatic cancers) and allowing testing of isolated cancer cases, given that certain age/histology/ethnicity criteria are met.

Genomic DNA was obtained by standard methods from peripheral blood. All patients were screened for 114 *BRCA* mutations at a cost of <\$20 USD, with a panel estimated to account for up to 75–80% of all Hispanic *BRCA* mutations (HISPANEL) (20). Multiplex PCR fragments were genotyped on a Sequenom MassARRAY platform using MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization–time-of-flight) mass spectrometry as previously described (11,20). The HISPANEL is organized into 5 multiplex PCR reactions and detects 59 *BRCA1* and 55 *BRCA2* mutations, including 15 mutations already described in Brazilian patients (21–26). Results of the HISPANEL analyses were compared to data from an independent cohort of 193 unrelated probands from the same region who met the same inclusion criteria and had full *BRCA* testing by either Sanger or next generation sequencing at commercial diagnostic laboratories.

The Mann–Whitney test was used to evaluate the difference between age at diagnosis in both cohorts. P-values of <0.05 were considered significant. All analyses were performed using Statistical Product and Service Solutions (SPSS) software version 18.0 (IBM).

Results

In the group of 232 unrelated probands, 94% were cancer affected individuals; 88.3% and 5.6% were affected by breast and ovarian cancer, respectively. The mean ages at cancer diagnosis were 43 years for breast cancer (range 23–74 years) and 47 years for ovarian cancer (range 19–66 years). Thirty four percent of all breast cancer patients were diagnosed at age 40 years or younger, and 71% were diagnosed at or before age 50 years. The clinical features of the patients are summarized in Table 1.

Overall, *BRCA* mutations were detected in 8 of 232 patients (3.5%). Among breast and/or ovarian cancer affected individuals, the mutation prevalence was 3.8% and all *BRCA* mutation carriers identified in this study had been previously diagnosed with either breast and/or ovarian cancer, including one male breast cancer patient. All carriers except one (bilateral triple negative breast cancer patient, diagnosed at 42 and 55 years) had a strong family history of breast and/or ovarian cancer. *BRCA1* mutations were detected in six patients and the majority harbored the *BRCA1* mutation designated c.5266dupC (5382insC). The specific *BRCA* mutations and clinical characteristics of the carriers are described in Table 2.

The *BRCA* mutation prevalence obtained with the use of HISPANEL was compared with full *BRCA* gene sequencing data from an independent cohort of 193 unrelated probands from the same geographic region (Rio Grande do Sul State, Southern Brazil) who met the same inclusion criteria and were tested either by Sanger or NGS sequencing at diagnostic laboratories. There was no difference regarding age at diagnosis between group, either comparing all cancer affected individuals (mean age 43 years; $P = 0,959$), only breast cancer individuals (mean age 42.7 years; $P = 0,774$) or only ovarian cancer affected patients (mean age 47 years; $P = 0,787$). Taken together, these data suggest that the cohorts can be compared. Overall mutation prevalence in the gene sequencing cohort was 22.8% (44/193 probands), and the mutations found are depicted in Table 3. Among all 33 different mutations found, 9 are in the HISPANEL (5 in *BRCA1* and 4 in *BRCA2*). Thus,

Table 1 Clinical characteristics of HBOC patients from Southern Brazil (N = 232)

Feature	N (%)	Mean (range)
Gender		
Female	224 (96.5)	
Male	8 (3.5)	
Proband status		
Cancer affected	218 (94.0)	
Unilateral BrCa only	140 (60.3)	
Unilateral BrCa + other ^a	7 (3.0)	
Bilateral BrCa only	43 (18.5)	
Bilateral BrCa + other ^a	3 (1.3)	
Male BrCa	6 (2.6)	
Unilateral OvCa only	4 (1.7)	
Unilateral OvCa + other ^a	2 (0.8)	
Bilateral OvCa	1 (0.4)	
BrCa and OvCa	6 (2.6)	
Other primary tumors ^b	6 (2.6)	
Age at diagnosis (years)		
BrCa affected ^c		43 (23–74)
OvCa affected ^c		47 (19–66)
OthCa affected ^c		51 (32–63)
HBOC criteria^d		
ASCO	52 (22.4)	
A priori mutation probability		
Myriad ≥ 10%	64 (27.6)	(10–40)
Penn II ≥ 10%	181 (78.0)	(10–81)
Penn II ≥ 20%	50 (21.5)	(20–81)

^a Primary tumor other than breast and/or ovarian cancer.

^b Patients in this group did not have breast and/or ovarian tumors. Instead, they had colorectal cancer (N = 3), prostate cancer (N = 1), bladder cancer (N = 1) and leukemia (N = 1).

^c Age at diagnosis of breast, ovarian or other tumors. Only the first diagnosis is considered for patients who had more than one tumor.

^d All patients fulfilled the NCCN criteria.

the HISPANEL includes 27% of the specific mutations detected in this comparison cohort and would have yielded detection of 7.8% of the mutants in this comparison group.

Discussion

Using the HISPANEL assay for recurrent Hispanic *BRCA* mutations, we identified a deleterious *BRCA1* or *BRCA2* mutation in 3.5% of women from Southern Brazil fulfilling the NCCN criteria for testing. Previous studies performed in Latin American populations described variable mutation prevalences using the HISPANEL. Screening with the HISPANEL identified mutations in: 5% of breast cancer patients from Lima, Peru (27); 0.8% of breast cancer patients from Medellín, Colombia (10); 15.6% of ovarian cancer patients from Bogotá, Colombia (11); and 7.4% of breast and ovarian cancer patients from Mexico (20). It is important to note that all these studies only included cancer affected patients that were unselected for family history, thus a lower prevalence is not surprising. Even when comparing more comprehensive studies in which the whole coding sequence and exon–intron boundaries of the *BRCA* genes were analyzed, significant heterogeneity exists in the mutation prevalence rates observed throughout Latin America. In Mexico, *BRCA* mutation prevalence varies from 10.2% in HBOC patients (28) to 21% (including large genomic rearrangements) in breast and ovarian cancer patients unselected for family history (20). In Argentina, a prevalence of 28.3% was reported in a series of breast or ovarian cancer patients selected for age at diagnosis and positive cancer family history (29), and a similar prevalence (24.5%) was found by Torres et al. (30) in Colombian patients with breast and/or ovarian cancer and a family history of cancer. Two different studies conducted among Chilean patients revealed close prevalence rates: Gallardo et al. (31) reported a mutation prevalence of 7.4% among HBOC patients, and Gonzalez-Hormazabal

Table 2 *BRCA1* and *BRCA2* mutations identified by HISPANEL in Brazilian patients fulfilling the clinical criteria for hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome

Gene	Mutation (BIC) ^a	Mutation (HGVS) ^a	Gender, tumor type and age at diagnosis	Family history
<i>BRCA1</i>	3450del4	c.3331_3334delCAAG (p.Gln1111Asnfs)	Female; OvCa (47); TN BrCa (50); Renal cell carcinoma (52)	Maternal: BrCa (53); PrCa (54); BrCa (<20)
<i>BRCA1</i>	5382insC	c.5266dupC (p.Gln1756Profs)	Male; BrCa (64)	BrCa 34; BrCa ≤ 50; BrCa 32 ^b
<i>BRCA1</i>	5382insC	c.5266dupC (p.Gln1756Profs)	Female; Bilateral BrCa (23, 44)	Maternal: BrCa (45); Bilateral BrCa (48); BrCa (30); Bilateral BrCa (58); BrCa
<i>BRCA1</i>	5382insC	c.5266dupC (p.Gln1756Profs)	Female; Bilateral TN BrCa (35, 45)	Maternal: OvCa (58); OvCa (49); BrCa (49), BrCa (90)
<i>BRCA1</i>	5382insC	c.5266dupC (p.Gln1756Profs)	Female; OvCa (52)	Maternal: OvCa (77); BrCa (44); OvCa (66)
<i>BRCA1</i>	5382insC	c.5266dupC (p.Gln1756Profs)	Female; Bilateral BrCa (26)	Paternal: BrCa (50); BrCa (28); BrCa (30); PrCa (50)
<i>BRCA2</i>	3034del4	c.2806_2809delAAAC (p.Ala938Profs)	Female; BrCa (49)	Paternal: BrCa (32); BrCa (44); Bilateral BrCa (40, 55)
<i>BRCA2</i>	3034del4	c.2806_2809delAAAC (p.Ala938Profs)	Female; Bilateral TN BrCa (42,55)	None

Abbreviations: BrCa, breast cancer; OvCa, ovarian cancer; PrCa, prostate cancer; TN, triple negative.

^a Mutation nomenclature according to the Breast Cancer Information Core (BIC, <https://research.nhgri.nih.gov/projects/bic/Member/index.shtml>) database and Human Genome Variation Society (HGVS, <http://www.hgvs.org/>) guidelines.

^b Family side (maternal/paternal) undetermined.

Table 3 *BRCA1* and *BRCA2* mutations identified by full sequencing (comparison cohort) in Brazilian patients fulfilling clinical criteria for hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) Syndrome

BRCA1				
Mutation	Carriers	HGVS name		BIC name
		c.	p.	
1	1	c.273_274delITG	p.Ala92Phefs	392delITG
2	1	c.791_794delGTTC	p.Ser264Metfs	910del4
3	1	c.1612C>T	p.Gln538Ter	1731C>T
4	2	c.1687C>T	p.Gln563Ter	1806C>T
5	1	c.2727_2730delTCAA	p.Asn909Lysfs	2844del4 2846del4
6	1	c.3228_3229delAG	p.Gly1077Alafs	3347delAG
7	1	c.3331_3334delCAAG	p.Gln1111Asnfs	3448del4 3447del4 3450del4
8	1	c.3534delC	—	ND
9	1	c.3598C>T	p.Gln1200Ter	3717C>T
10	1	c.4183C>T	p.Gln1395Ter	4302C>T
11	1	c.4357+1G>A	NA	IVS13+1G>A 4476+1G>A
12	1	c.4484G>C	p.Arg1495Thr	4603G>C
13	1	c.4663delA	p.Arg1555Glyfs	ND
14	1	c.4736_4739delCTTC	p.Pro1579fs	ND
16	2	c.5062_5064delGT	p.Val1688del	5181_5183delGTT
16	3	c.5177_5180delGAAA	p.Arg1726Lysfs	5292del4 / 5296del4
17	2	c.5251C>T	p.Arg1751Ter	5370C>T
18	4	c.5266dupC	p.Gln1756Profs	5382insC 5384insC 5385insC 5383insC
TOTAL	26			
BRCA2				
Mutation	# Carriers	HGVS name		BIC name
		c.	p.	
1	1	c.156_157insAluYa5	—	384insAlu
2	2	c.1138delA	p.Ser380Valfs	1366delA
3	1	c.2505dupA	p.Pro836fs	ND
4	1	c.2805_2808delTAAA	p.Ala938Profs	3033del4
5	3	c.2808_2811delACAA	p.Ala938Profs	3036delACAA 3034del4 3036del4
6	1	c.3975_3976dupTGCT	p.Thr1325fs	ND
7	1	c.4829_4830delITG	p.Val1610Glyfs	5057delITG
8	1	c.5351dupA	p.Asn1784Lysfs	5579insA
9	1	c.5946delIT	p.Ser1982Argfs	6174delIT
10	1	c.6405_6409delCTTAA	p.Asn2135Lysfs	6630del5 6633del5
11	1	c.6656C>G	p.Ser2219Ter	6884C>G
12	1	c.7580_7583dupTAGG	p.Gly2529Argfs*11	ND
13	1	c.7986delG	p.Glu2665Lysfs	ND
14	1	c.8878C>T	p.Gln2960Ter	9106C>T
15	1	c.9282_9397del	p.Asp3095Argfs	ND
TOTAL	18			

Abbreviations: ND, not described mutation; NA, not applicable. Mutations in bold are also in the HISPANEL.

et al. (32) described, in a larger cohort of high-risk breast and/or ovarian cancer families, a prevalence of 7.1%. Finally, in Uruguay, 17% of 42 patients selected by family history carried a pathogenic germline mutation in one of the *BRCA* genes (33). Only two smaller studies (combined n = 174) have performed comprehensive *BRCA* sequencing among Brazilian patients fulfilling the NCCN criteria from the Brazilian State of São Paulo, wherein the HISPANEL detection rate would have been 7–11%, which corresponds to more than one third of the mutations detected by complete sequencing (detection rate 20–21%) (24,25).

The low mutation prevalence observed in this series, compared to other previous studies with Latin American populations, likely reflects specific population composition and geographic characteristics in the region studied that are different from other regions in Latin America. Indeed, besides the fact that Brazil is not a Hispanic country, the Rio Grande do Sul State was colonized mainly by Italians and Germans.

The *BRCA1* c.5266dupC mutation (also known as 5382insC) was the most prevalent mutation identified in this study. This Ashkenazi Jewish founder mutation (34,35) has been described in Dutch, Russian, French and many other

populations, and a recent study showed that 245 carriers from 14 different populations presented the same haplotype, suggesting a single founder origin (36). Indeed, this is one of the most common mutations identified in Brazilian patients to date (22,24,25), and Gomes et al. (22) found 5382insC in 56% of all BRCA mutation carriers, and a very similar frequency (57%) was described by Lourenço et al. (37). A 2008 study demonstrated that seven Brazilian 5382insC carriers all shared the same haplotype (38). Interestingly, this mutation was not observed in other Latin American HISPANEL studies (10,11,20,27) and despite the significant difference in colonization patterns in Latin American countries (Brazil was mainly colonized by Portugal, while other Latin American countries were mainly colonized by Spain), there is no description of this mutation among Portuguese HBOC families, and only one Spanish carrier was reported (39).

In addition, we identified the BRCA2 c.2806_2809delAAC (3034del4) mutation (which has also been reported as 3036del4 or c.2808_2811delACAA) in two patients. Although this mutation is highly prevalent among Spanish HBOC families, corresponding to 26% of all identified BRCA2 mutations (40), it was reported in only two Peruvian patients (27) among four previous HISPANEL studies. Haplotype analysis in 11 unrelated carriers from seven countries revealed a great difference among all families (although not statistically significant), suggesting different origins for this mutation (41). Finally, we and others detected the BRCA1 c.3331_3334delCAAG (3450del4) mutation (23,24,26), which was previously described in Colombian patients, where its prevalence ranged from 1.6% in unselected breast cancer patients (30) to 73% of detected mutations among unselected ovarian cancer patients (11). In Brazil, this mutation has already been seen (23,24,26).

Six of the eight male patients included in this study were diagnosed with breast cancer, and the other two had prostate and bladder cancer. Considering these results, the mutational prevalence found among men (1 in 6 male patients, 16%) is similar to that reported in other male breast cancer studies (42). It is worth highlighting that the male patient with BRCA mutation found in our study has it in BRCA1. Although the association between male breast carcinoma and deleterious germline mutations in BRCA1 is not very clear (43), the prevalence of BRCA2 mutations in this group ranges from 4% (44) to 40% (45) in different populations. To our knowledge, there has been so far no published information on the prevalence of BRCA1 or BRCA2 mutations in Brazilian male breast cancer patients.

The limited data available from a comprehensive BRCA1 and BRCA2 mutational analysis in Brazilian HBOC patients suggest that there is significant allelic heterogeneity, as observed in other American countries and most of Europe. Although there is no information regarding negative and positive predictive values of HISPANEL, the aim of this study was to evaluate the usefulness of HISPANEL in a different cohort from a Latin American country. Furthermore, even though some of the Brazilian mutations are not in the current version of the HISPANEL, it could be scaled up to include a broader mutational spectrum. Taken together with other published studies, the data from our comparison cohort will contribute to identify recurrent mutations in this population that could be included in an adapted version of HISPANEL. In Brazil, the public health care system currently does not cover genetic testing for HBOC and private insurance, which covers 20–25% of the popula-

tion, has only recently (2013) started to cover the expenses of genetic testing.

While the yield of mutations was modest, HISPANEL screening for the 232 cases in this study cost approximately \$4600 USD, compared to the estimated \$96,500 USD cost for commercial sequencing for the comparison cohort. The development of an affordable front line screening approach such as the HISPANEL, which can be adapted to include the most prevalent mutations based on population and geographic structure present in different Latin American countries, may significantly impact clinical care of individuals and families at risk for HBOC in this region.

Acknowledgments

This study was supported in part by a grant from the Breast Cancer Research Foundation, Avon grant #02-2013-044, and NIH/NCI grant #RC4 CA153828-01 (PI: J. Weitzel) for the Clinical Cancer Genomics Community Research Network. This was also supported in part by grants from Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE) from Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We also thank Gustavo Stumpf da Silva for his laboratory support.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015;136:E359–E386.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016;66:7–30.
3. Lee BL, Liedke PE, Barrios CH, et al. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. *Lancet Oncol* 2012;13:e95–e102.
4. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil (Estimate/2016—Cancer Incidence in Brazil). Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2015.
5. Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, et al. Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes—second edition. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2008;1–93.
6. Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, et al. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer* 1996;77:2318–2324.
7. Rebbeck TR, Mitra N, Wan F, et al. Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer. *JAMA* 2015;313:1347–1361.
8. Castro E, Goh C, Olmos D, et al. Germline BRCA mutations are associated with higher risk of nodal involvement, distant metastasis, and poor survival outcomes in prostate cancer. *J Clin Oncol* 2013;31:1748–1757.
9. Narod SA, Neuhausen S, Vichodez G, et al. Rapid progression of prostate cancer in men with a BRCA2 mutation. *Br J Cancer* 2008;99:371–374.
10. Hernández JE, Llacuachaqui M, Palacio GV, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected breast cancer patients from Medellín, Colombia. *Heredit Cancer Clin Pract* 2014;12:11.
11. Rodríguez AO, Llacuachaqui M, Pardo GG, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations among ovarian cancer patients from Colombia. *Gynecol Oncol* 2012;124:236–243.
12. Hall MJ, Reid JE, Burbidge LA, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer. *Cancer* 2009;115:2222–2233.

13. Weitzel JN, Clague J, Martir-Negron A, et al. Prevalence and type of BRCA mutations in Hispanics undergoing genetic cancer risk assessment in the southwestern United States: a report from the Clinical Cancer Genetics Community Research Network. *J Clin Oncol* 2013;31:210–216.
14. Weitzel JN, Blazer KR, MacDonald DJ, et al. Genetics, genomics and cancer risk assessment: state of the art and future directions in the era of personalized medicine. *CA Cancer J Clin* 2011;61:327–359.
15. Blazer KR, MacDonald DJ, Culver JO, et al. Personalized cancer genetics training for personalized medicine: improving community-based healthcare through a genetically literate workforce. *Genet Med* 2011;13:832–840.
16. Statement of the American Society of Clinical Oncology: genetic testing for cancer susceptibility, Adopted on February 20, 1996. *J Clin Oncol* 1996;14:1730–1736, discussion 1737–1740.
17. Robson ME, Bradbury AR, Arun B, et al. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic and genomic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol* 2015;33:3660–3667.
18. Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, 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.
19. Antoniou AC, Hardy R, Walker L, et al. Predicting the likelihood of carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation: validation of BOADICEA, BRCAPRO, IBIS, Myriad and the Manchester scoring system using data from UK genetics clinics. *J Med Genet* 2008;45:425–431.
20. Villarreal-Garza C, Alvarez-Gómez RM, Pérez-Plasencia C, et al. Significant clinical impact of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexico. *Cancer* 2015;121:372–378.
21. Duffloth RM, Carvalho S, Heinrich JK, et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. *Sao Paulo Med J* 2005;123:192–197.
22. Gomes MC, Costa MM, Borojevic R, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil. *Breast Cancer Res Treat* 2007;103:349–353.
23. Esteves VF, Thuler LC, Amêndola LC, et al. 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;42:453–457.
24. Carraro DM, Koike Folgueira MA, Garcia Lisboa BC, 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.
25. Silva FC, Lisboa BC, Figueiredo MC, et al. Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. *BMC Med Genet* 2014;15:55.
26. Felix GE, Abe-Sandes C, Machado-Lopes TM, et al. Germline mutations in BRCA1, BRCA1, CHEK2 and TP53 in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population. *Hum Genome Var* 2014;1:14012.
27. Abugattas J, Llacuachaqui M, Allende YS, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in unselected breast cancer patients from Peru. *Clin Genet* 2015;88:371–375.
28. Vaca-Paniagua F, Alvarez-Gomez RM, Fragos-Ontiveros V, et al. Full-exon pyrosequencing screening of BRCA germline mutations in Mexican women with inherited breast and ovarian cancer. *PLoS ONE* 2012;7:e37432.
29. Solano AR, Aceto GM, Delettières D, et al. BRCA1 and BRCA2 analysis of Argentinean breast/ovarian cancer patients selected for age and family history highlights a role for novel mutations of putative south-American origin. *Springerplus* 2012;1:20.
30. Torres D, Rashid MU, Gil F, et al. High proportion of BRCA1/2 founder mutations in Hispanic breast/ovarian cancer families from Colombia. *Breast Cancer Res Treat* 2007;103:225–232.
31. Gallardo M, Silva A, Rubio L, et al. Incidence of BRCA1 and BRCA2 mutations in 54 Chilean families with breast/ovarian cancer, genotype-phenotype correlations. *Breast Cancer Res Treat* 2006;95:81–87.
32. Gonzalez-Hormazabal P, Gutierrez-Enriquez S, Gaete D, et al. Spectrum of BRCA1/2 point mutations and genomic rearrangements in high-risk breast/ovarian cancer Chilean families. *Breast Cancer Res Treat* 2011;126:705–716.
33. Delgado L, Fernández G, Grotiuz G, et al. BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Uruguayan breast and breast-ovarian cancer families. Identification of novel mutations and unclassified variants. *Breast Cancer Res Treat* 2011;128:211–218.
34. Abeliovich D, Kaduri L, Lerer I, et al. The founder mutations 185delAG and 5382insC in BRCA1 and 6174delT in BRCA2 appear in 60% of ovarian cancer and 30% of early-onset breast cancer patients among Ashkenazi women. *Am J Hum Genet* 1997;60:505–514.
35. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, et al. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet* 1996;14:185–187.
36. Hamel N, Feng BJ, Foretova L, et al. On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations. *Eur J Hum Genet* 2011;19:300–306.
37. Lourenço JJ, Vargas FR, Bines J, et al. BRCA1 mutations in Brazilian patients. *Genet Mol Biol* 2004;500–504.
38. da Costa EC, Vargas FR, Moreira AS, et al. Founder effect of the BRCA1 5382insC mutation in Brazilian patients with hereditary breast ovary cancer syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;184:62–66.
39. Machado PM, Brandão RD, Cavaco BM, et al. Screening for a BRCA2 rearrangement in high-risk breast/ovarian cancer families: evidence for a founder effect and analysis of the associated phenotypes. *J Clin Oncol* 2007;25:2027–2034.
40. Díez O, Osorio A, Durán M, et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Hum Mutat* 2003;22:301–312.
41. Neuhausen SL, Godwin AK, Gershoni-Baruch R, et al. Haplotype and phenotype analysis of nine recurrent BRCA2 mutations in 111 families: results of an international study. *Am J Hum Genet* 1998;62:1381–1388.
42. Mohamad HB, Apffelstaedt JP. Counseling for male BRCA mutation carriers: a review. *Breast* 2008;17:441–450.
43. Weiss JR, Moysich KB, Swede H. Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:20–26.
44. Friedman LS, Gayther SA, Kurosaki T, et al. Mutation analysis of BRCA1 and BRCA2 in a male breast cancer population. *Am J Hum Genet* 1997;60:313–319.
45. Thorlacius S, Sigurdsson S, Bjarnadottir H, et al. Study of a single BRCA2 mutation with high carrier frequency in a small population. *Am J Hum Genet* 1997;60:1079–1084.

Capítulo V – Artigo 2

The germline mutational landscape of *BRCA1* and *BRCA2* in Brazil.

Manuscrito submetido à revista *Scientific Reports*.

The germline mutational landscape of *BRCA1* and *BRCA2* in Brazil

Edenir Inêz Palmero^{1,2,§}, Dirce Maria Carraro^{3,§}, Barbara Alemar^{4,5,§}, Miguel Angelo Martins Moreira⁶, Ândrea Ribeiro-dos-Santos^{7,8}, Kiyoko Abe-Sandes⁹, Henrique Campos Reis Galvão¹⁰, Rui Manuel Reis^{1,11-12}, Cristiano de Padua Souza¹⁰, Natalia Campacci¹, Maria Isabel Achatz¹³, Rafael Canfield Brianese³, Maria Nirvana da Cruz Formiga¹⁴, Fabiana Baroni Makdissi¹⁵, Fernando Regla Vargas^{16,17}, Anna Cláudia Evangelista dos Santos⁶, Héctor Nicolas Seuanez⁶, Kelly Rose Lobo de Souza⁶, Cristina Brinckmann de Oliveira Netto¹⁸, Patrícia Santos-Silva⁵, Gustavo Stumpf da Silva⁵, Rommel Mario Rodriguez Burbano¹⁹, Sidney Santos^{7,8}, Paulo Pimentel Assumpção⁸, Izabel Maria Monteiro Bernardes⁸, Taisa Manuela Bonfim Machado-Lopes⁹, Thais Ferreira Bomfim⁹, Maria Betânia Pereira Toralles⁹, Ivana Nascimento^{9,20}, Bernardo Garicochea²¹, Sergio Simon²², Simone Noronha²³, Fernanda Teresinha de Lima²⁴, Anisse Chami^{25,26}, Camila Matzenbacher Bittar^{4,5}, Jose Bines²⁷, Osvaldo Artigalas²⁸, Maria Del Pilar Esteves-Diz²⁹, Tirzah Braz Petta Lajus³⁰, Ana Carolina Leite^{31,32}, Rodrigo Guindalini³³, Teresinha Cintra³⁴, Ida Schwartz^{4,18}, Pricila Bernardi³⁵, Diego Miguel³⁶, Sonia Nogueira³⁷, Josef Herzog³⁸, Jeffrey Weitzel³⁸, Patricia Ashton-Prolla^{4,5,18,*}

§ These authors contributed equally to this work.

*** Correspondence to:**

Patricia Ashton-Prolla

Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos 2350

Zip Code 90035-903

Porto Alegre RS Brazil

pprolla@gmail.com

Phone number: 55 51 33597661

1. Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Brazil
2. Barretos School of Health Science, Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos Dr. Paulo Prata, Brazil
3. International Research Center/CIPE, AC Camargo Cancer Center, Brazil
4. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil
5. Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil
6. Divisão de Genética, Instituto Nacional de Câncer, Brazil
7. Laboratório de Genética Humana e Médica, Universidade Federal do Pará, Brazil
8. Núcleo de Pesquisas em Oncologia, Universidade Federal do Pará, Brazil
9. Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Universidade Federal da Bahia, Brazil
10. Department of Oncogenetics, Barretos Cancer Hospital, Brazil
11. Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), Health Sciences School, University of Minho, Braga, Portugal
12. ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga, Guimarães, Portugal
13. Clinical Genetics Branch, Division of Cancer Epidemiology and Genetics - Department of Health and Human Services / National Cancer Institute, National Institutes of Health, USA
14. Oncogenetics and Clinical Oncology Departments, AC Camargo Cancer Center, Brazil
15. Mastology Department, AC Camargo Cancer Center, Brazil
16. Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Brazil
17. Genetics and Molecular Department, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brazil
18. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil
19. Laboratório de Biologia Molecular, Hospital Ophir Loyola, Brazil
20. Núcleo de Oncologia da Bahia, Brazil
21. Centro de Oncologia - Unidade de Aconselhamento Genético, Hospital Sírio Libanes, Brazil
22. Departamento de Oncologia Clínica, Hospital Israelita Albert Einstein, Brazil
23. COAEM - Centro Oncológico Antonio Ermirio de Moraes, Brazil
24. Centro de Aconselhamento Genético, Hospital Israelita Albert Einstein, Brazil
25. Rede Mater Dei de Saúde, Brazil
26. Instituto Hermes Pardini, Brazil
27. Oncopraxis, Brazil
28. Hospital Moinhos de Vento (HMV), Brazil

29. Departamento de Radiologia e Oncologia, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo/Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil
30. Departamento de Biologia Celular e Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brazil
31. Fujiday Oncologia D'Or, Brazil
32. Oncocentro, Hospital São Carlos, Brazil
33. CLION, CAM Group, Brazil
34. Laboratório Genoma, Brazil
35. Serviço de Genética Médica do Hospital Universitário, Divisão de Clínica Médica, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil
36. Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Serviço de Genética Médica, Universidade Federal da Bahia, Brazil
37. Departamento de Oncogenética, Oncoclin de Manaus, Brazil
38. Department of Population Sciences, Division of Clinical Cancer Genomics, City of Hope, USA

Abstract

The detection of germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* is essential to the formulation of clinical management strategies, and in Brazil, there is limited access to these services, mainly due to the costs/availability of genetic testing. Aiming at the identification of recurrent mutations that could be included in a low-cost mutation panel, used as a first screening approach, we compiled the testing reports of 649 probands with pathogenic/likely pathogenic variants referred to 28 public and private health care centers distributed across 11 Brazilian States. Overall, 126 and 103 distinct mutations were identified in *BRCA1* and *BRCA2*, respectively. Twenty-six novel variants were reported from both genes, and *BRCA2* showed higher mutational heterogeneity. Some recurrent mutations were reported exclusively in certain geographic regions, suggesting a founder effect. Our findings confirm that there is significant molecular heterogeneity in these genes among Brazilian carriers, while also suggesting that this heterogeneity precludes the use of screening protocols that include recurrent mutation testing only. This is the first study to show that profiles of recurrent mutations may be unique to different Brazilian regions. These data should be explored in larger regional cohorts to determine if screening with a panel of recurrent mutations would be effective.

**Screening and characterization of BRCA2 c.156_157insAlu in Brazil:
results from 1380 individuals.**

Manuscrito submetido à revista *Cancer Genetics*

**Screening and characterization of *BRCA2* c.156_157insAlu in Brazil:
results from 1380 individuals**

Paula Silva Felício^{1§}, Barbara Alemar^{2,3§}, Aline Silva Coelho¹, Gustavo Noriz Berardinelli¹, Matias Eliseo Melendez¹, André Van Helvoort Lengert¹, Rodrigo Depieri Micheli⁴, Rui M. Reis^{1,5,6}, Gabriela Carvalho Fernandes¹, Ingrid Petroni Ewald⁷, Camila Matzenbacher Bittar^{2,3}, Cristina Brinckmann Oliveira Netto⁸, Osvaldo Artigas⁹, Ana Peixoto¹⁰, Manuela Pinheiro¹⁰, Manuel R. Teixeira^{10,11}, Fernando Regla Vargas^{12,13}, Anna Cláudia Evangelista dos Santos¹⁴, Miguel Angelo Martins Moreira¹⁴, Patricia Ashton-Prolla^{2,3,8,#,*}, Edenir Inêz Palmero^{1,15,#,*}.

§ These authors contributed equally to this work

These authors jointly supervised this work

1. Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital. R. Antenor Duarte Villela, 1331. Barretos, São Paulo, Brazil (Zip Code 14784-400).
2. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Bento Gonçalves, 9500 – Prédio 43323M. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Zip Code 91501-970).
3. Laboratório de Medicina Genômica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Rua Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Zip Code 90035-903).
4. Department of Oncogenetics, Barretos Cancer Hospital. R. Antenor Duarte Villela, 1331. Barretos, São Paulo, Brazil (Zip Code 14784-400).
5. Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho. Campus de Gualtar, Braga, Portugal (Zip Code 4710-057).
6. ICVS/3B's - PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal.
7. Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre. Av. Independência, 75. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Zip Code 90035-072).
8. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Zip Code 90035-903).

9. Hospital Moinhos de Vento. Rua Ramiro Barcelos, 910. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (Zip Code 91790-560).
10. Department of Genetics, Portuguese Oncology Institute. R. Dr António Bernardino de Almeida. Porto, Portugal (Zip Code 4200-072).
11. Biomedical Sciences Institute Abel Salazar (ICBAS), University of Porto. R. Jorge de Viterbo Ferreira, 228. Porto, Portugal (Zip Code 4050-313)
12. Laboratório de Epidemiologia de Malformações Congênitas, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)
13. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
14. Genetics Program, Instituto Nacional de Câncer. Rua André Cavalcanti, 37. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil (Zip Code 20231-050).
15. Barretos School of Health Science, Faculdade de Ciências da Saúde de Barretos. Dr. Paulo Prata. Av. Loja Maçonica Renovadora, 68. Barretos, São Paulo, Brazil (Zip Code 14785-002).

*** Correspondence to**

Edenir Inêz Palmero, PhD

Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, Hospital de Câncer de Barretos
Avenida Antenor Duarte Vilela, 1331 - Barretos, São Paulo, Brazil

Zip Code 14784-400

Phone number: +55 17 3321 6600 ext 7057

E-mail: edenirip@yahoo.com.br

Patricia Ashton-Prolla, MD PhD

Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcelos, 2350 - Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Zip Code 90035-903

Phone number: +55 51 3359 7661

E-mail: pprolla@gmail.com

Abstract

Portuguese immigration to Brazil occurred in several waves and greatly contributed to the genetic composition of current Brazilian population. In this study, we evaluated the frequency of a Portuguese founder Alu insertion in *BRCA2* exon 3 (c.156_157insAlu) among individuals fulfilling HBOC criteria in 1,380 unrelated families originated from three distinct Brazilian States. We identified the c.156_157insAlu *BRCA2* mutation in nine (0.65%) families. In probands with the *BRCA2* rearrangement, the European ancestry proportion was the most frequent (80%), followed by the African (10%). Although the haplotype was not informative for three families, the remaining six presented a haplotype compatible with the Portuguese ancestral haplotype. In conclusion, the present study reports a low albeit relevant frequency of the Portuguese founder mutation in at-risk for HBOC Brazilian population.

Capítulo VII – Artigo 4

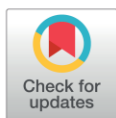
***BRCA1* and *BRCA2* mutational profile and prevalence in Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: are international testing criteria appropriate for this specific population?**

Artigo publicado na revista *PlosOne*, 2017 Nov 21; 12(11):e0187630

RESEARCH ARTICLE

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?

Bárbara Alemar^{1,2}, Cleandra Gregório^{1,2}, Josef Herzog³, Camila Matzenbacher Bittar^{1,2}, Cristina Brinckmann Oliveira Netto⁴, Osvaldo Artigalas⁵, Ida Vanessa D. Schwartz^{4,6}, Jordy Coffa⁷, Suzi Alves Camey⁸, Jeffrey Weitzel³, Patricia Ashton-Prolla^{1,2,4,6*}



1 Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **2** Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **3** Department of Population Sciences, Division of Clinical Cancer Genomics, City of Hope, Duarte, California, United States of America, **4** Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **5** Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **6** Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, **7** MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands, **8** Programa de Pós-graduação em Epidemiologia, Departamento de Estatística, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

* pprolla@gmail.com

OPEN ACCESS

Citation: Alemar B, Gregório C, Herzog J, Matzenbacher Bittar C, Brinckmann Oliveira Netto C, Artigalas O, et al. (2017) *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 12(11): e0187630. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187630>

Editor: Amanda Ewart Toland, Ohio State University Wexner Medical Center, UNITED STATES

Received: August 6, 2017

Accepted: October 23, 2017

Published: November 21, 2017

Copyright: © 2017 Alemar et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: We cannot deposit our deep sequencing data in a public repository since we did not obtain consent from the patients submitted to deep sequencing to submit all of their data. Since this data contain sensitive patient information, our Research Ethics Committee (the Institutional Review Board from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre) has imposed this

Abstract

Background

Germline pathogenic variants in *BRCA1* and *BRCA2* (*BRCA*) are the main cause of Hereditary Breast and Ovarian Cancer syndrome (HBOC).

Methods

In this study we evaluated the mutational profile and prevalence of *BRCA* pathogenic/likely pathogenic variants among probands fulfilling the NCCN HBOC testing criteria. We characterized the clinical profile of these individuals and explored the performance of international testing criteria.

Results

A pathogenic/likely pathogenic variant was detected in 19.1% of 418 probands, including seven novel frameshift variants. Variants of uncertain significance were found in 5.7% of individuals. We evaluated 50 testing criteria and mutation probability algorithms. There was a significant odds-ratio (OR) for mutation prediction ($p \leq 0.05$) for 25 criteria; 14 of these had $p \leq 0.001$. Using a cutoff point of four criteria, the sensitivity is 83.8%, and the specificity is 53.5% for being a carrier. The prevalence of pathogenic/likely pathogenic variants for

limitation. We do have consent to submit data on specific clinically significant or potentially significant variants, and that information has been made available within the paper and its Supporting Information files. Additional data requests can be addressed to: Comitê de Ética em Pesquisa (Research Ethics Committee), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP (zip code) 90035-003, Phone +55 51 33598304.

Funding: This work was supported in part by a grant from the Breast Cancer Research Foundation, Avon grant #02-2013-044 (JW), and National Institute of Health/National Cancer Institute grant #RC4 CA153828-01 (JW) for the Clinical Cancer Genomics Community Research Network. Support in part was provided by grants from Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE) from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (PAP) and by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (BA). PAP is a researcher from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Brazil) and BA and CG received a grant from the same agency. Funding agencies had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. One of the authors (Jordy Coffa) is employed by a commercial company (MRC-Holland) and we declare that "The funder provided support in the form of salaries for authors (JC), but did not have any additional role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. The specific roles of these authors are articulated in the 'author contributions' section."

Competing interests: JC is employed by a commercial company (MRC-Holland) and this does not alter our adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

each criterion ranged from 22.1% to 55.6%, and criteria with the highest ORs were those related to triple-negative breast cancer or ovarian cancer.

Conclusions

This is the largest study of comprehensive *BRCA* testing among Brazilians to date, and the first to analyze clinical criteria for genetic testing. Several criteria that are not included in the NCCN achieved a higher predictive value. Identification of the most informative criteria for each population will assist in the development of a rational approach to genetic testing, and will enable the prioritization of high-risk individuals as a first step towards offering testing in low-income countries.

Introduction

Breast cancer is the most prevalent cancer among women, with about 5–10% of all cases caused by inherited germline pathogenic variants in cancer predisposition genes [1]. *BRCA1* and *BRCA2* (collectively named *BRCA* hereafter) are the main genes causing hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC), and are also associated with an increased risk of prostate and pancreatic cancers [2]. Pathogenic variants in the *BRCA* genes are the most powerful predictors of developing breast and ovarian cancer, with a 40–80% lifetime risk of developing breast cancer, and 11–50% of developing ovarian cancer, respectively [3]. HBOC patients may benefit from risk-reducing surgery (mastectomy and salpingo-oophorectomy), chemoprevention and enhanced surveillance approaches [4], therefore identification of carriers is crucial for cancer prevention and control. Thus, genetic cancer risk assessment (GCRA) and genetic testing should be an option for patients whose personal and/or family history is suggestive of HBOC syndrome [5].

Brazilian individuals with suspected HBOC syndrome have limited access to GCRA and genetic testing, which has only become available recently for patients with private health insurance. The majority (about 70%) of the population relies on the public health care system, wherein genetic counseling is only available in a few reference centers and genetic testing is not offered [6]. In addition, only a few studies reported on comprehensive *BRCA* variant screening [7–10]. Finally, while international criteria (i.e. NCCN-based), have been routinely used to identify candidates for genetic testing in Brazil, there has been no assessment of the performance of these criteria in this specific population.

Although there are similarities among *BRCA* testing criteria worldwide, there is no consensus and it is reasonable to hypothesize that the prevalence of pathogenic variants will differ according to the population being studied and the testing criteria used [11]. The purpose of this study was to evaluate the prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* pathogenic/likely pathogenic variants and clinical profiles of individuals fulfilling the NCCN HBOC testing criteria in Southern Brazil with the aim of assessing the performance of these and other widely used international testing criteria in this specific population.

Materials and methods

Subjects and ethical aspects

Study subjects were recruited in the city of Porto Alegre, Southern Brazil, from cancer genetics clinics in Hospital de Clínicas de Porto Alegre (a public general hospital) and private health

care offices. All participants were unrelated and had to fulfill *BRCA* testing criteria according to the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines (version 2.2014) for inclusion in the study. The fulfillment of NCCN HBOC criteria was assessed through independent review of all pedigrees by at least two of the authors. This project was approved by the Institutional Review Board from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre and all individuals provided written or verbal consent for *BRCA* testing and all participants received pre- and post-test genetic counseling. Since our sequencing data contain sensitive patient information, and patients did not consent to full disclosure of all sequencing information, we have some ethical limitations regarding the raw data access. Specific data requests can, however, be analyzed in a case-by-case basis, and might be available upon request.

Clinical data and pedigrees

The family history of each participant was recorded, including first-, second- and third-degree relatives on both the maternal and paternal sides of the family, and spanning at least three generations. Confirmation of the personal and family history of cancer was attempted in all cases, through pathology and medical reports as well as death certificates. Clinical data (gender, birthplace, age at cancer diagnosis, tumor type, immunohistochemistry and histology data) were obtained from a review of medical records. For cases in which the age at diagnosis was unavailable, it was conservatively estimated to be older than 60 years. Both lineages were assessed and all pedigrees were evaluated in a single lineage (maternal or paternal), unless there was explicit information on patient adoption. Otherwise, unless specified by the guideline, pedigrees were restricted to three generations. Fallopian tube and primary peritoneal cancers were included as ovarian cancers, and both invasive and *in situ* breast carcinomas were included.

Geographic distribution of proband's birthplaces were analyzed in R using the packages *maptools* and *maps*, version 3.2.3 (<https://www.R-project.org/>) [12], along with geographic coordinates obtained from Google Maps (google.com.br/maps).

Genetic testing

Whenever possible, the initial testing was carried out in a family member with breast or ovarian cancer (affected individuals). However, in some families, only an unaffected individual (or an individual with a diagnosis other than breast and/or ovarian cancer) was available for testing. Sequencing analysis of the entire coding region of the *BRCA1* and *BRCA2* genes and intron-exon junctions was performed in all cases, either using next generation sequencing (NGS) or Sanger sequencing. Probands tested at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) were sequenced either by Sanger dye terminator sequencing or NGS on the Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) platform. Sequencing on the PGM was carried out according to the manufacturer's instructions using the Ion AmpliSeq *BRCA1* and *BRCA2* Community Panel and Ion AmpliSeq Library kit 2.0. All VUS or likely pathogenic/pathogenic variants identified by NGS in these patients were confirmed by Sanger sequencing. Large genomic rearrangement testing (LGR) of both *BRCA1* and *BRCA2* was done in the majority of probands. All probands tested at HCPA, and those tested in commercial laboratories with Sanger sequencing were evaluated by Multiplex Ligation-Dependent probe Amplification (MLPA), carried out using MRC-Holland commercial kits for *BRCA1* (SALSA MLPA P002-D1) and *BRCA2* (SALSA MLPA P045-B3) according to the manufacturer's instructions. Multiplex PCR amplified products were separated by capillary gel electrophoresis in an ABI 3500 Genetic Analyzer. Information on copy number was analyzed with Coffalyser Software (MRC-Holland, <http://www.mrc-holland.com/>). Identified rearrangements were confirmed in an

additional independent experiment, performed with confirmatory kits using different probes: SALSA MLPA P087 for *BRCA1* and SALSA MLPA P077 for *BRCA2*. Proband recruited from private genetic counseling clinics which had genetic testing done by NGS were all tested also by MLPA if the NGS platform did not allow LGR detection. In cases tested with a NGS workflow that allowed the detection of LGR, all identified LGR were confirmed by MLPA. *BRCA* sequencing results (single nucleotide variants and small insertions and deletions only, not including any clinical data or clinical comparisons) of 193 cases were previously published [13].

In silico analyses

In order to estimate the impact of variants of uncertain significance on protein structure, function and evolutionary conservation, we used three different predictors: PredictSNP [14], which combines the results of six prediction tools (MAPP, PhD-SNP, Poly-Phen1, Poly-Phen2, SIFT), AlignGVGD, [15] and MutationTaster [16].

Variants were named following Human Genome Variation Society (HGVS) nomenclature guidelines. The biological significance of all variants were assessed using the databases: ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>), BRCA Share (formerly known as UMD; <http://www.umd.be>), LOVD (<http://databases.lovd.nl/shared/genes>), ARUP (<http://arup.utah.edu/database/BRCA>) and BRCA Exchange (<http://brcaexchange.org>). Novel variants were classified according to the ACMG [17] guidelines. The population databases 1000 Genomes [18] (<http://www.internationalgenome.org/>), ExAC [19] (<http://exac.broadinstitute.org/>), FLOSSIES (<https://whi.color.com>) and AmbryShare (<https://share.ambrygen.com>) were consulted to evaluate the population frequency of variants of uncertain significance with full knowledge that the Brazilian population is vastly underrepresented in these databases. All likely pathogenic variants were considered with pathogenic variants (and collectively named “pathogenic variants” hereafter) for analysis of selection criteria, as is standard practice in GCRA.

Testing criteria

Pedigrees were evaluated for the fulfilment of several different *BRCA* testing criteria, including National Comprehensive Cancer Network (NCCN)[20] criteria, the American Society of Clinical Oncology (ASCO) [21, 22], American Society of Breast Surgeons (ASBS) [23], Society of Gynecologic Oncology (SGO) [24], Spanish Society of Medical Oncology (SEOM) [25], The Institute of Cancer Research (ICR; NHS Foundation Trust) [26] and the Brazilian National Supplementary Health Insurance Agency (ANS) [27], which uses NCCN-based testing criteria and provides access to genetic testing for patients with private health insurance only. As some of the guidelines have overlapping criteria, in total we analyzed 50 distinct criteria. We used additional tools to assess predicted pathogenic variant prevalence or empiric prior probabilities of carriage of pathogenic variants, such as the Manchester [28] and PennII [29] models and the Myriad Mutation Prevalence Tables [30]. To dichotomize the values provided by these models, we set 10% as a minimum probability of being a carrier as a determinant criteria to offer genetic testing, based on the widely accepted ASCO guidelines [21]. All testing criteria, references and specifications are summarized in S1 Table.

Statistical analysis

Fisher’s exact test was used to determine if there was a significant association between the presence of a pathogenic variant and clinical and pathologic features. Logistic regression was used to determine the odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs). The OR value was used to evaluate the association of each criteria with carrier status.

Receiver operating characteristic (ROC) curves and area under the curve (AUC) was used to determine how many criteria should be fulfilled to predict mutation, and we used 3 different criteria sets: 1) considering all evaluated criteria; 2) only criteria with $p \leq 0.05$ on OR analysis; and 3) only criteria with $p \leq 0.001$ on the same analysis. The cut point was chosen to reach maximum sensitivity and specificity, considering the value of sensitivity $> 70\%$.

The Mann–Whitney test was used to evaluate the difference between ages at diagnosis. All statistical tests were 2-sided. All analyses were performed using Statistical Product and Service Solutions (SPSS) software version 18.0 (IBM).

Results

Clinical features of the cohort

A total of 418 unrelated probands were enrolled in this study. All participants were recruited in Porto Alegre, the southernmost capital of Brazil. As depicted in Fig 1, 94.6% of individuals were born in the Southern region of Brazil. Eight probands had non-Brazilian nationalities including: Uruguay (3), the Republic of Armenia, Colombia, China, Russia and Romania (1 each). Most individuals were breast cancer (BC) affected women ($N = 330$, 79%), while only 37 (8.8%) had been diagnosed with ovarian cancer (OC). Fifty-four (13%) individuals were not affected by cancer, but fulfilled NCCN testing criteria. The mean age at diagnosis was 41.6 (standard deviation, SD = 10.5) years for BC and 45.3 (SD = 13.9) years for OC patients. Among patients with bilateral BC (14 synchronous and 27 metachronous primaries), the mean age at diagnosis was 43.1 (SD = 11.4) and 49.0 (SD = 13.3) years for the first and second tumors, respectively. The characterization of tumor types, ethnicity, BC receptor status, BC and OC histology and age at diagnosis are summarized in Table 1.

Pathogenic variants identified in BRCA1 and BRCA2

Almost half of all BRCA testing was performed in Brazil (48.8%), with the remaining tests performed in the United States of America (50.5%), Canada, Spain, and Switzerland (collectively 0.7%). For BRCA sequencing, NGS was the method of choice to sequence 88.3% (369/418) of all patients, and the entire coding region of both genes was covered for all probands (data not shown).

Eighty-three pathogenic variants in the BRCA1 and/or BRCA2 genes were identified in 80 of the 418 probands (19.1%). When only cancer affected probands are considered the prevalence of pathogenic variants rises to 20%, while among cancer unaffected probands with a suspicious family history (i.e. a family history characterized by the presence of specific cancer types and ages, leading to the suspicion of hereditary breast and ovarian cancer syndrome, according to HBOC-NCCN criteria), the prevalence was close to 13%. Among breast and ovarian cancer patients the detection rate of pathogenic variants was 19.7% and 37.8%, respectively.

Fig 2 depicts the 83 pathogenic variants identified in this cohort, corresponding to 56 unique pathogenic variants carried by 80 probands. In BRCA1, four distinct LGR and 28 different pathogenic SNVs and small insertions and deletions (indels) were identified in 51 probands, representing 61.4% of all pathogenic variants found in the study. In BRCA2, only one LGR was identified (the Portuguese founder pathogenic variant c.156_157insAluYa5) and 23 distinct pathogenic SNV/indels were found in 31 probands. Of interest, two double heterozygotes (DH), carrying one BRCA1 and one BRCA2 pathogenic variant were identified. The first patient was heterozygous for BRCA1 c.4357+1G>T and BRCA2 c.6405_6409delCTTAA, while the second patient was heterozygous for a BRCA1 LGR (deletion of exons 4–6) and BRCA2 c.9004G>A. In addition, we identified a patient carrying two heterozygous BRCA2 pathogenic variants (c.8878C>T and c.9699_9702delTATG). All pathogenic variants identified, along

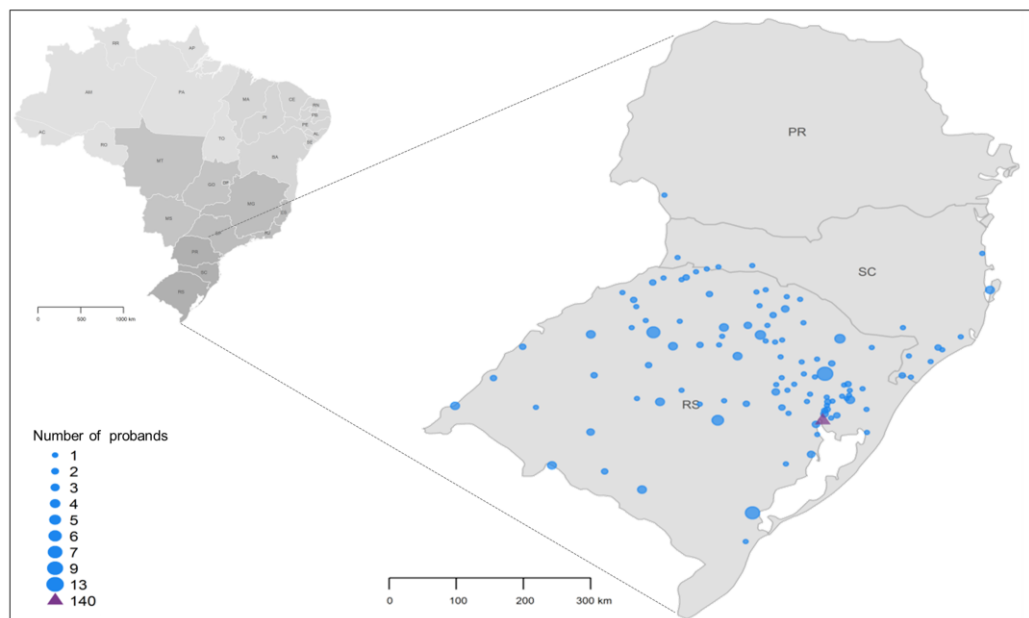


Fig 1. Geographic distribution of probands included in this study in the southern region of Brazil. The size of the dots corresponds to the number of probands from each location. The purple triangle represents the State's capital, Porto Alegre, from which 140 probands derive. RS, Rio Grande do Sul; SC, Santa Catarina; PR, Paraná.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187630.g001>

with their predicted protein sequences and associated personal history of cancer are described in [S2 Table](#).

Complete *BRCA1* and *BRCA2* LGR analysis was done for 340 (81.3%) probands, and a total of 336 (98.8%) individuals had a wild type result. Forty-eight probands with a pathogenic variant detected by sequencing, and 19 probands with a wild type (WT) sequencing result chose not to proceed with LGR testing. In 11 probands, LGR testing was incomplete, including only *BRCA1* or five specific *BRCA1* rearrangements (3.8 kb deletion in exon 13, 510 kb deletion in exon 22, 7.1 kb deletion in exons 8–9, 26 kb deletion in exons 14–20, and a 6 kb insertion in exon 13).

In eight probands, seven unique novel frameshift variants were identified: c.2250dupC (p.Met751Hisfs), c.2910dupA (p.His971Thrfs), c.4663delA (p.Arg1555Glyfs) and c.4736_4739delCTTC (p.Pro1579Leufs) in *BRCA1*; and c.2505dupA (p.Pro836Thrfs), c.7580_7583dupTAGG (p.Gly2529Argfs, in two probands) and c.9282_9397del (p.Asp3095Argfs) in *BRCA2*. These variants were not previously described in the literature nor are they present in the ClinVar, BRCAShare, ARUP/BRCA, KConFab, LOVD and BRCA Exchange databases. Considering all available evidence and the ACMG[17] guidelines, all novel variants were classified as likely pathogenic.

Clinical features in carriers of pathogenic variants and non-carriers

We compared clinical features between probands with and without pathogenic variants. As described in [Table 1](#), there were no statistically significant differences between these two

Table 1. Clinical and pathologic features in BRCA1 and BRCA2 carriers of pathogenic variants and non-carriers.

	All participants (N = 418)		Carriers of pathogenic variants (N = 80)		Non-carriers* (N = 338)		P-value
	N	%	N	%	N	%	Carriers vs Non-carriers
Gender							
Female	408	97.6	78	97.5	330	97.6	1.00
Male	10	2.4	2	2.5	8	2.4	
Birthplace^a							
Brazil	365	97.9	70	98.6	295	97.7	0.419
Southern Brazil	353	94.6	66	93.0	287	95.0	
Others	12	3.2	4	5.6	8	2.6	
Other countries	8	2.1	1	1.4	7	2.1	
Cancer affected							
Breast cancer only	319	76.3	59	73.8	260	76.9	0.030
Single tumor	255	61.0	45	56.3	210	62.1	
Bilateral	41	9.8	11	13.8	30	8.9	
Ipsilateral	17	4.1	2	2.5	15	4.4	
Male	6	1.4	1	1.2	5	1.5	
Ovarian cancer only	26	6.2	8	10.0	18	5.3	
Breast and ovarian cancer	11	2.6	6	7.5	5	1.5	
Other ^b	8	1.9	0	0.0	8	2.4	
Cancer unaffected	54	13.0	7	8.7	47	13.9	
Ashkenazi Jewish ethnicity							
Yes	13	3.1	5	6.3	8	2.4	0.082
No	405	96.9	75	93.7	330	97.6	
Breast cancer receptor status^c							
TNBC	78	29.8	34	59.7	44	21.5	<0.0001
HR-positive/ HER2-negative	139	53.0	20	35.0	119	58.0	
HR-negative/ HER2-positive	17	6.5	3	5.3	14	6.8	
HR-positive/ HER2-positive	28	10.7	0	0	28	13.7	
Histology of breast cancer^d							
IDC	210	72.4	48	87.3	162	68.9	0.047
DCIS	19	6.6	0	0.0	19	8.0	
ILC	19	6.6	1	1.8	18	7.7	
LCIS	3	1.0	0	0.0	3	1.3	
IDC + ILC	6	2.0	0	0.0	6	2.6	
Other	33	11.4	6	10.9	27	11.5	
Histology of ovarian cancer							
Serous	10	38.5	6	75.0	4	22.2	0.026
Non-serous	16	61.5	2	25.0	14	77.8	
Age at diagnosis (years)^e							
Breast cancer	41.6 (10.5)		39.7 (10.3)		42.1 (10.5)		
Single tumor	40.8 (9.8)		40.3 (10.2)		40.9 (9.7)		
Bilateral ^f	43.1 (11.4)		35.3 (8.8)		46.0 (11.0)		
Ipsilateral ^f	43.6 (12.2)		38.5 (0.7)		44.3 (12.9)		

(Continued)

Table 1. (Continued)

		All participants (N = 418)		Carriers of pathogenic variants (N = 80)		Non-carriers* (N = 338)		P-value
		N	%	N	%	N	%	
	Male	60.5	(13.8)	64.0	(0.0)	59.8	(15.3)	Carriers vs Non-carriers
	Ovarian cancer	45.3	(13.9)	47.9	(8.7)	44.2	(15.8)	
	Other	47.4	(9.7)	-		47.4	(9.7)	

TNBC, triple-negative breast cancer; HR, hormonal receptor; IDC, invasive ductal carcinoma; DCIS, ductal carcinoma *in situ*; ILC, invasive lobular carcinoma; LCIS, lobular carcinoma *in situ*.

* Non-carrier group is composed of WT individuals and VUS carriers.

(a) Birthplace data was missing for 45 individuals

(b) Other tumors are: endometrial cancer (1), colorectal cancer (1), renal clear cell carcinoma (1), thyroid cancer (1), pancreatic cancer (2) and melanoma (2)

(c) Receptor status data was not available for 68 breast cancer patients

(d) Histology data was not available for 40 patients. In (c) and (d) only the status of the first tumor was considered

(e) Patients diagnosed with both breast and ovarian cancer were excluded from this analysis

(f) Only the age at the first diagnosis was considered.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187630.t001>

groups with regards to gender, birthplace and ethnicity. Regarding tumor type, carriers were more frequently affected by both breast and ovarian cancer than non-carriers ($p = 0.03$). As expected, triple negative breast cancer was more common in carriers, while triple positive tumors were more common in non-carriers ($p < 0.0001$). The proportion of different breast cancer subtypes was different between groups, with invasive ductal carcinoma (IDC) more common in carriers when compared to non-carriers. Finally, serous ovarian cancers were also more common among carriers, while most non-carriers had other ovarian cancer histologies ($p = 0.026$).

Variants of uncertain significance (VUS) identified

Variants of uncertain significance were found in 24 of the 418 probands included in this study (5.7%), including 5 distinct VUS in *BRCA1*, and 18 in *BRCA2* (Table 2). Most were missense variants (73.9%), followed by intronic (17.4%) and synonymous variants (8.7%). Three *BRCA2* VUS (c.1680T>C, c.6271A>G and c.9502-45G>T) were novel and another three (c.2183A>C, c.7007+53G>A and c.9502-40T>A, also in *BRCA2*) were described only in BRCA Exchange, but without any classification. The latter three VUS were present in at least one population database at very low frequencies (< 0.0002). None of the VUS identified have been described in the FLOSSIES database (composed of ~10,000 women older than age 70 years who have never had cancer), AmbryShare, or ARUP/BRCA databases. None of the VUS were co-occurring with pathogenic variants and although MutationTaster suggested that all intronic and silent variants were likely tolerated, one *BRCA1* (c.5242G>C) and two *BRCA2* (c.9227G>A and c.9227G>T) missense variants were classified as deleterious using all three predictors (AlignGVGD, MutationTaster and PredictSNP).

Performance of different genetic testing criteria

Altogether, we evaluated 50 distinct criteria for genetic testing (all published in international guidelines), in addition to the scores of commonly used pathogenic variant prediction tools

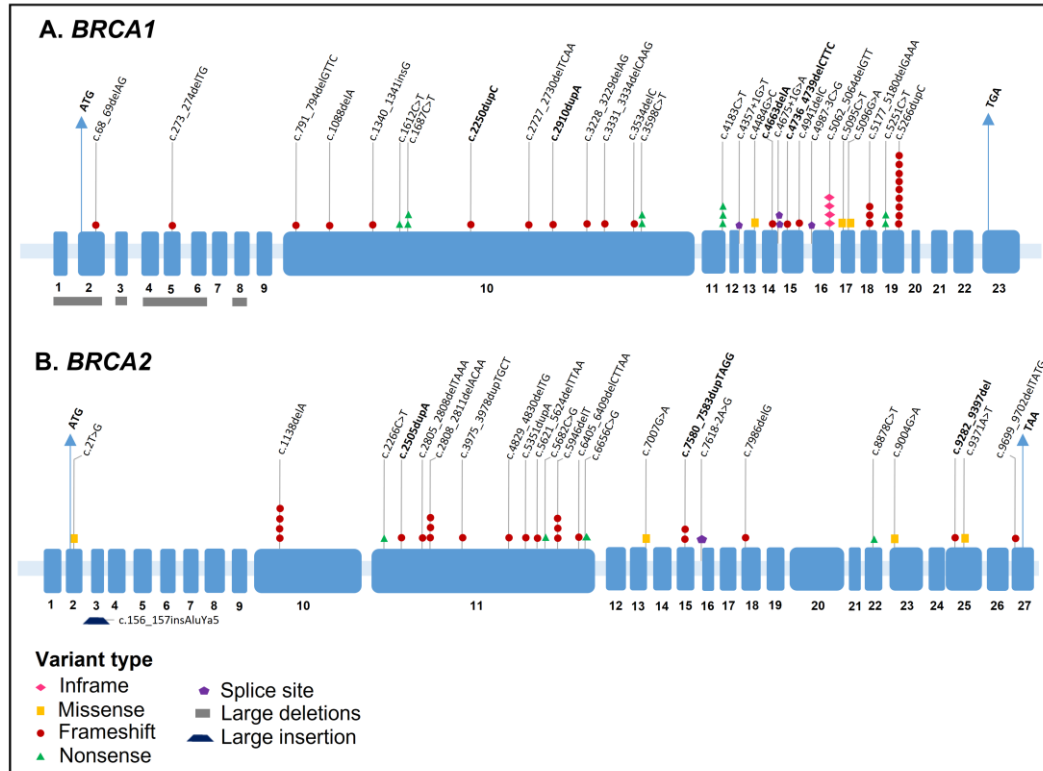


Fig 2. Diagrams of the BRCA1 and BRCA2 genes, indicating the position of pathogenic variants identified among all 418 individuals tested. Exons are indicated by blue boxes and numbered according to the Locus Reference Genomic (LRG) description. Different symbols represent the type of variant, and each symbol indicates one germline carrier. Novel variants, described here for the first time are in bold. The ATG sites and termination codons of both genes are indicated by arrows.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187630.g002>

(PennII and Manchester models and Myriad Mutation Prevalence tables, using 10% as cutoff point), for a total of 54 criteria (S1 Table). Among these, 25 criteria reached a statistically significant odds-ratio of carrying a pathogenic variant ($p \leq 0.05$) and the prevalence of pathogenic variants varied significantly among these criteria, from 22.1% to 55.6%, as depicted in Table 3. Criteria with the highest ORs were those related to triple-negative breast cancer or ovarian cancer. Women with both breast and non-mucinous ovarian cancer have 5.4 times the chance of carrying a pathogenic variant, compared to individuals without this phenotype. Patients with both breast and ovarian primary tumors had a 54.5% chance of carrying a BRCA pathogenic variant. It is noteworthy that 17.4% of all carriers with an early onset BC (≤ 45 years) had no family history of breast or ovarian cancer. Among early-onset BC patients without bilateral and/or triple-negative tumor and without a family history of cancer ($n = 31$), the prevalence of pathogenic variants was 6.5%. Also, two VUS carriers belong to this group.

ROC curve analyses performed with all 54 criteria demonstrated that the presence of ten or more distinct criteria had 76.3% of sensitivity and 58.6% specificity (AUC 0.739; 95%CI 0.479–

Table 2. Classification of the variants of uncertain significance (VUS) found in our cohort according to different databases and their effects as predicted by *in silico* models.

HGVS name	Molecular consequence	ClinVar	dbSNP	BRCAShare	AlignGVGD	MutationTaster	PredictSNP
BRCA1							
c.1258G>T (p.Asp420Tyr)	Missense variant	Conf. Int. ^a	rs80357488	VUS	C15	Polymorphism	Deleterious
c.2763G>A (p.Gln921 =)	Silent variant	LB	ND	VUS	NA	Polymorphism	NA
c.3868A>G (p.Lys1290Glu)	Missense variant	VUS	rs80357254	ND	C0	Disease causing	Neutral
c.4724C>A (p.Pro1575His)	Missense variant	VUS	rs80357052	VUS	C0	Polymorphism	Deleterious
c.5242G>C (p.Gly1748Arg)	Missense variant	VUS	rs397507245	ND	C65	Disease causing	Deleterious
BRCA2							
c.67+62T>G	Intronic variant	VUS	rs11571574	ND	NA	Polymorphism	NA
c.710A>G (p.Asp237Gly)	Missense variant	VUS	rs730881506	ND	C0	Polymorphism	Neutral
c.1244A>G (p.His415Arg)	Missense variant	VUS	rs80358417	VUS	C0	Polymorphism	Neutral
c.1680T>C (p.Asn560 =)	Silent variant	ND	ND	ND	NA	Polymorphism	NA
c.2183A>C (p.Asp728Ala)	Missense variant	ND	ND	ND	C0	Polymorphism	Neutral
c.3321A>C (p.Gln1107His)	Missense variant	VUS	rs397507306	ND	C15	Disease causing	Deleterious
c.4477G>C (p.Glu1493Gln)*	Missense variant	VUS	rs398122782	ND	C0	Polymorphism	Deleterious
c.4627A>G (p.Lys1543Glu)	Missense variant	VUS	rs786204239	ND	C0	Polymorphism	Neutral
c.6271A>G (p.Ser2091Gly)	Missense variant	ND	ND	ND	C0	Polymorphism	Neutral
c.6467C>T (p.Ser2156Phe)	Missense variant	VUS	rs765575482	VUS	C0	Polymorphism	Deleterious
c.6988A>G (p.Ile2330Val)	Missense variant	VUS	rs876661032	ND	C0	Polymorphism	Neutral
c.7006C>T (p.Arg2336Cys)	Missense variant	Conf. Int. ^b	rs431825347	VUS	C0	Polymorphism	Neutral
c.7007+53G>A	Intronic variant	ND	rs56014558	ND	NA	Polymorphism	NA
c.9227G>A (p.Gly3076Glu)	Missense variant	Conf. Int. ^c	rs80359187	ND	C65	Disease causing	Deleterious
c.9227G>T (p.Gly3076Val)	Missense variant	VUS	rs80359187	ND	C65	Disease causing	Deleterious
c.10250A>G (p.Tyr3417Cys)	Missense variant	Conf. Int. ^d	rs730881600	ND	C0	Polymorphism	Deleterious
c.9502-40T>A**	Intronic variant	ND	rs563731281	ND	NA	Polymorphism	NA
c.9502-45G>T**	Intronic variant	ND	ND	ND	NA	Polymorphism	NA

ND, not described; NA, not applicable; LB, likely benign; Conf. Int, conflicting interpretations of pathogenicity in ClinVar:

(a) likely benign (2 submitters); VUS (2 submitters)

(b) likely benign (1 submitter); VUS (3 submitters)

(c) likely pathogenic (1 submitter); VUS (4 submitters)

(d) likely benign (1 submitter); VUS (1 submitter). Variants for which all three *in silico* tools predicted a deleterious effect are shown in bold.

(*) the variant c.4477G>C was found in two individuals.

(**) both variants were found in the same individual. AlignGVGD classifies each variant from C65 (most likely to interfere with function) to C0 (least likely).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187630.t002>

0.799) for harboring a pathogenic variant. Considering this cutoff, we found that an individual above it has 4.8 times (95%CI 2.64–8.79) the chance of carrying a pathogenic *BRCA* variant, compared to an individual who fulfills less than 10 of the criteria included here. Indeed, among all individuals fulfilling ≥ 10 criteria, 28.9% carried a pathogenic variant, while those individuals who fulfilled < 10 criteria had only a 7.8% chance of carrying a pathogenic variant.

We repeated this analysis considering only criteria with a statistically significant ($p \leq 0.05$) OR, and found that at a cutoff point of six or more criteria, the sensitivity and the specificity for being a carrier of a pathogenic variant is 75% and 60.7%, respectively (AUC 0.773; 95%CI 0.717–0.830).

Fourteen clinical criteria had a highly statistical significant odds-ratio ($p \leq 0.001$) for being a carrier of a pathogenic variant. All carriers of pathogenic variants identified fulfilled at least one of those criteria. In addition, the prevalence of pathogenic variants was directly

Table 3. Performance of testing criteria with significant odds ratios.

Criteria #	Testing criteria	Reference	Prevalence of pathogenic variants(%)*	OR	95% CI	P
52	Familial PennII Score ≥ 10	18	22.1	7.643	1.822–32.062	<0.001
39	Family with sister pair with BC and OC, both diagnosed < 50y	9	55.6	5.567	1.460–21.226	0.015
53	Myriad Table Score ≥ 10	19	35.9	5.553	3.262–9.455	<0.001
44	Family with 2 BC and/or OC, and at least 1 OC	14	49.1	5.546	3.010–10.219	<0.001
11	Personal history of BC and non-mucinous OC	15	54.5	5.400	1.605–18.168	0.008
35	Family with ≥ 2 BC and ≥ 1 OC at any age	9	48.9	5.195	2.717–9.932	<0.001
10	Personal history of triple negative BC diagnosed ≤ 60 y	10, 11, 12, 13, 16	44.2	5.014	2.871–8.756	<0.001
9	Personal history of triple negative BC	15	43.6	4.881	2.8–8.509	<0.001
23	Personal history of BC at any age and ≥ 1 close relative with OC	11, 13, 16	46.2	4.382	2.207–8.701	<0.001
13	Personal history of non-mucinous OC	15	46.7	4.229	1.482–12.067	0.01
54	Manchester Score ≥ 10	17	22.5	4.014	1.685–9.563	<0.001
36	Family with ≥ 3 BC diagnosed < 50 y	9	40.0	3.595	1.993–6.486	<0.001
50	Personal history of BC and relatives with cancer and Manchester Score ≥ 15	15	31.1	3.502	2.105–5.824	<0.001
51	Individual PennII Score ≥ 10	18	22.6	3.345	1.479–7.564	0.002
40	Family history of OC (non-mucinous)	12	38.3	3.282	1.815–5.936	<0.001
42	Family with ≥ 3 BC and/or OC	14	28.4	2.935	1.764–4.881	<0.001
12	Personal history of epithelial OC	10, 11, 12, 13, 16	37.8	2.905	1.421–5.941	0.007
46	Family with 2 BC: one bilateral and the other diagnosed < 50 y	14	37.1	2.787	1.337–5.810	0.011
37	Family with sister pair with BC, both diagnosed < 50y	9	34.5	2.613	1.405–4.858	0.003
6	Personal history of bilateral BC, both diagnosed < 60 y	15	35.5	2.535	1.161–5.532	0.029
45	Family with 2 BC diagnosed < 50 y	14	28.7	2.509	1.528–4.119	<0.001
21	Personal history of BC at any age and ≥ 1 close relative with BC diagnosed ≤ 50 y	11, 13, 16	27.4	2.395	1.459–3.933	0.001
19	Personal history of BC and a relative with BC, both diagnosed < 50y	15	29.9	2.258	1.332–3.827	0.003
22	Personal history of BC at any age and ≥ 2 close relative with BC at any age	11, 13, 16	27.3	2.123	1.292–3.489	0.004
8	Personal history of BC diagnosed ≤ 50 y and a limited family history ^a	11, 13, 16	28.0	1.908	1.090–3.340	0.028

The fourteen most significant criteria are in bold ($P \leq 0.001$). BC, breast cancer; y, years; OC, ovarian cancer

*Percentage of individuals fulfilling the criteria and carrying a pathogenic variant.

(a) "Unknown" or "limited family history" applies to individuals with a unknown history or a family with fewer than two first- or second-degree female relatives living beyond age 45.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187630.t003>

proportional to the number of these 14 criteria that were fulfilled (S1 Fig). Considering only these 14 criteria, ROC curve analysis showed that at a cutoff point of four or more criteria, the sensitivity is 83.8%, and the specificity is 53.5% (AUC 0.776; $p \leq 0.001$) for being a carrier of a pathogenic variant. The chance of carrying a pathogenic variant among probands fulfilling ≥ 4 of the 14 criteria is 5.8 times the chance of an individual with less than four of these criteria ($p \leq 0.001$, 95%CI 3.12–11.03). The ROC curves of all three criteria sets are depicted in Fig 3.

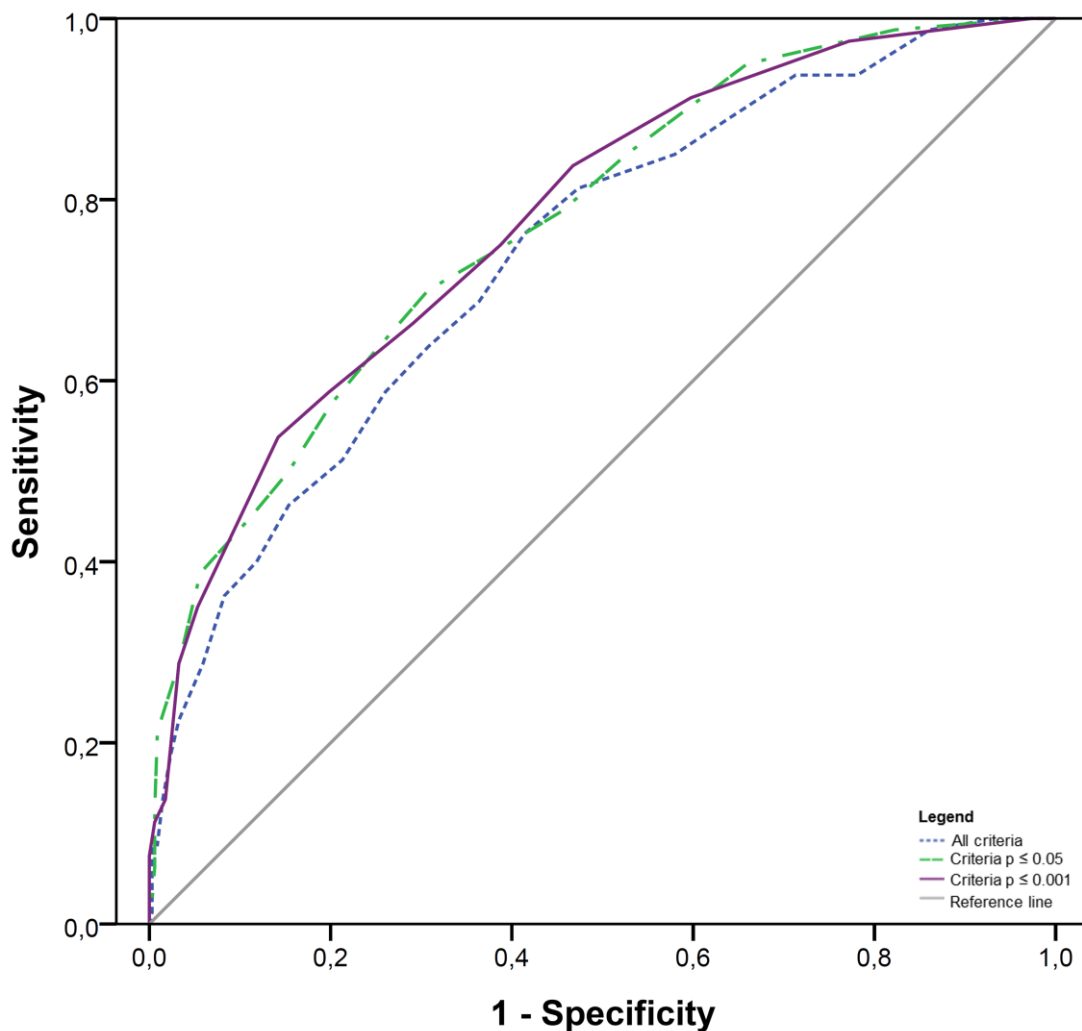


Fig 3. Performance of three distinct criteria sets. Considering all criteria (N = 54, dashed blue line); considering only criteria with $p \leq 0.05$ in the OR analysis (N = 25, dashed green line); and considering only criteria with $p \leq 0.001$ in the same analysis (N = 14, solid purple line).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187630.g003>

It is well known that in a context of low resources there may be a lack of clinically relevant data, as hormone receptor and HER2 status, as well as a detailed family history. Considering this scenario, a ROC curve was used to evaluate the sensitivity of a set of criteria relying only on proband diagnosis, age of onset and limited family history. Using a total of 11 distinct criteria, we show that these criteria were not good predictors of being a carrier of pathogenic variant (AUC 0.580; 95%CI 0.509–0.652, data not shown). Indeed, at a cutoff point of two or more

criteria, the sensitivity and specificity of being a carrier of a pathogenic variant are 66.3% and 41.4%, respectively.

Discussion

The identification of a carrier of a pathogenic variant in *BRCA1* or *BRCA2* can significantly impact their medical management, as well as that of at-risk family members, since several cancer risk-reducing strategies are available. In addition, true negative results from cascade testing for relatives of a known carrier provides reassurance and allows application of general population screening guidelines, thereby avoiding unnecessary and costly screening tests and reducing anxiety related to cancer risk. The majority of at-risk individuals in Brazil (the ~70% of the population that relies on the public health care system) do not have access to genetic testing. Thus, national as well as regional molecular profiles of families with the HBOC phenotype have remained largely unknown. Although studies involving Brazilian subjects have been published, most did not include sequencing of the entire coding region and rearrangement testing of both *BRCA1* and *BRCA2* [13, 31]. In addition, many are focused on a specific population and/or involve small cohorts [7–10]. To the best of our knowledge, this is the largest Brazilian study with comprehensive *BRCA* testing to date. It is also the first to evaluate the performance of international testing criteria in this Southern Brazilian population.

In agreement with other studies [32], our data suggests that age at diagnosis (especially for breast cancer), bilateral and/or triple-negative disease, and a diagnosis of ovarian cancer are the findings with the highest predictive value for a testing result positive for a pathogenic variant. Interestingly, in our cohort, epithelial ovarian cancer was diagnosed at a later age in carriers when compared to non-carriers (not statistically significant). A recent study from Azzollini et al [11] highlighted the impact of ovarian cancer cases on the detection rates of pathogenic variants, reporting a mutational prevalence up to 56% among breast and ovarian cancer families. Moreover, breast and ovarian or early-onset ovarian cancer probands with negative family history showed remarkably high detection rates, 43.3% and 26.7%, respectively. Taken together, these findings underscore the importance of testing ovarian cancer patients of all ages, regardless the family history.

The prevalence of pathogenic variants in our cohort was similar to that described in other studies, both in Brazil and in other countries, especially when considering only cancer-affected individuals (prevalence of 20%) [7–10] (Table 4). In addition, also in accordance with other studies from Brazil [7–10] and many other European countries [33], the *BRCA1* c.5266dupC (formerly known as 5382insC) was the most prevalent pathogenic variant, corresponding to 17.6% of all pathogenic variants in *BRCA1*.

The overall expected frequency of VUS among *BRCA* tested individuals worldwide is about 7%, but this frequency may vary depending on the patient’s ethnicity, increasing up to 21% in

Table 4. Prevalence of *BRCA* pathogenic variants in Brazilian studies performing comprehensive analysis of *BRCA1* and *BRCA2* among HBOC cohorts.

Reference	Sample size	Inclusion criteria	<i>BRCA</i> mutation prevalence
Carraro et al., 2013	54	BC diagnosed < 35 y*	20.4%
Silva et al., 2014	120	HBOC criteria	22.5%
Fernandes et al., 2016	349	HBOC criteria	21.5%
Maistro et al., 2016	100	Epithelial OC*	19.0%
Alemar et al., 2017 (present study)	418	HBOC criteria	19.1%

*These criteria are also considered "HBOC criteria" according to the NCCN v.2014.2.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187630.t004>

African-Americans [34]. Not surprisingly, considering the predominance of European ancestry in Southern Brazil, VUS were identified in 5.7% of our patients, similar to the prevalence described in North-Americans of European descent (5–6%) [34].

Surprisingly, our rate of novel pathogenic variants (12.5%) identified was lower than previously described in other Brazilian regions: 25% in the cohort reported by Silva et al [8] and 30% in the study of Carraro et al [7]. This again could be due to the higher proportion of Europeans in the population in Southern Brazil, with lower proportions of African- and Amerindian-ancestry than in other Brazilian regions. The lower rate of novel pathogenic variants could be due to the fact that most of the patients studied today worldwide are of European countries or of European descent. Another noteworthy finding from our study is the high prevalence of double heterozygous mutant individuals. In previous large cohorts of Brazilian patients, none of the patients studied was a carrier of more than one germline pathogenic variant in a *BRCA* gene. Double *BRCA1* and *BRCA2* heterozygotes have been described in only a few studies and have been considered rare in most populations [35]. Therefore it is surprising that in our population 2.5% of all carriers were double heterozygotes, if we include one patient carrying two *BRCA2* pathogenic variants. However, because the patient did not present with a phenotype of Fanconi's Anemia these variants are likely to be in the same *BRCA2* allele (i.e. in cis). The parents were not available for testing, to confirm this hypothesis.

One of the most important determinants of the yield of genetic testing is the testing criteria used. The fact that our overall prevalence of pathogenic variants was similar to that described in other countries indicates that the NCCN criteria, used for patient selection in our study, are performing well in the identification of carriers of pathogenic variants in this group of patients. However, we showed that several criteria not included in the NCCN or in the Brazilian (ANS) testing guidelines (e.g. ASCO criteria, criteria #35—Family with ≥ 2 BC and ≥ 1 OC at any age, #36—Family with ≥ 3 BC diagnosed < 50 y, #37—Family with sister pair with BC, both diagnosed < 50 y and #39—Family with sister pair with BC and OC, both diagnosed < 50 y, Table 3) had very high odds ratios for carrying a pathogenic variant. This is not unexpected, since these criteria are far more stringent than the NCCN criteria, and suggests that those criteria could be used as a prioritization approach in this population, in a scenario of limited resources. In addition, we observed that individuals fulfilling multiple criteria are more likely to carry a *BRCA* pathogenic variant. Also, the comparison between the predictive performance of distinct criteria sets (Fig 3) shown that the use of a large set of criteria did not improve the performance. In contrast, the use of a smaller set of criteria ($N = 14$) with high p-values in the OR analysis ($p \leq 0.001$) shown better results (AUC 0.776, 95%CI 0.720–0.833). The identification of highly predictive criteria in a specific population could guide establishment of priorities in genetic testing in a scenario of limited resources. Although this is the largest HBOC cohort published in Brazil it is relatively small and local. For this reason, we do not intend to make a formal recommendation, but instead our data aim to raise awareness and discuss the possibility of change the criteria used to decide who should be tested in a specific context of limited resources.

Several limitations must be considered when analyzing the data presented here. First, the cohort of patients studied, although significant in size is probably not entirely representative of the population of Southern Brazil. Brazil is a country of continental dimensions and formed by a very admixed population with contributions from Europeans, Africans and Native Americans in different proportions according to geographic region [36]. Thus, it is possible that the profile of pathogenic variants will be unique in different Brazilian regions. Also, besides patients prospectively recruited, this study also included retrospective data. Moreover, since we recruited patients from high risk clinics, the performance of selected criteria may not be the same for individuals in the general population. Although all participants fulfilled the same

clinical criteria (NCCN version 2014.2), they were recruited from different clinics and a heterogeneity in variant testing strategies was present, with some individuals being tested by Sanger sequencing and others by NGS. In addition, LGR analysis was incomplete, mainly due to the fact that until very recently testing in Brazil followed a stepwise approach with sequencing being done first. The lack of LGR analysis in some individuals, as well as the absence of specific testing for the Portuguese founder rearrangement, *BRCA2* c.156_157insAlu, may have underestimated its frequency and could also have impacted the frequency of double heterozygotes. Our LGR prevalence (1.19%), however, is not significantly different from that reported in previous comprehensive Brazilian studies (0.29% [9], 1.7% [8] and 2% [10]), indicating that an underestimation is not likely. Gleason scores were not available for most prostate cancer cases and not all cancers in the proband's relatives could be confirmed by pathology and medical reports. Finally, the small number of probands fulfilling some of the criteria could have had an impact on the robustness of the respective ORs.

In conclusion, this is the first comprehensive study on the molecular profile of HBOC probands from Southern Brazil. The prevalence of pathogenic variants is similar to that observed in other Brazilian studies and in other countries, and *BRCA1* and *BRCA2* molecular heterogeneity is also as striking as described in most populations. The identification of a significant proportion of double heterozygotes in our cohort reinforces the importance of comprehensive *BRCA* gene testing. Finally, with this study we have demonstrated that a specific subset of clinical criteria are highly predictive of carrying a pathogenic variant in this population. Taken together with the significantly reduced sequencing costs of next generation sequencing, the strategy of identifying criteria which are highly predictive for presence of a pathogenic variant in a specific population could be used as a first step to prioritize genetic testing in a scenario of limited resources.

Supporting information

S1 Table. Prevalence of pathogenic variants in the cohort according to different testing criteria and performance of each criteria.

(XLSX)

S2 Table. *BRCA1* and *BRCA2* pathogenic variants identified in our cohort, and personal history of cancer of each carrier.

(XLSX)

S1 Fig. The prevalence of pathogenic variants according to the number of criteria fulfilled, considering only those 14 clinical criteria that had a highly statistical significant odds-ratio ($p \leq 0.001$).

(TIFF)

Acknowledgments

We thank Gustavo Stumpf da Silva for his laboratory support; Simone Machado for her help with pathology review of ovarian cancer cases and Ivaine Sauthier for geo-mapping analyses.

Author Contributions

Conceptualization: Suzi Alves Camey, Patricia Ashton-Prolla.

Data curation: Bárbara Alemar, Cleandra Gregório, Josef Herzog, Camila Matzenbacher Bitar, Cristina Brinckmann Oliveira Netto, Osvaldo Artigalas, Ida Vanessa D. Schwartz, Jordy Coffa, Suzi Alves Camey, Patricia Ashton-Prolla.

Formal analysis: Bárbara Alemar, Josef Herzog, Camila Matzenbacher Bittar, Cristina Brinckmann Oliveira Netto, Osvaldo Artigalas, Suzi Alves Camey, Patricia Ashton-Prolla.

Funding acquisition: Jeffrey Weitzel, Patricia Ashton-Prolla.

Investigation: Bárbara Alemar, Patricia Ashton-Prolla.

Methodology: Bárbara Alemar, Cleandra Gregório, Josef Herzog, Camila Matzenbacher Bittar, Cristina Brinckmann Oliveira Netto, Osvaldo Artigalas, Ida Vanessa D. Schwartz, Jordy Coffa, Suzi Alves Camey, Jeffrey Weitzel, Patricia Ashton-Prolla.

Project administration: Bárbara Alemar, Patricia Ashton-Prolla.

Resources: Patricia Ashton-Prolla.

Supervision: Patricia Ashton-Prolla.

Writing – original draft: Bárbara Alemar, Patricia Ashton-Prolla.

Writing – review & editing: Bárbara Alemar, Cleandra Gregório, Josef Herzog, Camila Matzenbacher Bittar, Cristina Brinckmann Oliveira Netto, Osvaldo Artigalas, Ida Vanessa D. Schwartz, Jordy Coffa, Suzi Alves Camey, Jeffrey Weitzel, Patricia Ashton-Prolla.

References

1. Lalloo F, Evans DG. Familial breast cancer. *Clin Genet.* 2012; 82(2):105–14. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2012.01859.x> PMID: 22356477
2. Levy-Lahad E, Friedman E. Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer.* 2007; 96(1):11–5. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603535> PMID: 17213823
3. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1998; 62(3):676–89. PMID: 9497246
4. Clinical Practice Guidelines in Oncology. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer. <http://www.nccn.org>: NCCN—National Comprehensive Cancer Network; 2017.
5. Weitzel JN, Blazer KR, MacDonald DJ, Culver JO, Offit K. Genetics, genomics, and cancer risk assessment: State of the Art and Future Directions in the Era of Personalized Medicine. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61(5):327–59. <https://doi.org/10.3322/caac.20128> PMID: 21858794
6. Ashton-Prolla P, Goldim JR, Vairo FP, da Silveira Matte U, Sequeiros J. Genomic analysis in the clinic: benefits and challenges for health care professionals and patients in Brazil. *J Community Genet.* 2015; 6(3):275–83. <https://doi.org/10.1007/s12687-015-0238-0> PMID: 26040235
7. Carraro DM, Koike Folgueira MA, Garcia Lisboa BC, Ribeiro Olivieri EH, Vitorino Krepischi 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057581> PMID: 23469205
8. 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; 15:55. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-15-55> PMID: 24884479
9. Fernandes GC, Michelli RA, Galvão HC, Paula AE, Pereira R, Andrade CE, et al. Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. *Oncotarget.* 2016.
10. 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; 16(1):934. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2966-x> PMID: 27914478
11. Azzollini J, Scuvera G, Bruno E, Pasanisi P, Zaffaroni D, Calvello M, et al. Mutation detection rates associated with specific selection criteria for BRCA1/2 testing in 1854 high-risk families: A monocentric Italian study. *Eur J Intern Med.* 2016; 32:65–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2016.03.010> PMID: 27062684
12. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Core Team. R Foundation for Statistical Computing.; 2015.

13. Alemar B, Herzog J, Brinckmann Oliveira Netto C, Artigalás O, Schwartz IV, Matzenbacher Bittar C, et al. Prevalence of Hispanic BRCA1 and BRCA2 mutations among hereditary breast and ovarian cancer patients from Brazil reveals differences among Latin American populations. *Cancer Genet*. 2016; 209(9):417–22. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2016.06.008> PMID: 27425403
14. Bendl J, Stourac J, Salanda O, Pavelka A, Wieben ED, Zendulka J, et al. PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations. *PLoS Comput Biol*. 2014; 10(1): e1003440. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003440> PMID: 24453961
15. Tavtigian SV, Deffenbaugh AM, Yin L, Judkins T, Scholl T, Samollow PB, et al. Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J Med Genet*. 2006; 43(4):295–305. <https://doi.org/10.1136/jmg.2005.033878> PMID: 16014699
16. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods*. 2014; 11(4):361–2. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890> PMID: 24681721
17. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015; 17(5):405–24. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30> PMID: 25741868
18. Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015; 526(7571):68–74. <https://doi.org/10.1038/nature15393> PMID: 26432245
19. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature*. 2016; 536(7616):285–91. <https://doi.org/10.1038/nature19057> PMID: 27535533
20. Clinical Practice Guidelines in Oncology. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer. <http://www.nccn.org>: NCCN—National Comprehensive Cancer Network; 2014.
21. Statement of the American Society of Clinical Oncology: genetic testing for cancer susceptibility, Adopted on February 20, 1996. *J Clin Oncol*. 1996; 14(5):1730–6; discussion 7–40. <https://doi.org/10.1200/JCO.1996.14.5.1730> PMID: 8622094
22. Lu KH, Wood ME, Daniels M, Burke C, Ford J, Kauff ND, et al. American Society of Clinical Oncology Expert Statement: collection and use of a cancer family history for oncology providers. *J Clin Oncol*. 2014; 32(8):833–40. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.50.9257> PMID: 24493721
23. Position statement on BRCA genetic testing for patients with and without breast cancer. <https://www.breastsurgeons.org>: The American Society of Breast Surgeons (ASBS); 2012.
24. Lancaster JM, Powell CB, Chen LM, Richardson DL, Committee SCP. Society of Gynecologic Oncology statement on risk assessment for inherited gynecologic cancer predispositions. *Gynecol Oncol*. 2015; 136(1):3–7. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.09.009> PMID: 25238946
25. Graña B, Lastra E, Llort G, Brunet J, Isla D. SEOM clinical guidelines for hereditary cancer. *Clin Transl Oncol*. 2011; 13(8):580–6. <https://doi.org/10.1007/s12094-011-0701-2> PMID: 21821494
26. Protocol 2—BRCA1 and BRCA2 mutation testing guidelines. <http://www.icr.ac.uk/protocols>: The Institute of Cancer Research (ICR) and The Royal Marsden NHS Found Trust; 2015.
27. Rol de procedimentos e eventos em saúde. Resolução Normativa—RN nº 387, de 28 de outubro de 2015. Diretrizes de utilização para cobertura de procedimentos na saúde suplementar—Anexo II Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS; Brazilian National Supplementary Health Insurance Agency); 2016.
28. Evans DG, Eccles DM, Rahman N, Young K, Bulman M, Amir E, et al. A new scoring system for the chances of identifying a BRCA1/2 mutation outperforms existing models including BRCAPRO. *J Med Genet*. 2004; 41(6):474–80. <https://doi.org/10.1136/jmg.2003.017996> PMID: 15173236
29. Penn II <http://www.afcri.upenn.edu/ftacc/penn2/>: University of Pennsylvania Abramson Cancer Center; [
30. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105(30):10513–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105> PMID: 18663219
31. Felix GE, Abe-Sandes C, Machado-Lopes TM, Bomfim TF, Guindalini RSC, Santos VCS, et al. Germline mutations in BRCA1, BRCA1, CHEK2 and TP53 in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population. *Human Genome Variation*; 2014.
32. 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; 34(13):1460–8. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.65.0747> PMID: 26976419

33. Hamel N, Feng BJ, Foretova L, Stoppa-Lyonnet D, Narod SA, Imyanitov E, et al. On the origin and diffusion of BRCA1 c.5266dupC (5382insC) in European populations. *Eur J Hum Genet.* 2011; 19(3):300–6. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.203> PMID: 21119707
34. Ready K, Gutierrez-Barrera AM, Amos C, Meric-Bernstam F, Lu K, Hortobagyi G, et al. Cancer risk management decisions of women with BRCA1 or BRCA2 variants of uncertain significance. *Breast J.* 2011; 17(2):210–2. <https://doi.org/10.1111/j.1524-4741.2010.01055.x> PMID: 21294809
35. Heidemann S, Fischer C, Engel C, Fischer B, Harder L, Schlegelberger B, et al. Double heterozygosity for mutations in BRCA1 and BRCA2 in German breast cancer patients: implications on test strategies and clinical management. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 134(3):1229–39. <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2050-4> PMID: 22535016
36. Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuña-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, Arias W, et al. Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet.* 2014; 10(9):e1004572. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004572> PMID: 25254375

Supporting Information

S1 Table. Testing criteria: prevalence of pathogenic variants and performance.

Criteria #	Testing criteria	Reference	Prevalence of mutation (%)*	N**	OR	95% CI	P
1	Personal history of BC diagnosed ≤35 y	ANS	20.0	19	1.074	0.604-1.908	0.882
2	Personal history of BC diagnosed <40 y	ICR/NHS Foundation Trust	23.1	36	1.486	0.907-2.435	0.124
3	Personal history of BC diagnosed ≤45 y	NCCN, SGO	20.7	46	1.245	0.761-2.037	0.455
4	Personal history of BC diagnosed <50 y	ASBS	19.4	50	1.042	0.630-1.722	0.899
5	Personal history of BC diagnosed ≤50 y and an additional primary ¹	NCCN, ANS, SGO	29.3	12	1.88	0.913-3.871	0.095
6	Personal history of bilateral BC, both diagnosed < 60 y	ICR/NHS Foundation Trust	35.5	11	2.535	1.161-5.532	0.029
7	Personal history of two primary BC	ASBS	24.5	13	1.446	0.733-2.852	0.349
8	Personal history of BC diagnosed ≤50 y and a limited family history ²	NCCN, ANS, SGO	28.0	23	1.908	1.090-3.340	0.028
9	Personal history of triple negative BC	ICR/NHS Foundation Trust	43.6	34	4.881	2.8-8.509	<0.001
10	Personal history of triple negative BC diagnosed ≤60 y	NCCN, ANS, SGO, ASCO-b, ASBS	44.2	34	5.014	2.871-8.756	<0.001
11	Personal history of BC and non-mucinous OC	ICR/NHS Foundation Trust	54.5	6	5.4	1.605-18.168	0.008
12	Personal history of epithelial OC	NCCN, ANS, SGO, ASCO-b, ASBS	37.8	14	2.905	1.421-5.941	0.007
13	Personal history of non-mucinous OC	ICR/NHS Foundation Trust	46.7	7	4.229	1.482-12.067	0.01
14	Personal history of mucinous OC and another primary cancer	ICR/NHS Foundation Trust	0.0	-	-	-	-
15	Personal history of male BC	NCCN, ANS, ASBS, ICR/NHS Foundation Trust	14.3	1	0.7	0.083-5.901	1.00
16	Personal history of BC at any age and ethnicity associated with higher mutational frequency (Ashkenazi)	NCCN, ANS, SGO, ASBS	28.6	2	1.708	0.325-8.966	0.623

S1 Table (continued). Testing criteria: prevalence of pathogenic variants and performance.

Criteria #	Testing criteria	Reference	Prevalence of mutation (%)*	N**	OR	95% CI	P
17	Personal history of OC at any age and Ashkenazi ancestry	ANS	0.0	-	-	-	-
18	Personal history of BC diagnosed ≤50 y and ≥1 close relative with BC at any age	NCCN	21.6	41	1.334	0.818-2.173	0.263
19	Personal history of BC and a relative with BC, both diagnosed < 50y	ICR/NHS Foundation Trust	29.9	29	2.258	1.332-3.827	0.003
20	Personal history of BC diagnosed ≤50 y and ≥1 close relative with BC and/or OC at any age	ANS	21.4	41	1.302	0.799-2.121	0.319
21	Personal history of BC at any age and ≥1 close relative with BC diagnosed ≤50 y	NCCN, ANS, SGO	27.4	46	2.395	1.459-3.933	0.001
22	Personal history of BC at any age and ≥2 close relative with BC at any age	NCCN, ANS, SGO	27.3	38	2.123	1.292-3.489	0.004
23	Personal history of BC at any age and ≥1 close relative with OC	NCCN, ANS, SGO	46.2	18	4.382	2.207-8.701	<0.001
24	Personal history of BC at any age and ≥2 close blood relatives with PaC and/or PrC	NCCN, ANS, SGO	13.8	4	0.659	0.223-1.950	0.625
25	Personal history of BC at any age and ≥1 close blood relatives with male BC	NCCN, ANS	25.0	1	1.414	0.145-13.77	0.574
26	Personal history of PaC ou PrC at any age and ≥2 close blood relatives with BC and/or OC and/or PaC or PrC at any age	NCCN, ANS	0.0	-	-	-	-
27	Woman with PaC with ≥2 close blood relatives with BC and/or OC and/or PaC and/or PrC	SGO	0.0	-	-	-	-
28	Personal history of PaC and family history of BC and OC	ASBS	0.0	-	-	-	-
29	Personal history of PaC at any age and Ashkenazi ancestry, with ≥1 close blood relatives with BC and/or OC and/or PaC and/or PrC	ANS	0.0	-	-	-	-
30	Family history only ³ : first- or second-degree blood relatives meeting any of the NCCN criteria	NCCN	11.5	7	0.504	0.220-1.155	0.114
31	Family history only: third-degree blood relatives with BC and/or OC with ≥2 close blood relatives with BC (at least one dx ≤ 50y) and/or OC	NCCN	0.0	-	-	-	-

S1 Table (continued). Testing criteria: prevalence of pathogenic variants and performance.

Criteria #	Testing criteria	Reference	Prevalence of mutation (%)*	N**	OR	95% CI	P
32	Family history only: woman with first-degree blood relative or several relatives meeting any of the SGO criteria	SGO	15.2	7	0.735	0.316-1.710	0.556
33	Family history only: woman with close blood relative with male BC	SGO	0.0	-	-	-	-
34	Family history only: relatives with cancer and Manchester Score ≥ 17	ICR/NHS Foundation Trust	15.4	2	0.762	0.166-3.509	1.00
35	Family with ≥ 2 BC and ≥ 1 OC at any age	ASCO-a	48.9	22	5.195	2.717-9.932	<0.001
36	Family with ≥ 3 BC diagnosed < 50 y	ASCO-a	40.0	24	3.595	1.993-6.486	<0.001
37	Family with sister pair with BC, both diagnosed < 50y	ASCO-a	34.5	19	2.613	1.405-4.858	0.003
38	Family with sister pair with OC, both diagnosed < 50y	ASCO-a	0.0	-	-	-	-
39	Family with sister pair with BC and OC, both diagnosed < 50y	ASCO-a	55.6	5	5.567	1.460-21.226	0.015
40	Family history of OC (non-mucinous)	ASBS	38.3	23	3.282	1.815-5.936	<0.001
41	Family history of BC and Ashkenazi ancestry	ASBS	40.0	4	2.912	0.802-10.574	0.104
42	Family with ≥ 3 BC and/or OC	SEOM	28.4	52	2.935	1.764-4.881	<0.001
43	Family with 2 BC and/or OC and at least 1 male BC	SEOM	30.0	3	1.842	0.466-7.287	0.412
44	Family with 2 BC and/or OC, and at least 1 OC	SEOM	49.1	26	5.546	3.010-10.219	<0.001
45	Family with 2 BC diagnosed < 50 y	SEOM	28.7	43	2.509	1.528-4.119	<0.001
46	Family with 2 BC: one bilateral and the other diagnosed < 50 y	SEOM	37.1	13	2.787	1.337-5.810	0.011
47	Family with only 1 BC, if woman affected by BC and OV	SEOM	0.0	-	-	-	-
48	Family with only 1 BC, if woman diagnosed ≤ 30 y	SEOM	31.3	5	1.982	0.669-5.874	0.204
49	Family with only 1 BC, if woman diagnosed with bilateral BC diagnosed < 40 y	SEOM	50.0	1	4.266	0.264-68.941	0.347
50	Personal history of BC and relatives with cancer and Manchester Score ≥ 15	ICR/NHS Foundation Trust	31.1	51	3.502	2.105-5.824	<0.001
51	Individual PennII Score ≥ 10	Penn II	22.6	72	3.345	1.479-7.564	0.002

S1 Table (continued). Testing criteria: prevalence of pathogenic variants and performance.

Criteria #	Testing criteria	Reference	Prevalence of mutation (%)*	N**	OR	95% CI	P
52	Familial PennII Score ≥10	Penn II	22.1	77	7.643	1.822-32.062	<0.001
53	Myriad Table Score ≥ 10	Myriad Inc.	35.9	56	5.553	3.262-9.455	<0.001
54	Manchester Score ≥ 10	Manchester	22.5	74	4.014	1.685-9.563	<0.001

*Percentage of individuals carrying a pathogenic mutation , among all individuals fulfilling the criteria

1. Two breast primary tumors includes contralateral or two clearly separate ipsilateral tumors
2. "Unknown or limited family history" apply to individuals with a unknown history or a family with fewer than two first- or second-degree female relatives have living beyond age 45.
3. "Family history only" apply to unaffected probands with a family history of cancer

S2 Table. *BRCA1* and *BRCA2* pathogenic variants identified in our cohort, and personal history of cancer of each carrier.

<i>BRCA1</i>		
HGVS name	# of carriers	Carrier's personal history of cancer
c.68_69delAG (p.Glu23Valfs)	1	Female; BrCa, 50; OvCa
c.273_274delTG (p.Ala92Phefs)	1	Female; BrCa, 34
c.791_794delGTTC (p.Ser264Metfs)	1	Female; BrCa, 51
c.1088delA (p.Asn363Ilefs)	1	Female; BrCa, 28
c.1340_1341insG (p.His448Serfs)	1	Female; Bilateral BrCa, 36 and 41
c.1612C>T (p.Gln538Ter)	1	Female; Bilateral BrCa, 37
c.1687C>T (p.Gln563Ter)	2	Female; OvCa, 44
		Female; Unaffected
c.2250dupC (p.Met751Hisfs)	1	Female; BrCa, 40
c.2727_2730delTCAA (p.Asn909Lysfs)	1	Female; BrCa, 29
c.2910dupA (p.His971Thrfs)	1	Female; BrCa, 29
c.3228_3229delAG (p.Gly1077Alafs)	1	Female; Bilateral BrCa, 28
c.3331_3334delCAAG (p.Gln1111Asnfs)	1	Female; OvCa, 47; BrCa, 51; Renal clear cells carcinoma, 52
c.3534delC (p.Ser1178Argfs)	1	Female; OvCa, 48
c.3598C>T (p.Gln1200Ter)	2	Female; BrCa, 52
		Female; BrCa, 39
c.4183C>T (p.Gln1395Ter)	3	Female; BrCa, 51; Lymphoma, 49
		Female; BrCa, 24
		Female; BrCa, 43
c.4357+1G>T ¹	1	Female; Ipsilateral BrCa, 38 and 48
c.4484G>C (p.Arg1495Thr)	1	Female; Unaffected
c.4663delA (p.Arg1555Glyfs)	1	Female; BrCa, 43
c.4675+1G>A	2	Female; BrCa, 32
		Female; OvCa, 44
c.4736_4739delCTTC (p.Pro1579Leufs)	1	Female; OvCa, 45
c.4941delC (p.Asn1647Lysfs)	1	Female; BrCa, 28
c.4987-3C>G	1	Female; BrCa, 39
c.5062_5064delGTT (p.Val1688del)	4	Female; BrCa, 36
		Female; BrCa, 36
		Female; BrCa, 45
		Female; BrCa, 64
c.5095C>T (p.Arg1699Trp)	1	Female; Bilateral BrCa, 28 and 33
c.5096G>A (p.Arg1699Gln)	1	Female; Bilateral BrCa, 38
c.5177_5180delGAAA (p.Arg1726Lysfs)	3	Female; BrCa, 32
		Female; BrCa, 47; OvCa, 52
		Female; BrCa, 39; OvCa, 47

S2 Table (continued). BRCA1 and BRCA2 pathogenic variants identified in our cohort, and personal history of cancer of each carrier.

BRCA1		
HGVS name	# of carriers	Carrier's personal history of cancer
c.5251C>T (p.Arg1751Ter)	2	Female; BrCa, 60
		Female; BrCa, 45
c.5266dupC (p.Gln1756Profs)	9	Female; BrCa, 30
		Male; BrCa, 64
		Female; Bilateral BrCa, 23 and 44
		Female; Bilateral BrCa, 26
		Female; BrCa, 29
		Female; OvCa, 42
		Female; Unaffected
		Female; BrCa, 36
		Female; BrCa, 47; OvCa, 52
Deletion exons 1-2	1	Female; Bilateral BrCa, 42 and 47
Deletion exon 3	1	Female; Bilateral BrCa, 39 and 42
Deletion exons 4-6 ²	1	Female; BrCa, 43
Deletion exon 8	1	Female; BrCa, 30
BRCA2		
c.2T>G (p.Met1?)	1	Unaffected
c.1138delA (p.Ser380Valfs)	4	BrCa, 52; OvCa, 52
		Brca, 34
		BrCa, 37
		OvCa, 69
c.156_157insAlu	1	Bilateral BrCa, 51
c.2266C>T (p.Gln756Ter)	1	BrCa, 29
c.2505dupA (p.Pro836Thrfs)	1	BrCa, 44
c.2805_2808delTAAA (p.Ala938Profs)	1	BrCa, 26
c.2808_2811delACAA (p.Ala938Profs)	3	OvCa, 63; Brca, 76; CCR, 75
		Unaffected
		OvCa, 44
c.3975_3978dupTGCT (p.Ala1327Cysfs)	1	Bilateral BrCa, 43 and 54
c.4829_4830delTG (p.Val1610Glyfs)	1	Ipsilateral BrCa, 39 and 48
c.5351dupA (p.Asn1784Lysfs)	1	BrCa, 55
c.5621_5624delTTAA (p.Ile1874Argfs)	1	BrCa, 39
c.5682C>G (p.Tyr1894Ter)	1	BrCa, 29
c.5946delT (p.Ser1982Argfs)	3	Unaffected
		Unaffected
		BrCa, 64

S2 Table (continued). BRCA1 and BRCA2 pathogenic variants identified in our cohort, and personal history of cancer of each carrier.

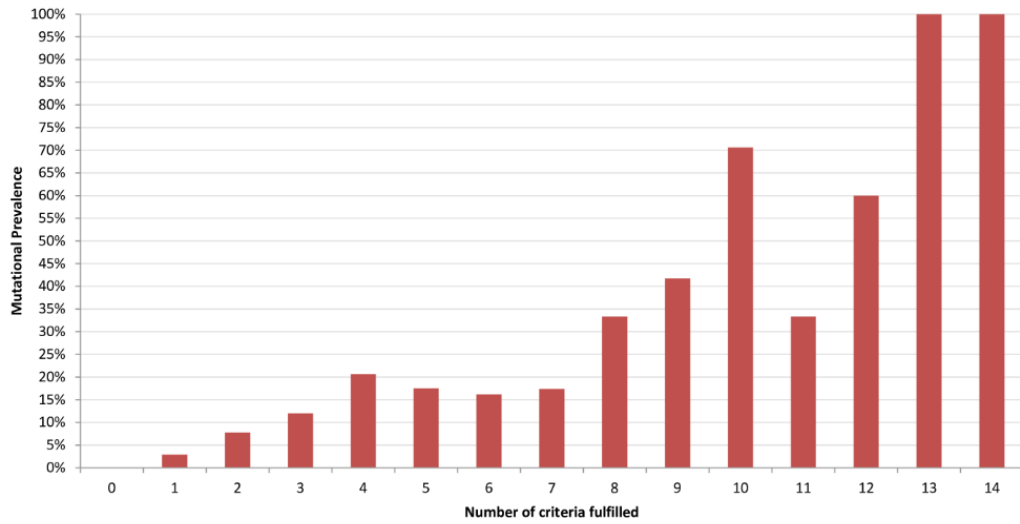
BRCA2		
HGVS name	# of carriers	Carrier's personal history of cancer
c.6405_6409delCTTAA (p.Asn2135Lysfs) ¹	1	Ipsilateral BrCa, 38 and 48
c.6656C>G (p.Ser2219Ter)	1	BrCa, 53
c.7007G>A (p.Arg2336His)	1	BrCa, 48
c.7580_7583dupTAGG (p.Gly2529Argfs)	2	BrCa, 42
		BrCa, 39
c.7618-2A>G	1	OvCa, 47
c.7987delG (p.Glu2663Lysfs)	1	BrCa, 38
c.9004G>A (p.Glu3002Lys) ²	1	BrCa, 43
c.8878C>T (p.Gln3036Ter) ³	1	BrCa, 52
c.9282_9397del (p.Asp3095Argfs)	1	BrCa, 39
c.9371A>T (p.Asn3124Ile)	1	BrCa, 49
c.9699_9702delTATG (p.Cys3233Trpfs) ³	1	BrCa, 52

Although the *BRCA1* c.4987-3C>G is classified by the submitters in ClinVar as a VUS, functional studies by Brandão et al (Breast Cancer Res Treat. 2012 Jan; 131(2):723-5) demonstrated that the variant is indeed pathogenic.

The variant *BRCA2* c.9004G>A shows conflicting interpretations of pathogenicity in ClinVar, and is considered to be pathogenic in this study. Although this variant has been classified as a VUS by one laboratory, four major laboratories (with highly validated classification methods) classified it as pathogenic and other two classified as likely pathogenic.

1. Patient carrying these two pathogenic variants
2. Patient carrying these two pathogenic variants
3. Patient carrying these two pathogenic variants

Variants in bold are novel.



S1 Fig. The prevalence of pathogenic variants according to the number of criteria fulfilled, considering only those 14 clinical criteria that had a highly statistical significant odds-ratio ($p \leq 0.001$).

Capítulo VIII – Artigo 5

Multigene panel testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer in Brazil

Manuscrito a ser submetido à revista *Oncotarget*.

Multigene panel testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer in Brazil

Barbara Alemar^{1,2,*}, Camila Matzenbacher Bittar^{1,2}, Yasminne Costa², Osvaldo Artigas³, Cristina Brinckmann de Oliviera Netto⁴, Daniele Konzen^{2,4}, Patricia Ashton-Prolla^{1,2,4,5}

1. Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil).
2. Laboratório de Medicina Genômica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre, Brazil).
3. Hospital Moinhos de Vento (Porto Alegre, Brazil).
4. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (Porto Alegre, Brazil).
5. Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil).

*** Correspondence to**

Bárbara Alemar
Rua Ramiro Barcelos, 2350
Porto Alegre/RS
Zip Code 90035-003
Phone +55 51 3359-7661
E-mail: barbara.alemar@gmail.com

Abstract

About 80% of all individuals with suspected hereditary breast and ovarian cancer syndrome remain without a molecular diagnosis, a feature known as “missing heritability”. By allowing simultaneous screening of a broad number of cancer predisposition genes, the technology of next generation sequencing transformed genetic cancer risk assessment and, currently, multigene panel testing can be done by a fraction of the cost previously required to sequence a single gene. Aiming to assess the contribution of germline mutations in cancer predisposing genes, we present a comprehensive mutation analysis of 358 Brazilian patients fulfilling clinical criteria for hereditary breast and ovarian cancer syndrome, that were subjected to multigene panel sequencing in up to 86 cancer-related genes. In total, 35.5% of all individuals enrolled in this study had at least one variant of unknown significance (VUS), and the number of VUS was directly proportional to the size of the panel. We found a combined overall mutation rate of 18.2%, and pathogenic/likely pathogenic (P/LP) variants were reported in the high-risk genes *BRCA1*, *BRCA2*, *PALB2*, *TP53*, but also in moderate-risk genes, including *ATM*, *CHEK2* and *MUTYH*. P/LP variants in the non-actionable genes (i.e., those without clear management guidelines) *FANCC*, *RECQL* and *RECQL4* were also detected. Remarkably, 55.5% of all P/LP were identified in non-*BRCA* genes, and 87% of them were actionable mutations with specific management guidelines. This is the first study describing the mutational profile of a Brazilian HBOC patients after analysis with multigene panels. Our findings highlight the benefits and limitations of large gene panel testing in individuals with HBOC criteria from this population.

Homologous recombination repair genes and inherited breast and ovarian cancer predisposition.

Manuscrito a ser submetido à revista *Familial Cancer*.

Homologous recombination repair genes and inherited breast and/or ovarian cancer predisposition

Barbara Alemar^{1,2}, Yasminne Rocha², Tiago Finger Andreis^{2,3}, Patricia Ashton-Prolla¹⁻⁴

¹ Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil).

² Laboratório de Medicina Genômica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Porto Alegre, Brazil).

³ Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, Brazil).

⁴ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (Porto Alegre, Brazil).

*** Correspondence to**

Bárbara Alemar

Rua Ramiro Barcelos, 2350

Porto Alegre/RS

Zip Code 90035-003

Phone +55 51 3359-7661

E-mail: barbara.alemar@gmail.com

Abstract

Germline mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* (*BRCA*) genes are the most frequent cause of hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC), and genetic testing for mutations in these genes is an example of the use of genomics in personalized medicine, since results can determine cancer prevention and therapeutic strategies. However, approximately 75-80% of all suspected HBOC families cannot be ascribed to these genes. Introduction of next generation sequencing technology allowed expansion of knowledge in this area, uncovering substantial locus heterogeneity. Currently, despite a significant proportion of families who remain without a molecular definition of their cancer predisposition, several additional genes have been associated with hereditary breast and/or ovarian cancer. Many of them act together with *BRCA* in the homologous recombination repair pathway, and are associated with moderate-cancer risk. In this review, we describe the role of some of these genes and their impact on the HBOC phenotype. Finally, we examine recent results from multigene panel testing in HBOC individuals, and review data on deficiency of other HRR genes and BRCAness.

Capítulo X – Artigo 7

The genetic landscape of breast tumors related to the Li-Fraumeni syndrome.

Manuscrito em preparação, a ser submetido à revista *Clinical Cancer Research*.

The genetic landscape of breast tumors related to the Li-Fraumeni syndrome

Barbara Alemar^{1,2}, Felipe Correa Geyer³, Fresia Pareja³, Rahul Kumar³, Pierre Selenica³, Gabriel de Souza Macedo², Thais Basilli de Oliveira³, Britta Weigelt^{3,4}, Patricia Ashton-Prolla^{1,2,5}, Jorge S. Reis-Filho^{3,4}

¹ Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

² Laboratório de Medicina Genômica - Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, RS, Brazil

³ Department of Pathology, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

⁴ Human Oncology and Pathogenesis Program, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York, NY, USA

⁵ Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Correspondence:

Dr. Jorge S. Reis-Filho, MD PhD FRCPATH,
Department of Pathology and Human Oncology and Pathogenesis Program
Memorial Sloan Kettering Cancer Center
1275 York Avenue, New York, NY 10065, USA
Email: reisfilj@mskcc.org

Capítulo XI – Discussão

11.1. Perfil clínico e alterações moleculares de indivíduos que preenchem critérios para a síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário no Brasil

A importância da testagem dos genes *BRCA1* e *BRCA2* em famílias onde há suspeita de síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário é indiscutível, haja vista a necessidade e os benefícios envolvidos no manejo específico dos indivíduos portadores de mutação em um destes genes. Infelizmente, e a despeito de claros benefícios da testagem, 70% da população brasileira depende da assistência médica do Sistema Único de Saúde (SUS), que não disponibiliza este teste aos seus usuários. Embora dois projetos de lei (PL) que visam assegurar a obrigatoriedade do teste de *BRCA1* e *BRCA2* no âmbito do SUS estejam tramitando atualmente na Câmara dos Deputados (PL 6262/2013 e PL 2804/2015), não há previsão para incorporação destes testes no rol de procedimentos do SUS.

Neste contexto, o projeto que deu origem a esta tese buscou caracterizar o panorama da síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário no Brasil, com um enfoque especial nas famílias do Rio Grande do Sul, com o objetivo de fomentar as bases de conhecimento necessárias à construção de novas políticas públicas de manejo destes indivíduos e suas famílias.

Considerando que a principal barreira à implementação de um teste diagnóstico e sua disponibilização de forma gratuita é o custo, buscamos avaliar a utilidade clínica de um painel de genotipagem de baixo custo e que inclui 114 mutações distribuídas ao longo dos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Este painel (HISPANEL) foi criado a partir da observação de um padrão de mutações recorrentes identificadas em diferentes populações de origem Hispânica e emprega a metodologia de espectrometria de massa (Sequenom, MALDI-TOF-MS), que é bastante acessível (Weitzel *et al.*, 2013; Weitzel *et al.*, 2005). Em países com uma alta prevalência de mutações recorrentes em *BRCA1* e *BRCA2*, como o México, o HISPANEL foi capaz de detectar aproximadamente 80% de todas as mutações presentes na população investigada, representando assim uma oportunidade de oferecer o teste a um menor custo (Villarreal-Garza *et al.*,

2015).

No Capítulo IV – Artigo 1, avaliamos a utilidade deste painel em uma coorte de indivíduos com critérios clínicos para HBOC, provenientes do Rio Grande do Sul. Tendo atingido uma prevalência mutacional baixa (3,5%) nesta coorte, uma comparação cuidadosa entre as mutações avaliadas pelo HISPANEL e as mutações detectadas através de sequenciamento completo de *BRCA1* e *BRCA2* em uma segunda coorte, revelou que o painel seria capaz de detectar apenas 27% das mutações presentes nesta população. Além disso, comparações com dados publicados em outras coortes brasileiras (Carraro *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2014) revelaram uma capacidade de detecção semelhante àquela vista no nosso estudo. Assim, diferente do que acontece em outros países da América Latina, estimamos que o HISPANEL tem uma capacidade de detecção de apenas um terço das mutações presentes na população brasileira, sugerindo que esta população possui um perfil de mutações nos genes *BRCA* bem diferente da observada para outras populações do continente. Embora este painel não tenha tido um desempenho satisfatório, sua metodologia possibilita a customização e inclusão das mutações específicas, de acordo com as características de cada população.

A presença de mutações fundadoras e/ou recorrentes em *BRCA1* e *BRCA2* em uma determinada população é uma valiosa oportunidade para criação de testes de rastreamento custo-efetivos. O exemplo mais bem conhecido é a população de Judeus Ashkenazi, onde três mutações combinadas correspondem à aproximadamente 80% das mutações identificadas nestes genes (Frank *et al.*, 2002). No Chile, por exemplo, um estudo envolvendo 453 indivíduos em risco para HBOC mostrou que nove mutações nos genes *BRCA* representam 77,5% de todas as mutações identificadas, favorecendo o desenvolvimento de um painel de rastreamento (Alvarez *et al.*, 2017). A criação destes painéis, no entanto, requer estudos abrangentes e uma ampla caracterização do espectro mutacional de uma dada população, possibilitando assim a identificação de mutações recorrentes, e sua contribuição para o fenótipo em questão.

Na população brasileira, no entanto, apenas quatro estudos realizaram uma análise completa dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, incluindo toda a região

codificante e avaliando possíveis rearranjos de ambos os genes (Carraro *et al.*, 2013; Fernandes *et al.*, 2016; Maistro *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2014). Assim, em decorrência da insuficiência de dados disponíveis para avaliar a presença de mutações recorrentes/fundadoras na nossa população, buscamos, através de um trabalho colaborativo, caracterizar o perfil de mutações germinativas de *BRCA1* e *BRCA2* no Brasil, conforme descrito no Capítulo V – Artigo 2. Este trabalho envolveu diversos centros públicos e privados de avaliação de risco genético de câncer em todas as regiões do país, e incluiu todos os centros participantes da Rede Brasileira de Câncer Hereditário, compilando dados de 649 portadores de mutações patogênicas nestes genes. Os resultados mostram uma grande heterogeneidade mutacional e sugerem que a criação de um painel único não é uma abordagem ideal para o rastreamento de indivíduos em risco para HBOC no Brasil. Se por um lado estes resultados não são surpreendentes, considerando a alta miscigenação presente na população brasileira (Ruiz-Linares *et al.*, 2014), por outro, a identificação de mutações recorrentes em regiões específicas do país ressalta a necessidade de maior investigação e caracterização dessas populações. É possível que, em certas regiões geográficas, a alta prevalência de um conjunto relativamente pequeno de mutações justifique o uso de painéis de genotipagem custo-efetivos.

A definição de metodologias utilizadas no rastreamento de mutações genéticas deve levar em consideração não só aspectos econômicos e técnicos, mas também as características da população. Até recentemente, as metodologias utilizadas na testagem de *BRCA1* e *BRCA2* nos laboratórios comerciais não permitiam, devido à limitações técnicas, a detecção de grandes inserções. Nesta categoria, a mutação fundadora portuguesa *BRCA2* c.156_157insAlu (Machado *et al.*, 2007) ilustra a importância do conhecimento acerca da composição genética de uma população, na definição de metodologias aplicadas a grupos em risco. Mesmo após a implementação do sequenciamento de nova geração em diversos laboratórios, é possível que esta mutação ainda fosse negligenciada, uma vez que a detecção de grandes inserções requer uma padronização específica das ferramentas utilizadas na análise dos dados de NGS. Considerando que o Brasil recebeu mais de 2,2 milhões de imigrantes portugueses entre os anos de 1500 e

1991, certamente contribuindo de maneira significativa na composição genética da população atual (IBGE, 2007), no Capítulo VI – Artigo 3 nós buscamos estimar a contribuição desta mutação entre famílias com suspeita de HBOC, e caracterizar sua origem. Enquanto esta mutação é muito prevalente em Portugal, correspondendo a cerca de 30% de todas as mutações identificadas em *BRCA1* e *BRCA2* (Peixoto *et al.*, 2011; Peixoto *et al.*, 2009), nossos dados estimaram uma frequência dez vezes menor na nossa população. Embora não tão frequente quanto em Portugal, o Artigo 2 (Capítulo V) mostrou que esta é a terceira mutação mais reportada em *BRCA2*, correspondendo a 5,3% de todas as mutações identificadas neste gene, tendo sido detectada em diversos estados brasileiros. Assim, nossos dados apontam a necessidade compulsória de inclusão desta variante nos protocolos de testagem de *BRCA1* e *BRCA2* em indivíduos com suspeita de síndrome HBOC.

O quarto Artigo desta Tese (Capítulo VII), focado em uma população do Rio Grande do Sul, traz considerações importantes sobre o perfil clínico e molecular das famílias HBOC neste Estado e é, ao nosso conhecimento, o maior trabalho já desenvolvido no Brasil até o momento, incluindo sequenciamento completo das regiões codificantes e MLPA de indivíduos com critérios clínicos HBOC. Os resultados apresentados ressaltam a importância do registro detalhado da história familiar (incluindo familiares de primeiro, segundo e terceiro grau, das linhagens materna e paterna), e dados clínicos (como status dos receptores hormonais e HER2), uma vez que ausência de dados tão relevantes leva a uma menor sensibilidade do grupo de critérios utilizados.

Além disso, a avaliação de dezenas de critérios clínicos de testagem revelou quais são, para esta população específica e pré-selecionada, os critérios com maior probabilidade de identificar uma mutação patogênica em *BRCA1* ou *BRCA2*. É importante salientar que este trabalho não pretende propor uma restrição dos critérios de testagem atualmente estabelecidos, através da utilização exclusiva dos critérios de alta probabilidade mutacional. Contudo, o conhecimento acerca de tais critérios possibilita, em um cenário específico de limitações financeiras, a priorização dos indivíduos com maior probabilidade de portar uma mutação. Ainda, visto que todos os participantes preenchem critérios de testagem

propostos pela NCCN, a prevalência mutacional encontrada confirma a adequabilidade destes e, por consequência, de vários critérios propostos pela ANS (que são baseados nos critérios supracitados), e atualmente vigentes no Brasil. Este estudo identificou, ainda, dois duplos-heterozigotos, ou seja, indivíduos portando uma mutação patogênica em *BRCA1* e outra em *BRCA2*. Embora esta seja uma condição rara (Rebbeck *et al.*, 2016), a identificação destes casos traz implicações diretas no manejo das famílias, uma vez que ambas as linhagens materna e paterna devem receber aconselhamento genético e testagem apropriados. Mais especificamente, a descrição de um indivíduo portador de uma mutação de ponto em um gene e uma grande deleção em outro reforça a necessidade de uma análise simultânea de ambos os genes, incluindo não só sequenciamento, mas também MLPA. Neste âmbito, a testagem escalonada determinada pela ANS em seu rol de procedimentos atual (ANS, 2016), impõe uma limitação significativa na identificação destes casos. Espera-se que esta restrição possa ser revista para a próxima edição do rol (2018).

Além de *BRCA1* e *BRCA2*, a contribuição de genes de penetrância alta e moderada, tais como *CHD1*, *PALB2*, *PTEN*, *TP53*, *STK11*, *CHEK2* e *ATM*, na predisposição hereditária ao câncer de mama e/ou ovário é incontestável (Easton *et al.*, 2015). Apesar disso, pouco se sabe sobre a contribuição destes genes em famílias brasileiras com critérios clínicos HBOC. No Capítulo VII – Artigo 5, a análise do perfil mutacional de indivíduos com estes critérios, testados através de painéis multigênicos por sequenciamento de nova geração, revelou que uma importante contribuição de outros genes (genes não-*BRCA*) no fenótipo HBOC. Embora a maior parte das mutações patogênicas tenha sido identificada em genes para os quais há diretrizes de manejo específicas, a presença de mutações em genes para os quais não há uma definição clara de manejo representa um grande desafio clínico.

No contexto do câncer hereditário, as diretrizes da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) recomendam que o teste genético deve ser oferecido quando 1) a história pessoal ou familiar é sugestiva de uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer, 2) o teste pode ser adequadamente interpretado, e 3) os resultados do teste irão auxiliar no diagnóstico ou manejo

clínico do paciente e/ou seus familiares em risco (ASCO, 2003; Robson *et al.*, 2015). Assim, é imperativo que os médicos solicitantes estejam atentos para as limitações e desvantagens dos testes genéticos (especialmente no caso painéis multigênicos). Do mesmo modo, os indivíduos testados também devem ser advertidos sobre as possibilidades de resultado, uma vez que estes podem, por vezes, trazer mais dúvidas do que esclarecimentos.

O Artigo 5 mostrou, ainda, que o número de variantes de significado incerto (VUS) detectadas é proporcional à quantidade de genes sequenciados. A identificação de uma VUS é um risco importante e um resultado comum em testes genéticos. Mais uma vez, é fundamental que tanto o paciente quanto o médico estejam cientes de seu significado, e que nenhuma medida terapêutica seja baseada na identificação desta variante. Ainda, é importante ressaltar que de acordo com as diretrizes da NCCN, a testagem de VUS em familiares não deve ser realizada com um propósito clínico (NCCN, 2017). Além disso, a classificação de uma variante como “VUS” é transitória, até que hajam estudos e evidências suficientes para estabelecer uma classificação mais precisa. Embora a maior parte das VUS seja reclassificada como “variante benigna” (Hall *et al.*, 2009), eventualmente estas variantes podem ser reclassificadas como “patogênicas” (Hall *et al.*, 2014).

No Artigo 6 – Capítulo IX, revisamos o papel de alguns genes de predisposição ao câncer de mama e/ou ovário. Os genes mais frequentemente mutados em indivíduos HBOC são, além de *BRCA1* e *BRCA2*, aqueles envolvidos em vias de reparo a danos ao DNA, especialmente a via de recombinação homóloga (Nielsen *et al.*, 2016). Recentemente, estudos tem demonstrado que a perda de função destes genes leva a um fenótipo muito semelhante àquele observado em células com perda de função de BRCA, chamado de “*BRCAness*” (Mutter *et al.*, 2017; Polak *et al.*, 2017). É possível, por tanto, que tumores com estas características também sejam sensíveis ao tratamento com inibidores de PARP, assim como o são os tumores defectivos em *BRCA*.

11.2. Caracterização do repertório de alterações somáticas dos tumores de mama relacionado à síndrome de Li-Fraumeni

Depois das mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, mutações germinativas em *TP53* são uma das principais causas de predisposição ao câncer de mama, especialmente em mulheres diagnosticadas em idade jovem, tipicamente antes dos 35 anos (Lalloo *et al.*, 2006). Estas mutações predispõem ao desenvolvimento de diversos tumores, e são a causa da síndrome de Li-Fraumeni (Malkin *et al.*, 1990). De acordo com as diretrizes oficiais (NCCN, 2017), mesmo na ausência de história familiar de câncer, mulheres diagnosticadas com câncer de mama antes dos 31 anos devem ser testadas para mutações em *TP53*. Enquanto o panorama de mutações germinativas de *TP53* em pacientes com critérios clínicos da síndrome de Li-Fraumeni está bem caracterizado (Bouaoun *et al.*, 2016), não há nenhum estudo avaliando as alterações somáticas envolvidas no desenvolvimento destes tumores.

Os dados apresentados no Capítulo X – Artigo 7, ainda que preliminares, mostram que embora não haja mutações recorrentes significativas nestes tumores, os mesmos são caracterizados por uma alta carga mutacional, quando comparados à tumores esporádicos da mama. Da mesma forma, a análise das assinaturas mutacionais revelou resultados surpreendentes. O conceito de “assinaturas mutacionais” foi definido a partir da observação de padrões de mutações ao longo do genoma. Essas mutações são uma consequência de diversos tipos de dano ao DNA, bem como da atuação de diferentes mecanismos de reparo. Estes eventos deixam marcas no genoma, também chamadas de “cicatrizes”, ou assinaturas genômicas (Alexandrov *et al.*, 2013). As assinaturas são construídas com base na frequência de 96 combinações de trinucleotídeos (formados pela mutação em si, combinada com bases imediatamente adjacentes, nas posições 3' e 5'), distribuídos no genoma (Helleday *et al.*, 2014). Nos tumores avaliados no presente trabalho, foram identificadas assinaturas jamais descritas em tumores de mama. Além disso, os resultados do Artigo 7 mostram que os tumores relacionados à mutações germinativas em *TP53* tem uma contribuição importante da assinatura 3, que historicamente tem sido associada a tumores com

perda de função dos genes *BRCA*, e defeitos na via de recombinação homóloga (Nik-Zainal *et al.*, 2016; Polak *et al.*, 2017). Quando analisados em conjunto com outros dados, estes achados sugerem que estes tumores podem ser deficientes na via de recombinação homóloga. Embora análises adicionais ainda sejam necessárias para obter uma conclusão definitiva, este estudo é o primeiro passo para caracterizar estes tumores e potencialmente identificar alterações passíveis de tratamento com drogas alvo e tratamentos personalizados.

Capítulo XII – Perspectivas

12. Perspectivas

Os resultados apresentados neste trabalho trazem uma importante contribuição ao panorama do câncer hereditário no Brasil, especialmente no que diz respeito à síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário. Neste cenário, no entanto, muitas questões ainda permanecem sem resposta, e abrem perspectivas para o desenvolvimento de novos trabalhos. Entre as possibilidades, destacamos:

- a) A criação de uma base de dados de abrangência nacional, destinada à compilação de informações sobre variantes germinativas em genes de predisposição ao câncer, e sobre o contexto clínico onde a variante foi identificada, facilitando a identificação de variantes recorrentes e a correlação genótipo-fenótipo;
- b) Avaliação da sensibilidade e especificidade dos critérios de seleção de um grupo mais abrangente de portadores de mutações em BRCA1 e BRCA2 (registrados sistematicamente na proposição acima), de modo a permitir a identificação, em nível nacional, de um conjunto de critérios relacionados à alta probabilidade mutacional;
- c) Desenvolvimento de uma estratégia multidisciplinar de diagnóstico de câncer de mama e ovário hereditários, englobando a identificação de famílias em risco (utilizando um conjunto de critérios uniformes), realização de teste genético abrangente e aconselhamento genético;
- d) Elaboração de um protocolo sistemático para elucidação de patogenicidade das variantes de significado incerto, incluindo abordagens *in silico* e funcionais (*in vivo* e *in vitro*);
- e) Ampliação da análise com painéis multigênicos, possibilitando a elucidação do que seria um painel adequado ao perfil mutacional relacionado ao

câncer de mama hereditário em nossa população.

Além disso, o trabalho caracterizando o perfil somático de tumores de mama abre caminhos para diversos projetos, visando:

- a) A caracterização de um grupo maior de tumores, de modo a favorecer a identificação de alterações recorrentes;
- b) Avaliação de processos biológicos específicos nestes tumores, como cromotripse e kataegis;
- c) Comparação entre o perfil dos tumores de portadores de mutações germinativas clássicas de *TP53* e os tumores de portadores de R337H;
- d) Comparação entre o perfil dos tumores de portadores de mutações germinativas clássicas de *TP53*, e o perfil de tumores esporádicos.

Assim, embora esta Tese de Doutorado se encerre, ela abre perspectivas e revela algumas das grandes necessidades e desafios que permeiam a esfera do câncer hereditário no Brasil, onde ainda há muito a ser feito tanto no contexto clínico, quanto na pesquisa básica e aplicada.

Capítulo XIII – Referências Bibliográficas

13. Referências bibliográficas

- Achatz, M. I., Olivier, M., Le Calvez, F., Martel-Planche, G., Lopes, A., Rossi, B. M., *et al.* (2007). The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett* **245**, 96-102.
- Alexandrov, L. B., Nik-Zainal, S., Wedge, D. C., Aparicio, S. A., Behjati, S., Biankin, A. V., *et al.* (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415-21.
- Alvarez, C., Tapia, T., Perez-Moreno, E., Gajardo-Meneses, P., Ruiz, C., Rios, M., *et al.* (2017). BRCA1 and BRCA2 founder mutations account for 78% of germline carriers among hereditary breast cancer families in Chile. *Oncotarget* **8**, 74233-74243.
- Amadou, A., Waddington Achatz, M. I. & Hainaut, P. (2017). Revisiting tumor patterns and penetrance in germline TP53 mutation carriers: temporal phases of Li-Fraumeni syndrome. *Curr Opin Oncol*.
- ANS (2016). Rol de procedimentos e eventos em saúde. Resolução Normativa - RN nº 387, de 28 de outubro de 2015. Diretrizes de utilização para cobertura de procedimentos na saúde suplementar - Anexo II - Tópico 110.7. Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS; Brazilian National Supplementary Health Insurance Agency).
- Antoniou, A., Pharoah, P. D., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., *et al.* (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* **72**, 1117-30.
- ANVISA (2017). Tratamento de câncer de ovário ganha novo medicamento. Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- Apostolou, P. Fostira, F. (2013). Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. *Biomed Res Int* **2013**, 747318.
- ASBS (2012). Position statement on BRCA genetic testing for patients with and without breast cancer. The American Society of Breast Surgeons (ASBS), <https://www.breastsurgeons.org>.
- ASCO (1996). Statement of the American Society of Clinical Oncology: genetic testing for cancer susceptibility, Adopted on February 20, 1996. *J Clin Oncol* **14**, 1730-6; discussion 1737-40.
- ASCO (2003). American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol* **21**, 2397-406.
- Assumpção, J. G., Seidinger, A. L., Mastellaro, M. J., Ribeiro, R. C., Zambetti, G. P., Ganti, R., *et al.* (2008). Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. *BMC Cancer* **8**, 357.
- Balmaña, J., Díez, O., Rubio, I. T., Cardoso, F. & Group, E. G. W. (2011). BRCA in breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Ann Oncol* **22 Suppl 6**,

vi31-4.

- Bieging, K. T., Mello, S. S. & Attardi, L. D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer* **14**, 359-70.
- Birch, J. M., Blair, V., Kelsey, A. M., Evans, D. G., Harris, M., Tricker, K. J., *et al.* (1998). Cancer phenotype correlates with constitutional TP53 genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome. *Oncogene* **17**, 1061-8.
- Birch, J. M., Hartley, A. L., Tricker, K. J., Prosser, J., Condie, A., Kelsey, A. M., *et al.* (1994). Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* **54**, 1298-304.
- Bouaoun, L., Sonkin, D., Ardin, M., Hollstein, M., Byrnes, G., Zavadil, J., *et al.* (2016). TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum Mutat* **37**, 865-76.
- Broca, P. (1866). *Traité des Tumeurs*. Ed. Asselin, P, Paris.
- Bryant, H. E., Schultz, N., Thomas, H. D., Parker, K. M., Flower, D., Lopez, E., *et al.* (2005). Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* **434**, 913-7.
- Buys, S. S., Sandbach, J. F., Gammon, A., Patel, G., Kidd, J., Brown, K. L., *et al.* (2017). A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer* **123**, 1721-1730.
- Cancer Genome Atlas, N. (2012). Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **490**, 61-70.
- Cannistra, S. A. (2004). Cancer of the ovary. *N Engl J Med* **351**, 2519-29.
- Carraro, D. M., Koike Folgueira, M. A., Garcia Lisboa, B. C., Ribeiro Olivieri, E. H., Vitorino Krepischi, A. C., de Carvalho, A. F., *et al.* (2013). Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. *PLoS One* **8**, e57581.
- Carvalho, M. A., Couch, F. J. & Monteiro, A. N. (2007). Functional assays for BRCA1 and BRCA2. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 298-310.
- Castéra, L., Krieger, S., Rousselin, A., Legros, A., Baumann, J. J., Bruet, O., *et al.* (2014). Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. *Eur J Hum Genet* **22**, 1305-13.
- Cecilio, A. P., Takakura, E. T., Jumes, J. J., Dos Santos, J. W., Herrera, A. C., Victorino, V. J., *et al.* (2015). Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. *Breast Cancer (Dove Med Press)* **7**, 43-9.
- CGHFBC (2001). Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* **358**, 1389-99.
- Chen, S. & Parmigiani, G. (2007). Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. *J Clin Oncol* **25**, 1329-33.
- Crawford, B., Adams, S. B., Sittler, T., van den Akker, J., Chan, S., Leitner, O., *et*

- al.* (2017). Multi-gene panel testing for hereditary cancer predisposition in unsolved high-risk breast and ovarian cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **163**, 383-390.
- Cummings, S. R., Eckert, S., Krueger, K. A., Grady, D., Powles, T. J., Cauley, J. A., *et al.* (1999). The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *JAMA* **281**, 2189-97.
- Custodio, G., Taques, G. R., Figueiredo, B. C., Gugelmin, E. S., Oliveira Figueiredo, M. M., Watanabe, F., *et al.* (2011). Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline TP53 R337H mutation in southern Brazil. *PLoS One* **6**, e18015.
- Custódio, G., Parise, G. A., Kiesel Filho, N., Komechen, H., Sabbaga, C. C., Rosati, R., *et al.* (2013). Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *J Clin Oncol* **31**, 2619-26.
- Cuzick, J., Sestak, I., Bonanni, B., Costantino, J. P., Cummings, S., DeCensi, A., *et al.* (2013). Selective oestrogen receptor modulators in prevention of breast cancer: an updated meta-analysis of individual participant data. *Lancet* **381**, 1827-34.
- de Andrade, K. C., Mirabello, L., Stewart, D. R., Karlins, E., Koster, R., Wang, M., *et al.* (2017). Higher-than-expected population prevalence of potentially pathogenic germline TP53 variants in individuals unselected for cancer history. *Hum Mutat* **38**, 1723-1730.
- de Gouvea, H. (1886). L'Hérédité des gliomes de la retine. *Boletins da Sociedade de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro* **Aug 25**.
- de Gouvêa, H. (1910). L'Hérédité des gliomes de la retine. *Ann d'Occul* **143**, 103-44.
- Dillenburg, C. V., Bandeira, I. C., Tubino, T. V., Rossato, L. G., Dias, E. S., Bittelbrunn, A. C., *et al.* (2012). Prevalence of 185delAG and 5382insC mutations in BRCA1, and 6174delT in BRCA2 in women of Ashkenazi Jewish origin in southern Brazil. *Genet Mol Biol* **35**, 599-602.
- Domchek, S. M., Friebel, T. M., Neuhausen, S. L., Wagner, T., Evans, G., Isaacs, C., *et al.* (2006). Mortality after bilateral salpingo-oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a prospective cohort study. *Lancet Oncol* **7**, 223-9.
- Domchek, S. M., Friebel, T. M., Singer, C. F., Evans, D. G., Lynch, H. T., Isaacs, C., *et al.* (2010). Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *JAMA* **304**, 967-75.
- Domchek, S. M., Tang, J., Stopfer, J., Lilli, D. R., Hamel, N., Tischkowitz, M., *et al.* (2013). Biallelic deleterious BRCA1 mutations in a woman with early-onset ovarian cancer. *Cancer Discov* **3**, 399-405.
- Dufloth, R. M., Carvalho, S., Heinrich, J. K., Shinzato, J. Y., dos Santos, C. C.,

- Zeferino, L. C., *et al.* (2005). Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. *Sao Paulo Med J* **123**, 192-7.
- Easton, D. F., Pharoah, P. D., Antoniou, A. C., Tischkowitz, M., Tavtigian, S. V., Nathanson, K. L., *et al.* (2015). Gene-panel sequencing and the prediction of breast-cancer risk. *N Engl J Med* **372**, 2243-57.
- Eeles, R. A. (1995). Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv* **25**, 101-24.
- Eisinger, F., Charafe-Jauffret, E., Jacquemier, J., Birnbaum, D., Julian-Reynier, C. & Sobol, H. (2001). Tamoxifen and breast cancer risk in women harboring a BRCA1 germline mutation: computed efficacy, effectiveness and impact. *Int J Oncol* **18**, 5-10.
- Eliade, M., Skrzypski, J., Baurand, A., Jacquot, C., Bertolone, G., Loustalot, C., *et al.* (2017). The transfer of multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer to healthcare: What are the implications for the management of patients and families? *Oncotarget* **8**, 1957-1971.
- EMA (2014). pp. European Medicines Agency. EMA.
- Esteves, V. F., Thuler, L. C., Amêndola, L. C., Koifman, R. J., Koifman, S., Frankel, P. P., *et al.* (2009). 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* **42**, 453-7.
- Euhus, D. M. Robinson, L. (2013). Genetic predisposition syndromes and their management. *Surg Clin North Am* **93**, 341-62.
- Evans, D. G., Eccles, D. M., Rahman, N., Young, K., Bulman, M., Amir, E., *et al.* (2004). A new scoring system for the chances of identifying a BRCA1/2 mutation outperforms existing models including BRCAPRO. *J Med Genet* **41**, 474-80.
- Ewald, I. P., Izetti, P., Vargas, F. R., Moreira, M. A., Moreira, A. S., Moreira-Filho, C. A., *et al.* (2011). Prevalence of the BRCA1 founder mutation c.5266dup in Brazilian individuals at-risk for the hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *Hered Cancer Clin Pract* **9**, 12.
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C. J., Tutt, A. N., Johnson, D. A., Richardson, T. B., *et al.* (2005). Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature* **434**, 917-21.
- Fearon, E. R. Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* **61**, 759-67.
- Felix, G. E., Abe-Sandes, C., Machado-Lopes, T. M., Bomfim, T. F., Guindalini, R. S. C., Santos, V. C. S., *et al.* (2014). Germline mutations in BRCA1, BRCA1, CHEK2 and TP53 in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population, Vol. 1. Human Genome Variation.
- Fernandes, G. C., Michelli, R. A., Galvão, H. C., Paula, A. E., Pereira, R., Andrade, C. E., *et al.* (2016). Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a

- Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. *Oncotarget*.
- Figueiredo, B. C., Sandrini, R., Zambetti, G. P., Pereira, R. M., Cheng, C., Liu, W., *et al.* (2006). Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet* **43**, 91-6.
- Finch, A., Beiner, M., Lubinski, J., Lynch, H. T., Moller, P., Rosen, B., *et al.* (2006). Salpingo-oophorectomy and the risk of ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancers in women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *JAMA* **296**, 185-92.
- Fitarelli-Kiehl, M., Giacomazzi, J., Santos-Silva, P., Graudenz, M. S., Palmero, E. I., Michelli, R. A., *et al.* (2015). The breast cancer immunophenotype of TP53-p.R337H carriers is different from that observed among other pathogenic TP53 mutation carriers. *Fam Cancer* **14**, 333-6.
- Fong, P. C., Boss, D. S., Yap, T. A., Tutt, A., Wu, P., Mergui-Roelvink, M., *et al.* (2009). Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med* **361**, 123-34.
- Foulkes, W. D. (2008). Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med* **359**, 2143-53.
- Foulkes, W. D., Goffin, J., Brunet, J. S., Bégin, L. R., Wong, N. & Chappuis, P. O. (2002). Tamoxifen may be an effective adjuvant treatment for BRCA1-related breast cancer irrespective of estrogen receptor status. *J Natl Cancer Inst* **94**, 1504-6.
- Frank, T. S., Deffenbaugh, A. M., Reid, J. E., Hulick, M., Ward, B. E., Lingenfelter, B., *et al.* (2002). Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. *J Clin Oncol* **20**, 1480-90.
- Freitas-Junior, R., Gonzaga, C. M., Freitas, N. M., Martins, E. & Dardes, R. e. C. (2012). Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009. *Clinics (Sao Paulo)* **67**, 731-7.
- Garritano, S., Gemignani, F., Palmero, E. I., Olivier, M., Martel-Planche, G., Le Calvez-Kelm, F., *et al.* (2010). 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* **31**, 143-50.
- Giacomazzi, J., Graudenz, M. S., Osorio, C. A., Koehler-Santos, P., Palmero, E. I., Zagonel-Oliveira, M., *et al.* (2014). Prevalence of the TP53 p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. *PLoS One* **9**, e99893.
- Giuliano, A. E., Boolbol, S., Degnim, A., Kuerer, H., Leitch, A. M. & Morrow, M. (2007). Society of Surgical Oncology: position statement on prophylactic mastectomy. Approved by the Society of Surgical Oncology Executive Council, March 2007. *Ann Surg Oncol* **14**, 2425-7.
- Gomes, M. C., Costa, M. M., Borojevic, R., Monteiro, A. N., Vieira, R., Koifman, S., *et al.* (2007). Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer

- patients from Brazil. *Breast Cancer Res Treat* **103**, 349-53.
- Gomes, M. C., Kotsopoulos, J., de Almeida, G. L., Costa, M. M., Vieira, R., Filho, F. e. A., *et al.* (2012). The R337H mutation in TP53 and breast cancer in Brazil. *Hered Cancer Clin Pract* **10**, 3.
- Gonzaga, C. M., Freitas-Junior, R., Curado, M. P., Sousa, A. L., Souza-Neto, J. A. & Souza, M. R. (2015). Temporal trends in female breast cancer mortality in Brazil and correlations with social inequalities: ecological time-series study. *BMC Public Health* **15**, 96.
- Gonzalez, K. D., Buzin, C. H., Noltner, K. A., Gu, D., Li, W., Malkin, D., *et al.* (2009). High frequency of de novo mutations in Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet* **46**, 689-93.
- Grindedal, E. M., Heramb, C., Karsrud, I., Ariansen, S. L., Mæhle, L., Undlien, D. E., *et al.* (2017). Current guidelines for BRCA testing of breast cancer patients are insufficient to detect all mutation carriers. *BMC Cancer* **17**, 438.
- Gronwald, J., Tung, N., Foulkes, W. D., Offit, K., Gershoni, R., Daly, M., *et al.* (2006). Tamoxifen and contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 carriers: an update. *Int J Cancer* **118**, 2281-4.
- Hall, M. J., Forman, A. D., Pilarski, R., Wiesner, G. & Giri, V. N. (2014). Gene panel testing for inherited cancer risk. *J Natl Compr Canc Netw* **12**, 1339-46.
- Hall, M. J., Reid, J. E., Burbidge, L. A., Pruss, D., Deffenbaugh, A. M., Frye, C., *et al.* (2009). BRCA1 and BRCA2 mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer. *Cancer* **115**, 2222-33.
- Helleday, T., Eshtad, S. & Nik-Zainal, S. (2014). Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat Rev Genet* **15**, 585-98.
- Hirsch, D., Kemmerling, R., Davis, S., Camps, J., Meltzer, P. S., Ried, T., *et al.* (2013). Chromothripsis and focal copy number alterations determine poor outcome in malignant melanoma. *Cancer Res* **73**, 1454-60.
- Howlett, N. G., Taniguchi, T., Olson, S., Cox, B., Waisfisz, Q., De Die-Smulders, C., *et al.* (2002). Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* **297**, 606-9.
- IARC (2012). GLOBOCAN 2012 (I. A. f. R. o. Cancer, Ed.). International Agency for Cancer Research (IARC), Lyon, France.
- IARC (2017). Global Cancer Observatory - International Agency for Cancer Research (IARC). World Health Organization (WHO), Lyon, France.
- IBGE (2007). *Brasil: 500 anos de povoamento*. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Rio de Janeiro.
- ICR (2015). Protocol 2 - BRCA1 and BRCA2 mutation testing guidelines. The Institute of Cancer Research (ICR) and The Royal Marsden NHS Found Trust, <http://www.icr.ac.uk/protocols>.
- INCA (2016). *Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil*. Instituto Nacional de Câncer - Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, Brasil.

- INCA (2017). Sistema de Informação sobre Mortalidade Rio de Janeiro, Brasil.
- Kamihara, J., Rana, H. Q. & Garber, J. E. (2014). Germline TP53 mutations and the changing landscape of Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* **35**, 654-62.
- Kandoth, C., McLellan, M. D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., *et al.* (2013). Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* **502**, 333-9.
- Kast, K., Rhiem, K., Wappenschmidt, B., Hahnen, E., Hauke, J., Bluemcke, B., *et al.* (2016). Prevalence of BRCA1/2 germline mutations in 21 401 families with breast and ovarian cancer. *J Med Genet* **53**, 465-71.
- Kasthuber, E. R. Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell* **170**, 1062-1078.
- Kauff, N. D., Satagopan, J. M., Robson, M. E., Scheuer, L., Hensley, M., Hudis, C. A., *et al.* (2002). Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* **346**, 1609-15.
- Kim, G., Ison, G., McKee, A. E., Zhang, H., Tang, S., Gwise, T., *et al.* (2015). FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy. *Clin Cancer Res* **21**, 4257-61.
- King, M. C., Wieand, S., Hale, K., Lee, M., Walsh, T., Owens, K., *et al.* (2001). Tamoxifen and breast cancer incidence among women with inherited mutations in BRCA1 and BRCA2: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP-P1) Breast Cancer Prevention Trial. *JAMA* **286**, 2251-6.
- Knudson, A. G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**, 820-3.
- Kratz, C. P., Achatz, M. I., Brugières, L., Frebourg, T., Garber, J. E., Greer, M. C., *et al.* (2017). Cancer Screening Recommendations for Individuals with Li-Fraumeni Syndrome. *Clin Cancer Res* **23**, e38-e45.
- Kuchenbaecker, K. B., Hopper, J. L., Barnes, D. R., Phillips, K. A., Mooij, T. M., Roos-Blom, M. J., *et al.* (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA* **317**, 2402-2416.
- Laloo, F., Varley, J., Ellis, D., Moran, A., O'Dair, L., Pharoah, P., *et al.* (2003). Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. *Lancet* **361**, 1101-2.
- Laloo, F., Varley, J., Moran, A., Ellis, D., O'dair, L., Pharoah, P., *et al.* (2006). BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. *Eur J Cancer* **42**, 1143-50.
- Latronico, A. C., Pinto, E. M., Domenice, S., Fragoso, M. C., Martin, R. M., Zerbini, M. C., *et al.* (2001). An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **86**,

- 4970-3.
- Le, D. T., Durham, J. N., Smith, K. N., Wang, H., Bartlett, B. R., Aulakh, L. K., *et al.* (2017). Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science* **357**, 409-413.
- Lee, A. J., Cunningham, A. P., Kuchenbaecker, K. B., Mavaddat, N., Easton, D. F., Antoniou, A. C., *et al.* (2014). BOADICEA breast cancer risk prediction model: updates to cancer incidences, tumour pathology and web interface. *Br J Cancer* **110**, 535-45.
- Lee, D. S., Yoon, S. Y., Looi, L. M., Kang, P., Kang, I. N., Sivanandan, K., *et al.* (2012). Comparable frequency of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutations in a multi-ethnic Asian cohort suggests TP53 screening should be offered together with BRCA1/2 screening to early-onset breast cancer patients. *Breast Cancer Res* **14**, R66.
- Levy-Lahad, E., Friedman, E. (2007). Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer* **96**, 11-5.
- Li, F. P., Fraumeni, J. F. (1969). Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* **71**, 747-52.
- Li, F. P., Fraumeni, J. F., Mulvihill, J. J., Blattner, W. A., Dreyfus, M. G., Tucker, M. A., *et al.* (1988). A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* **48**, 5358-62.
- Lin, P. H., Kuo, W. H., Huang, A. C., Lu, Y. S., Lin, C. H., Kuo, S. H., *et al.* (2016). Multiple gene sequencing for risk assessment in patients with early-onset or familial breast cancer. *Oncotarget* **7**, 8310-20.
- Lincoln, S. E., Kobayashi, Y., Anderson, M. J., Yang, S., Desmond, A. J., Mills, M. A., *et al.* (2015). A Systematic Comparison of Traditional and Multigene Panel Testing for Hereditary Breast and Ovarian Cancer Genes in More Than 1000 Patients. *J Mol Diagn* **17**, 533-44.
- Lindor, N. M., McMaster, M. L., Lindor, C. J., Greene, M. H. & National Cancer Institute, D. o. C. P., Community Oncology and Prevention Trials Research Group (2008). Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes - second edition. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 1-93.
- Lippman, M. E., Cummings, S. R., Disch, D. P., Mershon, J. L., Dowsett, S. A., Cauley, J. A., *et al.* (2006). Effect of raloxifene on the incidence of invasive breast cancer in postmenopausal women with osteoporosis categorized by breast cancer risk. *Clin Cancer Res* **12**, 5242-7.
- Lord, C. J., Ashworth, A. (2017). PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic. *Science* **355**, 1152-1158.
- Lourenço, J. J., Vargas, F. R., Bines, J., Santos, E. M., Lasmar, C. A., Costa, C. H., *et al.* (2004). BRCA1 mutations in Brazilian patients, Vol. 27, pp. 500-504. *Genetics and Molecular Biology*.
- Lu, K. H., Wood, M. E., Daniels, M., Burke, C., Ford, J., Kauff, N. D., *et al.* (2014). American Society of Clinical Oncology Expert Statement: collection and use

- of a cancer family history for oncology providers. *J Clin Oncol* **32**, 833-40.
- Lynch, H. T., Shaw, M. W., Magnuson, C. W., Larsen, A. L. & Krush, A. J. (1966). Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med* **117**, 206-12.
- Lynch, H. T., Watson, P. & Narod, S. A. (1999). The genetic epidemiology of male breast carcinoma. *Cancer* **86**, 744-6.
- Machado, P. M., Brandão, R. D., Cavaco, B. M., Eugénio, J., Bento, S., Nave, M., *et al.* (2007). Screening for a BRCA2 rearrangement in high-risk breast/ovarian cancer families: evidence for a founder effect and analysis of the associated phenotypes. *J Clin Oncol* **25**, 2027-34.
- Magrangeas, F., Avet-Loiseau, H., Munshi, N. C. & Minvielle, S. (2011). Chromothripsis identifies a rare and aggressive entity among newly diagnosed multiple myeloma patients. *Blood* **118**, 675-8.
- Mai, P. L., Best, A. F., Peters, J. A., DeCastro, R. M., Khincha, P. P., Loud, J. T., *et al.* (2016). Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. *Cancer* **122**, 3673-3681.
- Maistro, S., Teixeira, N., Encinas, G., Katayama, M. L., Niewiadonski, V. D., Cabral, L. G., *et al.* (2016). Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in epithelial ovarian cancer patients in Brazil. *BMC Cancer* **16**, 934.
- Malkin, D. (2011). Li-fraumeni syndrome. *Genes Cancer* **2**, 475-84.
- Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J. F., Nelson, C. E., Kim, D. H., *et al.* (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**, 1233-8.
- Marshall, C. (1897). Notes on glioma retinae. *Roy London Ophth Hosp Rep* **14**, 456-77.
- Masciari, S., Dillon, D. A., Rath, M., Robson, M., Weitzel, J. N., Balmana, J., *et al.* (2012). Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort. *Breast Cancer Res Treat* **133**, 1125-30.
- Mauer, C. B., Pirzadeh-Miller, S. M., Robinson, L. D. & Euhus, D. M. (2014). The integration of next-generation sequencing panels in the clinical cancer genetics practice: an institutional experience. *Genet Med* **16**, 407-12.
- Mavaddat, N., Antoniou, A. C., Easton, D. F. & Garcia-Closas, M. (2010). Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol Oncol* **4**, 174-91.
- Mavaddat, N., Peock, S., Frost, D., Ellis, S., Platte, R., Fineberg, E., *et al.* (2013). Cancer risks for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from prospective analysis of EMBRACE. *J Natl Cancer Inst* **105**, 812-22.
- Maxwell, K. N., Wubbenhorst, B., Wenz, B. M., De Sloover, D., Pluta, J., Emery, L., *et al.* (2017). BRCA locus-specific loss of heterozygosity in germline BRCA1 and BRCA2 carriers. *Nat Commun* **8**, 319.
- McPherson, K., Steel, C. M. & Dixon, J. M. (2000). ABC of breast diseases. Breast

- cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* **321**, 624-8.
- Meijers-Heijboer, H., van Geel, B., van Putten, W. L., Henzen-Logmans, S. C., Seynaeve, C., Menke-Pluymers, M. B., *et al.* (2001). Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* **345**, 159-64.
- Meindl, A., Ditsch, N., Kast, K., Rhiem, K. & Schmutzler, R. K. (2011). Hereditary breast and ovarian cancer: new genes, new treatments, new concepts. *Dtsch Arztebl Int* **108**, 323-30.
- Melhem-Bertrandt, A., Bojadzieva, J., Ready, K. J., Obeid, E., Liu, D. D., Gutierrez-Barrera, A. M., *et al.* (2012). Early onset HER2-positive breast cancer is associated with germline TP53 mutations. *Cancer* **118**, 908-13.
- Mersch, J., Jackson, M. A., Park, M., Nebgen, D., Peterson, S. K., Singletary, C., *et al.* (2015). Cancers associated with BRCA1 and BRCA2 mutations other than breast and ovarian. *Cancer* **121**, 269-75.
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., *et al.* (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* **266**, 66-71.
- Millot, G. A., Carvalho, M. A., Caputo, S. M., Vreeswijk, M. P., Brown, M. A., Webb, M., *et al.* (2012). A guide for functional analysis of BRCA1 variants of uncertain significance. *Hum Mutat* **33**, 1526-37.
- Molenaar, J. J., Koster, J., Zwijnenburg, D. A., van Sluis, P., Valentijn, L. J., van der Ploeg, I., *et al.* (2012). Sequencing of neuroblastoma identifies chromothripsis and defects in neuritogenesis genes. *Nature* **483**, 589-93.
- Monteiro, A. N. Waizbort, R. (2007). The accidental cancer geneticist: hilário de gouvêa and hereditary retinoblastoma. *Cancer Biol Ther* **6**, 811-3.
- Moran, A., O'Hara, C., Khan, S., Shack, L., Woodward, E., Maher, E. R., *et al.* (2012). Risk of cancer other than breast or ovarian in individuals with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Fam Cancer* **11**, 235-42.
- Murphy, C. G. Moynahan, M. E. (2010). BRCA gene structure and function in tumor suppression: a repair-centric perspective. *Cancer J* **16**, 39-47.
- Mutter, R. W., Riaz, N., Ng, C. K., Delsite, R., Piscuoglio, S., Edelweiss, M., *et al.* (2017). Bi-allelic alterations in DNA repair genes underpin homologous recombination DNA repair defects in breast cancer. *J Pathol* **242**, 165-177.
- Nanda, R., Schumm, L. P., Cummings, S., Fackenthal, J. D., Sveen, L., Ademuyiwa, F., *et al.* (2005). Genetic testing in an ethnically diverse cohort of high-risk women: a comparative analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in American families of European and African ancestry. *JAMA* **294**, 1925-33.
- Narod, S. A., Brunet, J. S., Ghadirian, P., Robson, M., Heimdal, K., Neuhausen, S. L., *et al.* (2000). Tamoxifen and risk of contralateral breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a case-control study. Hereditary Breast Cancer Clinical Study Group. *Lancet* **356**, 1876-81.

- Narod, S. A., Foulkes, W. D. (2004). BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* **4**, 665-76.
- NCCN (2017). Clinical Practice Guidelines in Oncology. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. Hereditary Breast and/or Ovarian Cancer. Version 1.2018. NCCN - National Comprehensive Cancer Network, <http://www.nccn.org>.
- NICE (2013). *Familial Breast Cancer: Classification and Care of People at Risk of Familial Breast Cancer and Management of Breast Cancer and Related Risks in People with a Family History of Breast Cancer. NICE Clinical Guidelines, No. 164*. National Collaborating Centre for Cancer (UK), United Kingdom.
- Nielsen, F. C., van Overeem Hansen, T. & Sørensen, C. S. (2016). Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. *Nat Rev Cancer* **16**, 599-612.
- Nik-Zainal, S., Davies, H., Staaf, J., Ramakrishna, M., Glodzik, D., Zou, X., *et al.* (2016). Landscape of somatic mutations in 560 breast cancer whole-genome sequences. *Nature* **534**, 47-54.
- O'Leary, E., Iacoboni, D., Holle, J., Michalski, S. T., Esplin, E. D., Yang, S., *et al.* (2017). Expanded Gene Panel Use for Women With Breast Cancer: Identification and Intervention Beyond Breast Cancer Risk. *Ann Surg Oncol*.
- Paim, J., Travassos, C., Almeida, C., Bahia, L. & Macinko, J. (2011). The Brazilian health system: history, advances, and challenges. *Lancet* **377**, 1778-97.
- Pal, T., Permut-Wey, J., Betts, J. A., Krischer, J. P., Fiorica, J., Arango, H., *et al.* (2005). BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer* **104**, 2807-16.
- Peixoto, A., Santos, C., Pinheiro, M., Pinto, P., Soares, M. J., Rocha, P., *et al.* (2011). International distribution and age estimation of the Portuguese BRCA2 c.156_157insAlu founder mutation. *Breast Cancer Res Treat* **127**, 671-9.
- Peixoto, A., Santos, C., Rocha, P., Pinheiro, M., Príncipe, S., Pereira, D., *et al.* (2009). The c.156_157insAlu BRCA2 rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious BRCA mutations in northern/central Portugal. *Breast Cancer Res Treat* **114**, 31-8.
- PennII (2017). The Penn II Risk Model. University of Pennsylvania - Abramson Cancer Center.
- Pinto, E. M., Chen, X., Easton, J., Finkelstein, D., Liu, Z., Pounds, S., *et al.* (2015). Genomic landscape of paediatric adrenocortical tumours. *Nat Commun* **6**, 6302.
- Polak, P., Kim, J., Braunstein, L. Z., Karlic, R., Haradhavala, N. J., Tiao, G., *et al.* (2017). A mutational signature reveals alterations underlying deficient homologous recombination repair in breast cancer. *Nat Genet* **49**, 1476-1486.

- Prakash, R., Zhang, Y., Feng, W. & Jasin, M. (2015). Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a016600.
- Radice, P., De Summa, S., Caleca, L. & Tommasi, S. (2011). Unclassified variants in BRCA genes: guidelines for interpretation. *Ann Oncol* **22 Suppl 1**, i18-23.
- Rausch, T., Jones, D. T., Zapatka, M., Stütz, A. M., Zichner, T., Weischenfeldt, J., *et al.* (2012). Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell* **148**, 59-71.
- Rebbeck, T. R., Friebel, T., Lynch, H. T., Neuhausen, S. L., van 't Veer, L., Garber, J. E., *et al.* (2004). Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group. *J Clin Oncol* **22**, 1055-62.
- Rebbeck, T. R. & Friebel, T. M. & Mitra, N. & Wan, F. & Chen, S. & Andrulis, I. L., *et al.* (2016). Inheritance of deleterious mutations at both BRCA1 and BRCA2 in an international sample of 32,295 women. *Breast Cancer Res* **18**, 112.
- Rebbeck, T. R., Kauff, N. D. & Domchek, S. M. (2009). Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* **101**, 80-7.
- Rebbeck, T. R., Lynch, H. T., Neuhausen, S. L., Narod, S. A., Van't Veer, L., Garber, J. E., *et al.* (2002). Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* **346**, 1616-22.
- Rebbeck, T. R. & Mitra, N. & Wan, F. & Sinilnikova, O. M. & Healey, S. & McGuffog, L., *et al.* (2015). Association of type and location of BRCA1 and BRCA2 mutations with risk of breast and ovarian cancer. *JAMA* **313**, 1347-61.
- Riaz, N., Blecua, P., Lim, R. S., Shen, R., Higginson, D. S., Weinhold, N., *et al.* (2017). Pan-cancer analysis of bi-allelic alterations in homologous recombination DNA repair genes. *Nat Commun* **8**, 857.
- Ribeiro, R. C., Sandrini, F., Figueiredo, B., Zambetti, G. P., Michalkiewicz, E., Lafferty, A. R., *et al.* (2001). An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9330-5.
- Risch, H. A., McLaughlin, J. R., Cole, D. E., Rosen, B., Bradley, L., Kwan, E., *et al.* (2001). Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* **68**, 700-10.
- Robson, M., Im, S. A., Senkus, E., Xu, B., Domchek, S. M., Masuda, N., *et al.* (2017). Olaparib for Metastatic Breast Cancer in Patients with a Germline BRCA Mutation. *N Engl J Med* **377**, 523-533.
- Robson, M. E., Bradbury, A. R., Arun, B., Domchek, S. M., Ford, J. M., Hampel, H. L., *et al.* (2015). American Society of Clinical Oncology Policy Statement

- Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility. *J Clin Oncol* **33**, 3660-7.
- Rocha-Brischiliari, S. C., Oliveira, R. R., Andrade, L., Brischiliari, A., Gravena, A. A., Carvalho, M. D., *et al.* (2017). The Rise in Mortality from Breast Cancer in Young Women: Trend Analysis in Brazil. *PLoS One* **12**, e0168950.
- Rode, A., Maass, K. K., Willmund, K. V., Lichter, P. & Ernst, A. (2016). Chromothripsis in cancer cells: An update. *Int J Cancer* **138**, 2322-33.
- Roukos, D. H. & Briasoulis, E. (2007). Individualized preventive and therapeutic management of hereditary breast ovarian cancer syndrome. *Nat Clin Pract Oncol* **4**, 578-90.
- Roy, R., Chun, J. & Powell, S. N. (2012). BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. *Nat Rev Cancer* **12**, 68-78.
- Rubin, S. C., Blackwood, M. A., Bandera, C., Behbakht, K., Benjamin, I., Rebbeck, T. R., *et al.* (1998). BRCA1, BRCA2, and hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene mutations in an unselected ovarian cancer population: relationship to family history and implications for genetic testing. *Am J Obstet Gynecol* **178**, 670-7.
- Ruijs, M. W., Verhoef, S., Rookus, M. A., Pruntel, R., van der Hout, A. H., Hogervorst, F. B., *et al.* (2010). TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *J Med Genet* **47**, 421-8.
- Ruiz-Linares, A., Adhikari, K., Acuña-Alonzo, V., Quinto-Sanchez, M., Jaramillo, C., Arias, W., *et al.* (2014). Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet* **10**, e1004572.
- Rummel, S. K., Lovejoy, L., Shriver, C. D. & Ellsworth, R. E. (2017). Contribution of germline mutations in cancer predisposition genes to tumor etiology in young women diagnosed with invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* **164**, 593-601.
- Sablina, A. A., Budanov, A. V., Ilyinskaya, G. V., Agapova, L. S., Kravchenko, J. E. & Chumakov, P. M. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat Med* **11**, 1306-13.
- Sawyer, S. L., Tian, L., Kähkönen, M., Schwartzenuber, J., Kircher, M., Majewski, J., *et al.* (2015). Biallelic mutations in BRCA1 cause a new Fanconi anemia subtype. *Cancer Discov* **5**, 135-42.
- Schroeder, C., Faust, U., Sturm, M., Hackmann, K., Grundmann, K., Harmuth, F., *et al.* (2015). HBOC multi-gene panel testing: comparison of two sequencing centers. *Breast Cancer Res Treat* **152**, 129-36.
- SEER (2017). The Surveillance, Epidemiology, and End Results - National Cancer Institute.
- Seidinger, A. L., Mastellaro, M. J., Paschoal Fortes, F., Godoy Assumpção, J.,

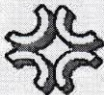
- Aparecida Cardinalli, I., Aparecida Ganazza, M., *et al.* (2011). Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in southeast Brazil. *Cancer* **117**, 2228-35.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. (2017). Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* **67**, 7-30.
- Silva, F. C., Lisboa, B. C., Figueiredo, M. C., Torrezan, G. T., Santos, E. M., Krepischi, A. C., *et al.* (2014). Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. *BMC Med Genet* **15**, 55.
- Southey, M. C., Park, D. J., Nguyen-Dumont, T., Campbell, I., Thompson, E., Trainer, A. H., *et al.* (2013). COMPLEXO: identifying the missing heritability of breast cancer via next generation collaboration. *Breast Cancer Res* **15**, 402.
- Stephens, P. J., Greenman, C. D., Fu, B., Yang, F., Bignell, G. R., Mudie, L. J., *et al.* (2011). Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* **144**, 27-40.
- Stewart, B. W. Wild, C. P. (2014). *World Cancer Report 2014*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.
- Strong, L. C., Williams, W. R. & Tainsky, M. A. (1992). The Li-Fraumeni syndrome: from clinical epidemiology to molecular genetics. *Am J Epidemiol* **135**, 190-9.
- SY, W. E., Shekar, S., Met-Domestici, M., Chan, C., Sze, M., Yap, Y. S., *et al.* (2016). Inherited breast cancer predisposition in Asians: multigene panel testing outcomes from Singapore. *Genomic Medicine* **1**.
- Tai, Y. C., Domchek, S., Parmigiani, G. & Chen, S. (2007). Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* **99**, 1811-4.
- Tavtigian, S. V., Simard, J., Rommens, J., Couch, F., Shattuck-Eidens, D., Neuhausen, S., *et al.* (1996). The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat Genet* **12**, 333-7.
- Thompson, E. R., Rowley, S. M., Li, N., McInerney, S., Devereux, L., Wong-Brown, M. W., *et al.* (2016). Panel Testing for Familial Breast Cancer: Calibrating the Tension Between Research and Clinical Care. *J Clin Oncol* **34**, 1455-9.
- Thompson, J. Knapp, H. (1874). Ein Fall von Retinalgliom, klinisch ausgezeichnet durch die klar nachweisbare Entstehung der Neubildung aus der inneren Körnerschicht. *Arch f Augenh* **4**, 79-82.
- Tinat, J., Bougeard, G., Baert-Desurmont, S., Vasseur, S., Martin, C., Bouvignies, E., *et al.* (2009). 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. *J Clin Oncol* **27**, e108-9; author reply e110.
- Tucker, T., Marra, M. & Friedman, J. M. (2009). Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *Am J Hum Genet* **85**, 142-54.

- van Asperen, C. J., Brohet, R. M., Meijers-Heijboer, E. J., Hoogerbrugge, N., Verhoef, S., Vasen, H. F., *et al.* (2005). Cancer risks in BRCA2 families: estimates for sites other than breast and ovary. *J Med Genet* **42**, 711-9.
- Varley, J. M. (2003). Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* **21**, 313-20.
- Villarreal-Garza, C., Alvarez-Gómez, R. M., Pérez-Plasencia, C., Herrera, L. A., Herzog, J., Castillo, D., *et al.* (2015). Significant clinical impact of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Mexico. *Cancer* **121**, 372-8.
- Vogel, V. G., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Cronin, W. M., Cecchini, R. S., Atkins, J. N., *et al.* (2010). Update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Study of Tamoxifen and Raloxifene (STAR) P-2 Trial: Preventing breast cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* **3**, 696-706.
- von Graefe, A. (1868). Zusätze über intraoculare Tumoren. *Arch f Opht* **14**, 103-44.
- Walsh, T., Casadei, S., Lee, M. K., Pennil, C. C., Nord, A. S., Thornton, A. M., *et al.* (2011). Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 18032-7.
- Wasserman, J. D., Novokmet, A., Eichler-Jonsson, C., Ribeiro, R. C., Rodriguez-Galindo, C., Zambetti, G. P., *et al.* (2015). Prevalence and functional consequence of TP53 mutations in pediatric adrenocortical carcinoma: a children's oncology group study. *J Clin Oncol* **33**, 602-9.
- Weitzel, J. N., Clague, J., Martir-Negron, A., Ogaz, R., Herzog, J., Ricker, C., *et al.* (2013). Prevalence and type of BRCA mutations in Hispanics undergoing genetic cancer risk assessment in the southwestern United States: a report from the Clinical Cancer Genetics Community Research Network. *J Clin Oncol* **31**, 210-6.
- Weitzel, J. N., Lagos, V., Blazer, K. R., Nelson, R., Ricker, C., Herzog, J., *et al.* (2005). Prevalence of BRCA mutations and founder effect in high-risk Hispanic families. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**, 1666-71.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., *et al.* (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* **378**, 789-92.
- Wooster, R., Weber, B. L. (2003). Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med* **348**, 2339-47.
- Zilfou, J. T., Lowe, S. W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a001883.

Capítulo XIV – Anexos

14. Anexos

Cartas de aprovação dos projetos relacionados à síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 140630
Data da Versão do Projeto: 22/12/2014

Pesquisadores:
PATRICIA ASHTON PROLLA
BARBARA ALEMAR BESERRA
CRISTINA BRINCKMANN OLIVEIRA NETTO

Título: Implementação e validação do sequenciamento de nova geração como ferramenta diagnóstica no câncer de mama e ovário hereditários para pacientes do SUS no Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.
Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 07 de abril de 2015.

Prof. José Roberto Goldim
Coordenador CEP/HCPA



**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 110427

Data da Versão do Projeto: 23/08/2011

Data da Versão do TCLE: 28/09/2011

Pesquisadores:

JULIANA GIACOMAZZI

LUIS FERNANDO DA ROSA RIVERO

MARIANA FITARELLI KIEHL

MARCIA SILVEIRA GRAUDENZ

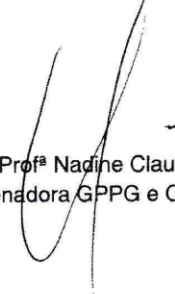
PATRICIA ASHTON PROLLA

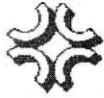
Título: ESTUDO DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS NO GENE TP53 E EXPRESSÃO DE HER2 EM MULHERES COM CÂNCER DE MAMA DIAGNOSTICADO ANTES DOS 46 ANOS DE IDADE

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 13 de outubro de 2011.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 04-170

Versão do Projeto: 14/05/2004

Versão do TCLE: 17/06/2004

Pesquisadores:

PATRICIA ASHTON PROLLA

LAVINIA SCHULER-FACCINI

MAIRA CALEFFI

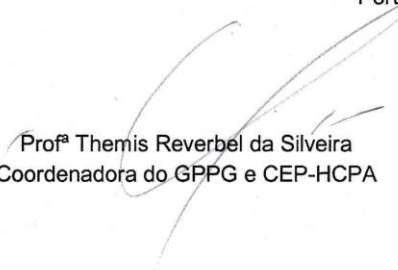
LUCIANE KALAKUN

EDENIR INEZ PALMERO

Título: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE PACIENTES EM RISCO PARA CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO PROVENIENTES DE UMA AMOSTRA POPULACIONAL DO SUL DO BRASIL

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Porto Alegre, 06 de julho de 2004.


Profª Themis Reverbél da Silveira
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 04-081

Versão do Projeto: 15/03/2004

Versão do TCLE: 06/05/2004

Pesquisadores:

PATRICIA ASHTON PROLLA

EDENIR INEZ PALMERO

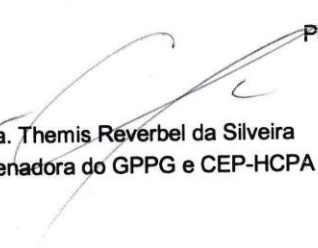
LAVINIA SCHULER-FACCINI

Título: CARACTERIZAÇÃO DE UM GRUPO DE PACIENTES EM RISCO PARA CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO HEREDITÁRIOS QUANTO A PRESENÇA E FREQUÊNCIA DE REARRANJOS GÊNICOS EM BRCA1

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, inclusive quanto ao seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA. Somente poderão ser utilizados os Termos de Consentimento onde conste a aprovação do GPPG/HCPA.

Por pertencer a uma área temática especial este projeto somente poderá ser iniciado após a sua aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Porto Alegre, 25 de maio de 2004.


Profa. Themis Reverbél da Silveira
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0000921) analisaram o projeto:

Projeto: 03-018

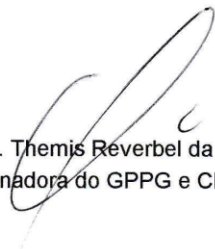
Pesquisador Responsável:
ROBERTO GIUGLIANI

Título: IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE MUTAÇÕES NOS GENES BRCA1 E BRCA2 EM FAMÍLIAS COM SUSCETIBILIDADE HEREDITÁRIA AO CÂNCER DE MAMA E/OU CÂNCER DE OVÁRIO POR DHPLC

EMENDA 1	Data da Versão: 24/10/2003
-----------------	--------------------------------------

Este documento referente ao projeto acima foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 30 de outubro de 2003.


Profa. Themis Reverbel da Silveira
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

Carta de aprovação do projeto relacionado à síndrome de Li-Fraumeni



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

RESOLUÇÃO

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 08-022

Pesquisador Responsável:
PATRICIA ASHTON PROLLA

Título: PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO GERMINATIVA TP53-R337H EM PACIENTES ONCOLÓGICOS DIAGNOSTICADOS COM TUMORES COMUMENTE DESCRITOS NA SÍNDROME DE LI-FRAUMENI E SUAS VARIANTES

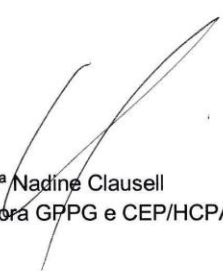
EMENDA AO PROJETO

Data da Versão:

12/07/2010

Este documento referente ao projeto acima foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, 20 de julho de 2010.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA