Gabriel Bandeira do Carmo

**Estudo de genes e variantes genéticas associadas ao
câncer de mama familiar: impactos no aconselhamento
genético**

Study of genes and genetic variants associated with familial
breast cancer: impacts on genetic counseling

São Paulo

2018

Gabriel Bandeira do Carmo

**Estudo de genes e variantes genéticas associadas ao
câncer de mama familiar: impactos no aconselhamento
genético**

Study of genes and genetic variants associated with familial
breast cancer: impacts on genetic counseling

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências – Programa: Mestrado Profissional
em Aconselhamento Genético e Genômica
Humana, na área de Biologia (Genética).

EXEMPLAR CORRIGIDO: o original
encontra-se no Instituto de Biociências da
USP.

Orientador: Dr. Oswaldo Keith Okamoto

São Paulo

2018

Ficha Catalográfica

do Carmo, Gabriel Bandeira
Estudo de genes e variantes
genéticas associadas ao câncer de mama
familiar: impactos no aconselhamento
genético
Orientador: Oswaldo Keith Okamoto.
São Paulo, 2019.
103 p

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biociências da Universidade de São Paulo,
Departamento de Genética e Biologia
Evolutiva.

1. Câncer de mama familiar. 2.
Aconselhamento genético. 3. Genética do
câncer. 4. Paineis multigênicos. 5. *BRCA1* e
BRCA2. I. Universidade de São Paulo.
Instituto de Biociências.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Fernanda Teresa de Lima

Prof. Dr. Thomaz Rafael Gollop

Prof. Dr. Oswaldo Keith Okamoto
Orientador

Dedicatória

À minha família,
apoiadores incondicionais
em minha jornada. Vocês são a
base para todas as minhas realizações.

Agradecimentos

À minha amada mãe, que sempre me apoiou em todas as minhas decisões, pela confiança e incentivo mesmo nos momentos em que nem mesmo eu sabia qual caminho seguir. Por toda sua atenção e dedicação, desde uma conversa entre os intervalos de estudo ou em um simples café da tarde. A você, mãe, o meu carinho e respeito eterno.

Aos meus irmãos, sempre presentes e dividindo todas as experiências e adversidades ao longo dos anos. Pedro com sua alegria contagiante, descontraindo e animando todos ao seu redor até mesmo nos momentos mais difíceis. João com sua retidão e perseverança, um exemplo para mim desde a infância, fazendo-se sempre presente ao longo das minhas decisões.

À minha namorada Suzane, que me apoiou e compartilhou diversas experiências e dificuldades ao longo dessa jornada, sempre com total atenção e carinho. Seu companheirismo tornou o caminho das conquistas menos árduo.

Aos queridos amigos da biologia: Carol, Murillo, Bunni, Natalia e Isabela. Desde a graduação, cada reunião ou almoço me fizeram ter certeza de estar na direção correta. É um prazer poder compartilhar a evolução pessoal de cada um de vocês.

Ao meu orientador Oswaldo Keith Okamoto, por toda paciência e dedicação em compartilhar seus conhecimentos, sempre me direcionando para obter o melhor resultado. Sua compreensão foi determinante para conclusão deste trabalho.

Aos professores e aconselhadores genéticos que gentilmente compartilharam o espaço de seus consultórios para proporcionar um ambiente fértil de aprendizagem. Todos com extrema dedicação à arte de cuidar de pacientes, tornando cada heredograma uma história de vida a ser respeitada.

Ao professor Thomaz Gollop, com sua disposição em transmitir toda sua experiência e, mesmo com pouco tempo de convivência, foi capaz de me ensinar valores e competências que serão levadas para toda vida.

Aos colaboradores do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, em especial à Dra. Maria Rita Passos-Bueno e Dra. Mayana Zatz, bem como à equipe de testes genéticos e bioinformática: Kátia Rocha, Monize

Magalhães, Suzana Ezquina, Guilherme Yamamoto e Vanessa Takahashi pela colaboração na disponibilização e análise dos dados de testes realizados no centro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao CEPID – Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco.

Lista de abreviaturas

ABraOM	Arquivo Brasileiro Online de Mutações
ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
AG	Aconselhamento genético
AMP	<i>Association for Molecular Pathology</i>
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
CDIS	Carcinoma ductal in situ
CEGH-CEL	Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco
CLIS	Carcinoma lobular in situ
CMF	Câncer de mama familiar
ExAC	<i>Exome Aggregation Consortium</i>
FBC	<i>Familial breast cancer</i>
GATK	<i>Genome Analysis Toolkit</i>
GC	<i>Genetic counseling</i>
GTR	<i>Genetic Testing Registry</i>
GWAS	<i>Genome-wide Association Study</i>
IPA	<i>Ingenuity® Pathway Analysis - Qiagen©</i>
MLPA	<i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NGS	Sequenciamento de nova geração
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
PGD	Diagnóstico genético pré-implantacional
RE	Receptor de hormônio estrogênio
RP	Receptor de hormônio progesterona
RPI	<i>Mismatch repair</i>
RTC	Reparo em trans entre cadeia
SciELO	<i>Scientific Electronic Library Online</i>
SCMOH	Síndrome do câncer de mama e ovário hereditário
SCW	Síndrome de Cowden
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
SIR	<i>Standardized incidence ratios</i>
VUS	Variante de significado incerto

Sumário

RESUMO	8
ABSTRACT	10
CAPÍTULO 1- INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	11
1.1 Câncer: biologia e epidemiologia	11
1.2 Câncer de mama.....	14
1.3 Etiologia multifatorial	15
1.4 Caracterização histológica e molecular	18
1.5 Genética do câncer	24
1.5.1 Câncer de mama familiar e os genes BRCA1 e BRCA2.....	26
1.5.2 Heterogeneidade de locus e a etiologia multifatorial	31
1.5.2.1 CDH1 – Câncer Gástrico Difuso Hereditário	33
1.5.2.2 NF1 – Neurofibromatose tipo 1	34
1.5.2.3 PALB2 – Anemia de Fanconi	34
1.5.2.4 PTEN – Síndrome de Cowden	35
1.5.2.5 STK11 – Síndrome de Peutz-Jeghers.....	35
1.5.2.6 TP53 – Síndrome de Li-Fraumeni	36
1.5.3 Vias de sinalização celular alteradas no câncer de mama familiar.....	37
1.6 Aconselhamento genético em câncer de mama.....	40
1.6.1 Modelos de predição de risco.....	43
1.6.2 Acionabilidade e manejo clínico de variantes patogênicas com diferentes penetrâncias.....	45
1.7 Objetivos	48
1.7.1 Objetivo geral	48
1.7.2 Objetivos específicos.....	49
CAPÍTULO 2 - METODOLOGIA	50

2.1 Revisão bibliográfica dos genes e variantes associadas ao câncer de mama familiar	50
2.2 Análise de vias de sinalização celular e interação entre os produtos gênicos representados na revisão bibliográfica	51
2.3 Casuística, controles e painel multigênico realizado por pacientes do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco - USP	51
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS	53
3.1 Compilação e tabulação dos dados da literatura.....	53
3.2 Principais vias de sinalização celular e redes de interação representadas nos genes associados ao câncer de mama familiar	60
3.3 Frequência de variantes deletérias em genes associados ao câncer de mama familiar na população brasileira e internacional	73
3.4 Variantes gênicas presentes em pacientes do CEGH-CEL que realizaram o painel multigênico para susceptibilidade hereditária ao câncer de mama.....	74
CAPÍTULO 4 – DISCUSSÃO	81
4.1 Determinação do risco hereditário de câncer de mama e o impacto no aconselhamento genético	81
4.2 Análise das vias de sinalização celular e redes de interação representadas entre os genes associados ao câncer de mama familiar	85
4.3 Atualização dos painéis multigênicos para susceptibilidade ao câncer de mama	88
4.4 Avaliação da coorte do CEGH-CEL no contexto de variabilidade genética da população brasileira (ABraOM)	90
CONCLUSÃO	93
BIBLIOGRAFIA	94

Resumo

Dentre todos os tipos de câncer, excluindo-se o câncer de pele do tipo não melanoma, o de mama é o mais frequente em mulheres, sendo a segunda maior causa de morte por neoplasias nesse segmento da população. Em determinadas famílias, a incidência de câncer é superior à esperada para a população em geral, devido principalmente ao compartilhamento de fatores ambientais e/ou mutações genéticas responsáveis por facilitar ou dirigir a oncogênese.

Os indivíduos que apresentam câncer de mama e histórico familiar dessa patologia são descritos dentro do grupo câncer de mama familiar (CMF), responsável por aproximadamente 5 a 10% do total de casos de câncer de mama. Atualmente, pacientes com CMF são frequentemente testados para mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Entretanto, estima-se que as variantes patogênicas presentes nos dois genes são responsáveis por somente 20% dos casos de CMF em que a etiologia genética é conhecida. Com relação aos testes genéticos para predisposição hereditária ao câncer de mama, torna-se relevante, portanto, a reavaliação da constituição dos painéis multigênicos frente ao estado do conhecimento científico atual, contemplando-se as mais recentes atualizações acerca dos genes e variantes genéticas associadas ao CMF.

Neste trabalho, realizamos uma revisão bibliográfica que identificou 45 genes com associação estatística ao CMF, dentre eles 18 são frequentemente avaliados em painéis multigênicos brasileiros e internacionais. Em análise *in silico*, avaliamos as funções celulares e interações entre os produtos gênicos associados à patologia. Nossos resultados sugerem a adição de nove genes à composição de painéis multigênicos realizados no Brasil, EUA e Europa para avaliação da predisposição hereditária ao câncer de mama. Essa análise crítica pode auxiliar o aprimoramento de estratégias de prevenção, triagem, manejo clínico e determinação do risco de ocorrência e recorrência, com impactos sobre o aconselhamento genético (AG) oferecido aos pacientes afetados pelo câncer familiar e seus familiares.

Complementarmente, avaliamos as variantes gênicas presentes em pacientes com câncer de mama que realizaram o painel multigênico para predisposição hereditária ao câncer no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL). As frequências de mutações da coorte do CEGH-CEL são

semelhantes às obtidas em estudos internacionais, possibilitando a utilização de painéis multigênicos com composições similares em populações de diversas localidades.

Abstract

Of all types of cancer, except for non-melanoma skin cancer, breast cancer is the most common among women, and it's the second leading cause of death by neoplasia in this segment of the population. In some families, the incidence rates of cancer are higher than expected for the general population because of the environmental factors and/or genetic mutations responsible for facilitating or driving oncogenesis.

The individuals who have breast cancer and a family history of this pathology fall into the group of familial breast cancer (FBC), which is responsible for approximately 5-10% of all breast cancer cases. Currently, patients with FBC are frequently tested for mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes. It is estimated, however, that the pathogenic variants of these genes account for only 20% of all FBC cases in which the genetic etiology is known. In relationship to the genetic tests for inherited predisposition for breast cancer, therefore it is relevant to reassess the multi-gene panel composition, considering the state of scientific knowledge today, including the most recent research on the genes and its variants associated with FBC.

In this paper we did a literature review, which identified 45 genes statistically associated with FBC, out of which 18 are frequently assessed in multi-gene panels in Brazil and abroad. Through *in silico* analysis we were able to evaluate cell functions and interactions with gene products associated with cancer. Our results suggest the addition of nine genes to the multi-gene panel composition carried out in Brazil, in the USA and in Europe to assess hereditary predisposition to breast cancer. This critical analysis can assist in the development of preventive actions, triage, clinical management and in determining the risk of occurrence and recurrence, which impacts on the genetic counseling (GC) offered to the patients of familial cancer and their relatives.

Additionally, we evaluated the genetic variants in patients diagnosed with breast cancer who have undergone multi-gene panel testing for hereditary predisposition to cancer at the Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL). These cohort's mutation frequencies are similar to the results in international studies, which could enable the use of multi-gene panels with similar compositions in populations from various locations.

Capítulo 1 - Introdução

1.1. Câncer: biologia e epidemiologia

O câncer é uma das doenças mais comuns e graves encontradas na genética clínica, afetando pacientes de ambos os sexos e todas as idades. No último levantamento publicado pela Organização Mundial da Saúde em 2012, a prevalência mundial da doença foi de 32 milhões de pessoas, sendo responsável por 8,2 milhões de mortes nesse período. Em 2030, com o aumento progressivo da expectativa de vida mundial, estima-se uma prevalência de 75 milhões de pessoas com câncer no mundo todo e de pelo menos 17 milhões de mortes por ano. Os custos médicos diretos para o câncer nos EUA em 2015 foram de US\$ 80,2 bilhões. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018). No Brasil, os gastos médicos no Sistema Único de Saúde com tratamentos para o câncer foram de R\$ 3,5 bilhões, aproximadamente 4% do total investido na área da saúde no mesmo ano (BARROS, 2016). Tais valores refletem o gasto significativo de recursos públicos e privados em tratamento cada vez mais complexos e custosos para as mais diversas formas de câncer. O diagnóstico precoce, o tratamento imediato e a detecção de pessoas com risco aumentado de desenvolver câncer são vitais para diminuir a letalidade e melhorar o prognóstico, evidenciando a relevância de pesquisas multidisciplinares sobre a patologia.

Câncer é o nome dado ao conjunto de mais de 100 neoplasias, diferentes do ponto vista etiológico e morfológico, apresentando particularidades genéticas que propiciam progressão variável e dificultam um tratamento universal. O câncer se origina pela violação das regras básicas do comportamento celular social e é caracterizado pela proliferação descontrolada de uma linhagem celular, gerando um tumor (neoplasia) a partir de uma única célula. Porém, para que a neoplasia seja considerada um câncer, ela deve ser maligna, ou seja, deve apresentar potencial para invadir tecidos próximos ou migrar (metástase) para áreas distantes do seu local de origem, por meio do sistema circulatório ou linfático.

Algumas características são compartilhadas entre os mais diversos tipos de câncer, compreendendo dez capacidades biológicas, adquiridas durante o desenvolvimento através de múltiplos passos, que dirigem a transformação de uma célula normal até o estágio canceroso. Elas incluem a sustentação da sinalização

proliferativa, evasão dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, viabilização de imortalidade replicativa, indução da angiogênese, ativação da invasão de tecidos próximos e metástase, evasão da destruição pelo sistema imune, inflamação promotora de tumores, instabilidade genômica e mutacional e desregulação energética da célula. (HANAHAAN; WEINBERG, 2011)

Figura 1. Capacidades biológicas adquiridas ao longo da oncogênese necessárias para o crescimento e progressão tumoral. Fonte: adaptado de HANAHAAN; WEINBERG, 2011.

A compreensão das principais características biológicas do câncer possibilita o desenvolvimento de terapias específicas, direcionadas para alvos moleculares envolvidos diretamente na obtenção de uma ou mais capacidades descritas anteriormente (e.g., drogas antiangiogênicas). A especificidade dos alvos terapêuticos é uma das principais competências de um medicamento antitumoral,

pois propicia menor toxicidade e efeitos colaterais ao direcionar sua atividade predominantemente às células cancerosas (BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2012).

A descrição das principais características biológicas que dirigem a oncogênese é uma importante referência para a identificação de células alteradas; adicionalmente, é possível descrever as mais diversas formas de neoplasia de acordo com o tecido de origem. Assim, eles podem ser classificados de forma abrangente em carcinomas, sarcomas, leucemias, linfomas e mielomas. O órgão ou célula afetada também pode ser utilizado para identificar o tipo de câncer, sendo uma importante ferramenta clínica para estimar a progressão da doença e determinar o tratamento individualizado para as particularidades de cada paciente.

Os carcinomas (Carcin= caranguejo; Oma= tumor) têm origem nas células epiteliais que constituem a camada de revestimento do epitélio, ou seja, estão em contato direto com agentes potencialmente mutagênicos. Por esse motivo o carcinoma é a forma mais comum de câncer no mundo (ADEM *et al.*, 2004; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Quando o tumor primário deriva de células epiteliais que revestem as glândulas, ele recebe o nome de adenocarcinoma, e quando se origina do epitélio que reveste as superfícies ou cavidades de órgãos, recebe o nome de carcinoma de células escamosas ou carcinoma de células transicionais.

Sarcomas (Sarco = carne; Oma = tumor) se originam de células do tecido conjuntivo ou conectivo. Eles são divididos em dois grandes grupos: sarcomas de tecido moles e osteosarcomas. Pode-se destacar dentro do grupo de sarcomas de tecidos moles os com origem no tecido adiposo (lipossarcoma), no músculo estriado (rabdomiossarcoma), no músculo liso (leiomiossarcoma), no tecido fibroso (fibrossarcoma) e na cartilagem (condrossarcoma).

Leucemias (Leuco = branco; Emia = sangue) têm origem nas células hematopoiéticas da medula óssea, tecido que se localiza no interior dos ossos longos, e que é responsável pela produção das células sanguíneas (hematócitos). As leucemias são caracterizadas pelo acúmulo de células jovens (blásticas) no tecido mutado, ocasionando elevada depleção de células normais na corrente sanguínea (RENNEVILLE *et al.*, 2008).

Os linfomas (Linha = água; Oma= tumor) se originam de células do sistema imune, especificamente do sistema linfático: linfócitos e seus precursores. Eles são

não-Hodgkin. O linfoma de Hodgkin é caracterizado pela presença de células de Reed-Sternberg (derivadas de linfócitos B). Já o linfoma de não-Hodgkin não se origina de um tipo celular específico, apresentando expressiva heterogeneidade morfológica e genética (KIM *et al.*, 2011).

Os mielomas (Mielo = medula; Oma = tumor) se originam nas células da medula óssea, mais especificamente nas células plasmáticas responsáveis pela produção de anticorpos. Assim como nas leucemias, a proliferação das células cancerosas na medula promove depleção de hematócitos na corrente sanguínea. Nos EUA, os mielomas são o segundo tipo de câncer mais comum das células sanguíneas, representando 1% do total de casos nesse país. (RENNEVILLE *et al.*, 2008)

Existem outros tipos de câncer menos frequentes na população mundial, mas que também fazem parte da rotina médica, cada um com sua relevância clínica e tratamento específico. Dentre todos os tipos de câncer, excluindo-se o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é a forma mais comum de câncer e a segunda causa mais comum de morte por neoplasia em mulheres (APOSTOLOU; FOSTIRA, 2013).

1.2. Câncer de mama

O câncer de mama apresenta elevada prevalência mundial, com aproximadamente 1,7 milhões de novos casos diagnosticados em 2012 e 520 mil mortes no mesmo período, representando 12% de todos os casos de câncer em ambos os sexos e 25% do total em mulheres (FERLAY *et al.*, 2015). O risco absoluto de mulheres desenvolverem câncer de mama antes dos 85 anos nos EUA e na União Europeia é de aproximadamente 12,5%, ou seja, uma em oito mulheres (DESANTIS *et al.*, 2014). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva (INCA) é responsável pelas estatísticas relacionadas à patologia; segundo o órgão, estima-se 59700 novos casos de câncer de mama para o ano de 2018, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres. Mesmo considerando a estimativa nacional, observa-se notória discrepância entre a taxa bruta (número de casos/100 mil mulheres) apresentada em cada região: na região sudeste a taxa é de 69,50, região sul 73,07, região centro-oeste 51,96, região nordeste 40,36 e região norte 19,21.

A variação na distribuição demográfica está relacionada a maiores índices de desenvolvimento, que favorecem a exposição a fatores de risco como obesidade e tabagismo, assim como a maior amplitude das ações de rastreamento em diagnosticar a doença. Porém, mesmo em diversos países com alto IDH, os exames de detecção para o câncer de mama ou para qualquer outro tipo de câncer frequentemente não fazem parte da rotina de toda a população. Dessa forma, identificar os principais fatores de risco que alteram a predisposição ao câncer é uma ferramenta importante para direcionar os programas de triagem e terapias aos indivíduos que possuem risco aumentado de serem diagnosticados com a patologia. (JEMAL *et al.*, 2011)

Além do sexo feminino, a idade avançada é o principal fator de risco para o câncer de mama, estando relacionado ao acúmulo de uma “massa crítica” de alterações moleculares em genes-chave para a oncogênese: os proto-oncogenes e genes supressores de tumor; além da exposição aos fatores ambientais durante a vida, favorecendo a transformação de células normais em células tumorais. O risco absoluto de uma mulher na população em geral apresentar câncer de mama durante a vida é de aproximadamente 12%, com idade média de diagnóstico aos 62 anos. Porém, estimativas por décadas de vida são menos afetadas por mudanças na incidência e mortalidade do que as estimativas de longo prazo. A Tabela 1 descreve a distribuição do câncer de mama ao longo dos anos e o risco de morte entre as faixas etárias em mulheres norte-americanas de 2007 a 2009 (SIEGEL *et al.*, 2011).

1.3. Etiologia multifatorial

Diversos fatores de risco foram associados à predisposição ao câncer de mama: história reprodutiva e menstrual, obesidade, alcoolismo, exposição à radiação ionizante, sedentarismo, presença de hiperplasia atípica na mama, uso prolongado durante a menopausa de terapia hormonal, densidade do tecido mamário, mutações germinativas associadas ao câncer de mama, história pessoal de câncer de mama e etnia (YANG *et al.*, 2011; ZIV *et al.*, 2003).

Alguns dos fatores de risco descritos acima estão associados aos estados hormonais presentes em diversas faixas etárias (e.g. história reprodutiva e menstrual). Tal observação vai a encontro com os levantamentos populacionais: aproximadamente 70% dos tumores de mama diagnosticados são caracterizados

como receptores hormonais positivos (as características dos subtipos moleculares serão descritas com maiores detalhes no decorrer deste trabalho), ou seja, o tecido tumoral expressa receptores de estrogênio e/ou progesterona em excesso comparativamente às células normais do mesmo tecido, estando associados à modulação positiva da divisão celular.

Tabela 1. Risco de ser diagnosticado com câncer de mama nas próximas décadas de vida, risco cumulativo vital e risco durante a vida de morrer de câncer de mama na idade atual em mulheres de todas as etnias.

Risco de câncer de mama					Risco de morrer devido ao câncer de mama
Idade atual	+10 anos	+20 anos	+30 anos	Risco cumulativo vital	
0	0%	0%	0,06%	12,38%	2,76%
10	0%	0,06%	0,50%	12,51%	2,79%
20	0%	0,50%	1,94%	12,54%	2,80%
30	0,44%	1,89%	4,17%	12,54%	2,81%
40	1,47%	3,78%	7,00%	12,25%	2,78%
50	2,38%	5,72%	8,84%	11,15%	2,66%
60	3,56%	6,90%	8,87%	9,37%	2,40%
70	3,82%	6,08%	-	6,65%	1,99%
80	3,04%	-	-	3,8%	1,54%

Fonte: adaptado de SIEGEL *et al.*, 2011.

Essa associação pode apresentar ainda mais relevância em mulheres com elevados níveis hormonais, frequentemente presentes na fase de pré-menopausa ou em decorrência de reposição hormonal prolongada após a menopausa (COTTERCHIO *et al.*, 2003). Devido à modulação hormonal atuante de forma diferencial entre os sexos e a maior proporção de tecidos frequentemente alterados no câncer de mama (e.g., glândulas mamárias), as mulheres apresentam um risco cumulativo vital maior do que homens: somente 1% do total de casos ocorre no sexo masculino, aproximadamente <1 a cada 100.000 homens são diagnosticados com câncer de mama (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Atualmente, mesmo com diversos fatores de risco identificados, ainda não é possível precisar o risco relativo inerente a cada indivíduo, evidenciando a necessidade de pesquisas voltadas ao melhor entendimento da contribuição dos fatores ambientais e genéticos para o aumento da predisposição ao câncer de forma integrada. A Tabela 2 sumariza os principais fatores de risco associados ao câncer de mama assim como o risco relativo ligado a cada um deles. Com o aumento do número de informações sobre os perfis de risco dos subtipos celulares e moleculares do câncer de mama, será possível precisar a conexão entre os fatores de risco e o desenvolvimento dessa patologia.

Tabela 2. Fatores de risco para o câncer de mama, risco relativo e comparação entre categorias analisadas.

Fator de risco	Risco relativo	Categoria em risco	Categoria comparada
Achados citológicos	18.1	Proliferação atípica e história familiar positiva	Sem anormalidades detectadas
	4.9-5	Proliferação atípica	Sem anormalidades detectadas
Outros achados histológicos	17.3	Carcinoma ductal <i>in situ</i>	Sem anormalidades detectadas
	16.4	Carcinoma lobular <i>in situ</i>	Sem anormalidades detectadas
Biópsia de mama positiva	11	Hiperplasia com proliferação atípica e história familiar positiva	Sem hiperplasia e história familiar negativa
	5.3	Hiperplasia com proliferação atípica	Sem hiperplasia
História passada de câncer de mama	6.8	Câncer de mama invasivo	Sem história de câncer de mama invasivo
Idade atual	5.8	65 anos ou mais	Menos de 65 anos
Exposição à radiação ionizante	5.2	Terapia com radiação ionizante para Linfoma de Hodgkin	Sem exposição
	1.6	Fluoroscopias repetidas	Sem exposição
Densidade aumentada da mama	47.7	Mais do que 75% de densidade mamária na mamografia	Menos do que 25% de densidade mamária na mamografia
Idade ao primeiro nascimento	1.7-1.9	Nuliparidade ou primeiro nascimento após os 30 anos	Primeiro filho antes dos 20 anos
Menopausa tardia	1.2-1.5	Após os 50 anos	Com menos de 45 anos
Menarca precoce	1.3	Antes dos 12 anos	Após os 15 anos

Fator de risco	Risco relativo	Categoria em risco	Categoria comparada
Ingestão de álcool	1.2	Duas doses por dia	Sem ingestão de álcool
Índice de massa corporal	1.2	Acima do percentil 80	No percentil 20
Histórico familiar	3.6	Dois parentes de primeiro grau com câncer de mama	Sem parentes de primeiro ou segundo grau com câncer de mama
	3.3	Parente de primeiro grau com câncer de mama pre-menopausa	Sem parentes de primeiro ou segundo grau com câncer de mama
	1.8	Parente de primeiro grau com 50 anos ou mais com câncer de mama pós-menopausa	Sem parentes de primeiro ou segundo grau com câncer de mama
	1.5	Parente de segundo grau com câncer de mama	Sem parentes de primeiro ou segundo grau com câncer de mama

Fonte: adaptado de *Committee on new approaches to early detection and diagnosis of breast cancer; National cancer policy board, 2005.*

1.4. Caracterização histológica e molecular do câncer de mama

O câncer de mama é frequentemente diagnosticado durante exames de imagem, antes mesmo de qualquer sintoma estar evidente, ou depois do paciente notar uma massa celular aumentada na região da mama. Muitas das massas celulares vistas em mamografias são benignas, ou seja, não cancerosas: não aumentam de tamanho descontroladamente ou metastatizam, portanto não necessitam de tratamento imediato, somente de acompanhamento periódico preventivo. Porém, quando a massa celular apresenta características de células cancerosas, uma análise anatomopatológica é necessária para um diagnóstico definitivo, assim como para a caracterização dos tecidos ou tipos celulares afetados. A extensão da propagação também é um fator relevante para o prognóstico da doença, podendo se apresentar na forma de câncer de mama *in situ* ou invasivo (EVANS *et al.*, 2012).

O carcinoma *in situ* se possui um padrão não infiltrante e membrana basal preservada. Ele corresponde à aproximadamente 20% do total de casos de neoplasias mamárias, apresenta-se majoritariamente de duas formas: carcinoma

ductal *in situ* (CDIS) ou carcinoma lobular *in situ* (CLIS). Outros subtipos histológicos de câncer de mama *in situ* também podem ser encontrados, com características de carcinoma ductal e/ou lobular ou com origens desconhecidas, quando a identificação do tipo celular de origem não pode ser determinada devido às complexas transformações genéticas e morfológicas presentes na linhagem afetada, porém, esses subtipos são menos frequentes (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

O CDIS é caracterizado pela proliferação das células tumorais nos ductos mamários, podendo ocasionar a expansão dos lóbulos mamários. Ele correspondeu a cerca de 80% dos casos diagnosticados de carcinoma *in situ* nos EUA entre os anos de 2008 a 2012 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Ao não invadir outras camadas celulares ou tecidos além daquele em que teve origem, as células anormais presentes no CDIS são consideradas como uma forma de câncer não invasivo, porém, a divisão celular descontrolada aliada à falha nos mecanismos de reparo de DNA, característica de células tumorais, aumentam a probabilidade de se tornarem um câncer de mama invasivo (Tabela 2). A identificação de características moleculares do CDIS, assim como a presença de determinados receptores de membrana, pode auxiliar na predição da recorrência ou progressão para a forma invasiva dessa patologia (PAPE-ZAMBITO *et al.*, 2014).

O CLIS se refere a células tumorais que crescem nos lóbulos mamários. Nos Estados Unidos, essa forma histológica correspondeu a 13% dos casos de câncer *in situ* em mulheres durante os anos de 2008 a 2012. Apesar de originalmente não invadir outros tecidos, o CLIS é considerado um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama invasivo. Há também outros carcinomas *in situ* com características lobulares e ductais, ou ainda de origens desconhecidas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

O câncer de mama invasivo corresponde à aproximadamente 80% do total de casos diagnosticado nos EUA em 2016, apresentando pior evolução e menor responsividade ao tratamento devido principalmente à capacidade de ultrapassar as paredes dos ductos ou glândulas onde se originou e crescer através do tecido mamário. Assim como no tipo histológico *in situ*, os casos de carcinoma ductal invasivo são também mais frequentes do que os casos de carcinomas lobulares invasivos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

Uma ferramenta importante para estimar a evolução do câncer de mama e o tipo de tratamento mais adequado para cada caso é a avaliação do estágio em que

o tumor se encontra. Atualmente, duas classificações são mais utilizadas: o sumário de estágio SEER e a nomenclatura de estágio TNM. Ambos descrevem a extensão ou a propagação do câncer no momento do primeiro diagnóstico. O sumário de estágio “*Surveillance, Epidemiology, and End Results*” (SEER), NIH, é frequentemente utilizado em bancos de dados de registros de câncer, sendo considerado o padrão ouro para a caracterização geral da massa tumoral. De acordo com esse sistema de classificação, o câncer pode ser descrito através da amplitude de propagação: o estágio “local” se refere ao tumor que está confinado à mama; o estágio “regional” se refere ao câncer que se propagou para tecidos vizinhos ou linfonódulos próximos; e o estágio “distante” se refere ao câncer com metástase para órgãos distantes ou linfonódulos abaixo da clavícula.

Complementarmente, o sistema SEER caracteriza o tumor de acordo com a nomenclatura TNM, sendo avaliados os seguintes critérios: dimensões do tumor e quão longe ele se propagou através da mama para tecidos adjacentes (T), a extensão da propagação para linfonódulos próximos ao local de origem (N) e a presença ou ausência de metástase para órgãos distante (M). Uma vez determinados os critérios T, N e M, os estágios de 0, I, II, III ou IV são atribuídos, sendo o estágio 0 *in situ*, o estágio I a forma inicial do câncer invasivo, os estágios II e III descrevem o espectro de propagação da massa celular inicial para regiões mais distantes e o estágio IV é atribuído quando a patologia está em sua forma mais avançada, momento em que o câncer está presente em diversos órgãos.

A definição do estágio de cada paciente apresenta uma forte correlação com o prognóstico: o paciente com tumor no estágio I tem uma média de sobrevivência maior do que aquele com tumor nos demais estágios. As diferenças nas médias de sobrevivência demonstram que o método para definição do estágio baseado na classificação do crescimento e amplitude de propagação dos tumores fornece informações prognósticas importantes e, se o protocolo de classificação for seguido de forma consistente, pode ser utilizado juntamente com o grau de diferenciação a fim de estratificar pacientes individualmente para a terapia apropriada (HOWLADER *et al.*, 2016). A Tabela 3 mostra a média de sobrevivência após cinco anos em mulheres diagnosticadas com tumores em um dos quatro estágios.

A definição do grau de diferenciação celular também pode ser utilizada para caracterizar o câncer de mama. A análise é realizada em células obtidas por meio de biópsia de tecido mamário para posterior avaliação microscópica. O grau é baseado

em quão diferenciadas morfolologicamente estão as células cancerosas comparativamente com células normais: o grau 1 é atribuído ao câncer que apresenta crescimento lento e está menos propenso à metástase, o grau 3 é atribuído ao câncer com crescimento acelerado e que está mais propenso à metástase. Existem também formas adicionais para descrições detalhadas do grau de diferenciação e estágio do câncer de mama, podendo apresentar maior ou menor complexidade de acordo com a finalidade da informação, seja ela de complexidade técnica direcionada ao uso médico ou para informar pacientes sobre as características e possível prognóstico da patologia (SOTIRIOU *et al.*, 2006).

Tabela 3. Sobrevida média após cinco anos do diagnóstico e tratamento padrão em mulheres norte-americanas.

Estágio	Média de sobrevivência após 5 anos do diagnóstico*	Tratamento padrão
0- I*	Próximo de 100%	Radioterapia ou mastectomia.
II	93%	Lumpectomia mais radioterapia ou mastectomia com remoção de linfonódulos. Quimioterapia, hormonioterapia e outras terapias alvo podem ser utilizadas após a cirurgia.
III	72%	Cirurgia, possivelmente seguida de quimioterapia, hormonioterapia e terapia alvo.
IV	22%	Cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia, terapia alvo ou a combinação destes tratamentos.

Fonte: adaptado de HOWLADER *et. al.*, 2016.

* Aproximadamente 61% de todos os casos são diagnosticados no estágio 0-I.

**Menos de 1% de todos os casos de câncer de mama são diagnosticados em homens, sendo a média de sobrevivência após cinco anos similar para ambos os sexos.

Não obstante às inúmeras definições acerca do crescimento e morfologia celular, o câncer de mama frequentemente é visto como uma única patologia.

Porém, é possível distingui-lo em até 21 subtipos histológicos distintos e pelo menos quatro subtipos moleculares diferentes, cada qual com características biológicas particulares que promovem diferenças nos padrões de resposta à tratamentos e prognósticos clínicos variáveis, assim como fatores de risco genéticos e ambientais associados (NETWORK, 2012; TAMIMI *et al.*, 2012). Apesar das evidentes vantagens provenientes das diferentes formas de caracterização histológica descritas anteriormente, a morfologia celular pode se apresentar como uma ferramenta prognóstica limitada, devido principalmente ao amplo espectro de complexas alterações genéticas e moleculares responsáveis pela oncogênese e desenvolvimento do câncer de mama (YERSAL; BARUTCA, 2014).

O perfil de expressão de mRNA juntamente com o número de cópias de determinados genes é utilizado para a classificação em diversos subtipos moleculares do câncer de mama (~5 a 10). Em combinação com o perfil de expressão gênica, determinados receptores de membrana são rotineiramente avaliados para a caracterização molecular do câncer de mama, fornecendo uma identidade molecular que pode ser utilizada para definição da terapia mais adequada (CURTIS *et al.*, 2012).

A expressão de três tipos de marcadores moleculares é avaliada frequentemente: receptores de hormônio estrogênio e/ou progesterona (RE $\pm$ /RP $\pm$) e o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2+/ HER2-). Com a análise em conjunto desses receptores, são definidos quatro subtipos moleculares utilizados na caracterização da identidade do câncer de mama, são eles: luminal A, luminal B, HER2-enriquecido e o triplo negativo (CHEANG *et al.*, 2015).

O luminal A é o subtipo mais comum, representando aproximadamente 50% de todos os cânceres de mama. Ele se caracteriza pela presença de altos índices de receptores de estrogênio (RE+) e/ou receptores de progesterona (RP+), com baixo índice de HER2. Frequentemente esses tumores apresentam baixo grau de diferenciação histológica e baixa atividade proliferativa, com taxa de recorrência menor do que os demais subtipos moleculares. O tratamento é baseado principalmente em terapias hormonais (YERSAL; BARUTCA, 2014).

Aproximadamente 20% dos casos de câncer de mama são do subtipo luminal B, sendo caracterizado por altos índices de RE e RP, assim como altos índices de HER2. O subtipo luminal B apresenta um fenótipo mais agressivo comparativamente

ao luminal A, frequentemente maior grau histológico, maior atividade proliferativa e pior prognóstico (CREIGHTON, 2012).

O subtipo HER2-enriquecido corresponde a uma parcela menor dos casos de câncer de mama (10-15%) e é caracterizado por produzir em excesso o receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), um dos quatro membros da família de receptores de membrana tirosina-quinase, e por produzir baixos índices de RP e RE. O subtipo HER2-enriquecido tende a apresentar crescimento e metástase acelerados, com pior prognóstico em curto prazo comparado aos outros subtipos moleculares descritos anteriormente (KUMAR; TIWARI; SHARMA, 2012).

O subtipo triplo negativo recebe esse nome por apresentar baixos índices de RP, RE e receptores HER2. Ele corresponde a aproximadamente 15-20% do total de casos de câncer de mama, sendo duas vezes mais frequente em mulheres negras do que em mulheres brancas na população norte-americana (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). O prognóstico de pacientes que apresentam o subtipo triplo negativo é desfavorável devido à ineficiência de tratamentos baseados em hormonioterapias ou nos receptores HER2, apresentando a menor média de sobrevivência dentre todos os subtipos moleculares. Complementarmente, estudos de *microarray* em conjunto com análises imuno-histoquímicas evidenciam que o subtipo triplo negativo constitui três quartos dos casos em pacientes que apresentam mutações deletérias em *BRCA1*, associado com o câncer de mama familiar (YANG *et al.*, 2007).

Ao identificar fatores de risco associados a cada um dos subtipos moleculares ou os subtipos histológicos, é possível desenvolver testes mais precisos voltados à predição do risco individual e risco de recorrência. Porém, tão importante quanto estudar as células cancerosas no contexto morfológico e molecular é o estudo dos padrões de expressão gênica em linhagem tumoral e de variantes potencialmente deletérias em linhagem germinativa. A caracterização das alterações genéticas associadas à oncogênese é uma poderosa arma investigativa, capaz de predizer a resposta às terapias individualizadas, propiciar novas estratégias terapêuticas voltadas a proteínas com papel-chave na condução dos processos biológicos e comportamento clínico das células cancerosas, bem como identificar quais grupos populacionais ou aglomerados familiares apresentam risco hereditário de câncer de mama.

1.5. Genética do câncer

Com a evolução de técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS), foi possível identificar variantes genéticas presentes em linhagem germinativa que conferem aumento da predisposição ao câncer de mama, assim como o perfil de expressão de genes responsáveis pelo início e evolução dos diferentes subtipos moleculares. Tal abordagem se mostra relevante à medida que diversos subtipos clonais, todos originados de uma mesma célula progenitora, coexistem e são filogeneticamente relacionados dentro da mesma massa tumoral, sendo a prevalência de cada subtipo clonal determinado pelo momento de sua origem e pela sua aptidão evolutiva dentro do contexto do câncer (KUMAR; SHARMA; TIWARI, 2012).

A expansão clonal de uma célula ancestral com mutação oncogênica iniciadora está intrinsecamente relacionada ao acúmulo de mutações somáticas a posteriori (“drivers” ou “passengers”), que podem ser utilizadas de forma prognóstica para individualizar o tratamento com alvos específicos. As atuais plataformas de NGS sustentam a capacidade de detectar subtipos clonais raros portadores de variantes genéticas sem o conhecimento a priori das mutações envolvidas. No entanto, as tecnologias capazes de realizar tal abordagem ainda não estão amplamente disponíveis em virtude do custo elevado (YATES *et al.*, 2015).

O processo de oncogênese é desencadeado por alterações na sequência ou na expressão de proto-oncogenes e genes supressores tumorais, principalmente. Os proto-oncogenes são genes que regulam positivamente a proliferação e diferenciação celular em resposta aos estímulos internos e externos, controlando a divisão mitótica ordenada das células. Existem quatro categorias de proto-oncogenes, associados à divisão celular e ao desenvolvimento de câncer: receptor de fator de crescimento, fator de crescimento, proteínas reguladoras nucleares e proteínas envolvidas na transdução de sinais. Por meio de mutações deletérias, seja de ganho de função ou de aumento da expressão normal, os proto-oncogenes passam a se chamar oncogenes. Após essas alterações, os oncogenes adquirem a capacidade de codificar oncoproteínas que participam da transdução de sinais em várias etapas do ciclo celular. O gene HER2, associado ao câncer de mama, é classificado como proto-oncogene: sua hiperexpressão produz receptores de membrana responsáveis por promover a proliferação celular nas células tumorais

(MAREEL; LEROY, 2003).

Os genes supressores de tumor codificam proteínas responsáveis por diversas funções celulares críticas, dentre elas o controle do ciclo celular, apoptose, diferenciação celular, vigilância da integridade genômica e reparo de DNA. Os genes supressores tumorais podem ser classificados em duas categorias funcionais: os *gatekeepers* e os *caretakers*. Eles interagem em complexas vias de transdução de sinal, respondendo a fatores internos e externos e fornecendo sinais para a divisão celular ou apoptose (OLIVEIRA; FLETCHER; ROSS, 2005). Praticamente todos os genes associados ao CMF codificam supressores tumorais, participando particularmente das vias de reparo por recombinação homóloga (RRH), reparo de pareamento incorreto e reparo em trans entre cadeia (*interstrand DNA crosslink repair*) (NIELSEN; VAN OVEREEM HANSEN; SØRENSEN, 2016).

Os genes do grupo *gatekeepers* são responsáveis por inibir o crescimento celular ou promover a apoptose. A inativação desses genes contribui para a oncogênese e progressão do câncer, pois permite que as células repliquem descontroladamente mesmo na presença de extensos danos no DNA, favorecendo o acúmulo progressivo de mutações e alterações cromossômicas. Entre eles está o *TP53*, cujo produto proteico regula a expressão de genes envolvidos no controle do ciclo celular, angiogênese e reparo de DNA. No câncer de mama, pacientes portadores de mutações no gene *TP53*, sejam elas somáticas ou germinativas, estão associados a um pior prognóstico (WALERYCH *et al.*, 2012).

A categoria de genes *caretakers* codifica proteínas atuantes na manutenção da integridade do genoma, principalmente em vias de reparo de DNA, suprimindo indiretamente o crescimento neoplásico. Os genes *BRCA1* e *BRCA2* fazem parte dessa categoria e, na presença de mutações germinativas, promovem a síndrome do câncer de mama e ovário hereditário (SCMOH), com forte associação ao CMF (AMENDOLA; VIEIRA, 2005).

1.5.1. Câncer de mama familiar e os genes BRCA1 e BRCA2

Quando aglomerados familiares apresentam câncer de mama mais frequentemente do que a população em geral, há maior probabilidade de uma alteração genética presente em linhagem germinativa estar atuando na promoção da oncogênese. Os pacientes com risco herdado de câncer de mama são

tradicionalmente classificados em câncer hereditário ou familiar, seguindo critérios de elegibilidade (LALLOO; EVANS, 2012).

O câncer de mama hereditário é caracterizado pela presença de variantes patogênicas de alta penetrância em linhagem germinativa associadas ao aumento do risco de neoplasias mamárias e em outras localidades (e.g., câncer de ovário), com transmissão para a prole através dos genitores. Os casos classificados como câncer de mama hereditário tendem a apresentar idade de início precoce, antes da menopausa em mulheres, e forma de herança autossômica dominante com penetrância variável (PHAROAH *et al.*, 1997).

Duas organizações norte-americanas elaboram diretrizes para avaliação do risco genético de câncer de mama hereditário e são frequentemente citadas em publicações internacionais na área de câncer hereditário: *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) e *American Society of Clinical Oncology* (ASCO). (ONCOLOGY, 1996; DALY *et al.*, 2017) Porém, outras organizações e centros internacionais possuem guias próprios para classificação dessa patologia, não havendo consenso entre os critérios diagnósticos. Vanags e colaboradores (2010) sumarizaram os critérios diagnósticos para as síndromes de câncer de mama hereditário e SCMOH, apresentados na Tabela 4.

Os casos descritos como câncer de mama familiar compartilham características com o câncer de mama hereditário. Apesar dos cânceres familiares ocorrerem em um determinado aglomerado familiar em frequência maior do que na população em geral, eles recorrentemente não apresentam um padrão bem definido de herança ou idade de início precoce, característico dos cânceres hereditários. Cânceres familiares podem estar associados ao agrupamento familiar de casos de câncer esporádicos, fatores ambientais compartilhados ou variantes patogênicas em genes de média e baixa penetrância (FOULKES, 2008).

Assim como ocorre no câncer de mama hereditário, não existe consenso na literatura acerca dos critérios diagnósticos para a definição do CMF. Anderson (1971) definiu os critérios diagnósticos para o CMF como ocorrência de dois ou mais parentes de primeiro grau com câncer de mama na genealogia nuclear, incluindo o probando. Slavin e colaboradores (2017) realizaram um estudo caso-controle a fim de avaliar a contribuição do amplo espectro de mutações associadas à predisposição hereditária ao câncer de mama. Foram avaliadas mutações germinativas em 26 genes, de alta (odds ratio ≥ 5), moderada ($2 \leq$ odds ratio < 5) e

baixa ($1 \leq \text{odds ratio} < 2$) penetrância. O critério diagnóstico para o CMF foi definido como uma probanda com câncer de mama e ao menos dois parentes de primeiro, segundo ou terceiro grau diagnosticados com câncer de mama ou ovário antes dos 70 anos. É interessante destacar a proposta mais abrangente para a definição do CMF, mesmo considerando a presença de variantes patogênicas em genes de alta penetrância.

Tabela 4. Critérios diagnósticos utilizados na avaliação populacional para as síndromes de câncer de mama hereditário e câncer de mama e ovário hereditário.

Câncer de mama hereditário	Câncer de mama e ovário hereditário
Pelo menos um dos seguintes critérios: a) câncer de mama diagnosticado em idade ≤ 40 anos; b) Câncer de mama medular ou câncer de mama atípico; c) câncer de mama masculino; d) câncer de mama bilateral, um deles diagnosticado em idade ≤ 50 anos.	Pelo menos três pacientes com câncer de mama ou de ovário na família em qualquer idade e um desses pacientes é parente de 1º grau em relação a outros dois ou de segundo grau através do sexo masculino.
Pelo menos três casos de câncer de mama na família e um desses pacientes é parente de primeiro grau em relação aos outros dois ou parente de segundo grau através do sexo masculino.	Um câncer de mama diagnosticado em idade ≤ 50 anos e um câncer de ovário diagnosticado em qualquer idade entre parentes de primeiro grau ou parentes de segundo grau através de homens.
Dois casos de câncer de mama entre parentes de primeiro grau.	Câncer de mama e ovário no mesmo indivíduo em qualquer idade.

Fonte: adaptado de VANAGS *et al.*, 2010.

No presente trabalho, a terminologia “câncer de mama familiar” será utilizada seguindo os mesmos critérios utilizados por Slavin e colaboradores (2017), em que os casos familiares de câncer de mama estão presentes em frequência maior do que na população em geral devido à herança de uma ou mais mutações deletérias associadas à predisposição hereditária ao câncer, promovendo múltiplos casos ao longo da genealogia.

Algumas características clínicas são recorrentes em pacientes com câncer de mama familiar, são elas: idade precoce de acometimento, parentes afetados em três gerações sucessivas, bilateralidade, associação do câncer de mama com outros

tipos de neoplasias como o câncer de ovário ou câncer de próstata de aparecimento precoce, número e idade de mulheres afetadas na família. Entretanto, o fator de risco mais relevante para o aumento da predisposição é o histórico familiar. O risco relativo aumenta de acordo com a extensão do número de parentes próximos afetados pelo câncer de mama e a menor idade de diagnóstico (LALLOO; EVANS, 2012).

Estudos com gêmeos juntamente com análises de segregação estimam que aproximadamente 27% dos casos de câncer de mama decorrem de fatores hereditários, porém, somente 5 a 10% possuem forte componente herdável e apenas 4 a 5% dos casos são causados por um gene autossômico dominante de alta penetrância (PETO; MACK, 2000; NIELSEN; VAN OVEREEM HANSEN; SØRENSEN, 2016). Do total de casos de CMF, mutações nos genes *BRCA1/2* correspondem em média a aproximadamente 20%, porém, diferentes populações podem apresentar largas variações dessa proporção (RICH *et al.*, 2015).

Mutações em genes de alta penetrância normalmente causam síndromes já descritas, com risco relativo definido para cada órgão potencialmente afetado. Dentre os genes de alta penetrância associados ao câncer de mama, *BRCA1* e *BRCA2* apresentam maior frequência de mutações em diversas populações, com frequência combinada de 0,3% entre brancos e afro-americanos nos EUA e 0,23% na população geral do Reino Unido, porém, em determinados grupos populacionais, a frequência de mutações nesses genes pode ser consideravelmente maior (KURIAN, 2010).

Como exemplo notável, o grupo de judeus Ashkenazi apresenta frequência aumentada em três mutações fundadoras: 185delAG (*BRCA1*); 5382insC (*BRCA1*); 6174delT (*BRCA2*). Tal desvio na frequência de alelos deletérios pode ser explicado pelo efeito fundador, processo iniciado com a formação de uma nova população por um pequeno grupo ancestral, que pode carregar alelos responsáveis pela predisposição à determinada doença, aumentando sua prevalência dentro do grupo em questão. Além disso a endogamia favorece a homozigose por origem comum. Ambos os fatores podem explicar a frequência aumentada de mutações nos genes *BRCA1/2*, aproximadamente 2,5% na população geral de judeus Ashkenazi (DISTELMAN-MENACHEM *et al.*, 2009).

O gene *BRCA1*, localizado no cromossomo 17q21.31, é responsável por aproximadamente 20% dos casos de CMF, preponderantemente em casos com

início antes dos 45 anos de idade. O gene *BRCA2* está localizado no cromossomo 13q13.1 e responde por uma parcela adicional de casos de CMF. Mutações germinativas em *BRCA2* conferem forte predisposição ao câncer de mama e ovário, porém, sua penetrância e idade média de diagnóstico são distintas se comparadas às mutações no gene *BRCA1* em ambos os tipos de câncer (ANTONIOU *et al.*, 2003). A Tabela 5 mostra o risco relativo em diferentes faixas etárias para portadores de mutações nos genes *BRCA* nos EUA.

BRCA1 e *BRCA2* são genes supressores de tumor que atuam na manutenção da estabilidade do genoma. Quando um dos alelos de qualquer dos dois genes está mutado na linhagem germinativa, há o aumento da predisposição para o desenvolvimento da SCMOH, de herança autossômica dominante. Além do aumento do risco de câncer de mama e ovário de início precoce, os pacientes com mutações no gene *BRCA1/2* também apresentam maior predisposição para os cânceres de pâncreas, estômago, laringe, trompas de falópio e de próstata (NIELSEN; VAN OVEREEM HANSEN; SØRENSEN, 2016).

A SCMOH é responsável por 5-7% de todos os casos de câncer de mama. Mulheres portadoras de variantes patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2* possuem risco cumulativo vital de desenvolver câncer de mama de 57-65% e 45-55%, e câncer de ovário de 39-44% ou 11-18%, respectivamente para mutações em cada um dos dois genes (NIELSEN; VAN OVEREEM HANSEN; SØRENSEN, 2016). Além de ter um papel preponderante para a oncogênese nas duas formas de câncer descritas, ambas as proteínas codificadas pelos genes *BRCA1* e *BRCA2* participam da via de RRH mediada pelo complexo de vigilância do genoma associado ao *BRCA1*, um processo fundamental de reparo do DNA, em que proteína BRCA1 desempenha um papel central.

Uma característica compartilhada entre as células da mama e ovário é a forte modulação hormonal durante o ciclo menstrual das mulheres. Um dos modelos para explicar o efeito genótipo-fenótipo diferencial das mutações em *BRCA1/2* nos tecidos mamários e ovarianos sugere que a proliferação celular modulada por hormônios produz espécies reativas de oxigênio acima dos níveis metabólicos normais, promovendo danos oxidativos e quebras na dupla fita de DNA. O crescimento celular modulado por ação hormonal torna os tecidos descritos mais vulneráveis no contexto de mutações deletérias nos genes *BRCA1/2* em decorrência da ineficiência do RRH e instabilidade genética (HAMADA *et al.*, 2001).

Tabela 5. Risco relativo (95% CI) de câncer de mama e ovário em portadores de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, baseado nas taxas de referência específicas dos EUA.

Faixa etária (anos)	<i>BRCA1</i>		<i>BRCA2</i>	
	Câncer de mama	Câncer de ovário	Câncer de mama	Câncer de ovário
20-29	17	1	19	1
30-39	33	49	16	1
40-49	32	68	9.9	6.3
50-59	18	31	12	19
60-69	14	50	11	8.4

Fonte: adaptado de ANTONIOU *et al.*, 2003.

Uma parcela adicional dos casos de CMF decorre de mutações em uma série de genes com penetrância moderada, sendo seus produtos proteicos atuantes principalmente no RRH assim como em outras vias responsáveis pela manutenção da integridade do genoma. Por fim, estudos de genômicos, cada vez mais frequentes, continuam encontrando variantes genéticas associadas ao câncer de mama com baixa penetrância, que podem contribuir para o aumento do risco de câncer de mama a partir de um modelo poligênico. Dos casos de CMF ou de início precoce, (fora de populações com viés fundador) estima-se que somente 20% podem ser explicados por mutações causais em *BRCA1/2* e, juntamente com outros genes conhecidos de alta penetrância, não sejam responsáveis por mais de 25% dos casos de CMF (LIN *et al.*, 2016; SHIOVITZ; KORDE, 2015).

A avaliação objetiva dos dados apresentados referentes à proporção dos casos de CMF causados pelos genes *BRCA1/2* torna evidente a necessidade de expandir a pesquisa por mutações para outros genes associados à patologia. Com o sequenciamento de nova geração, múltiplos genes podem ser testados para variantes patogênicas por uma fração do custo de sequenciamento individual dos genes presentes nos painéis. Além do evidente custo benefício, os painéis multigênicos podem ser particularmente indicados em pacientes com uma causa infrequente de predisposição hereditária ao câncer de mama ou em mulheres com histórico menos óbvio, tais como herança paterna do gene ou a presença de poucos parentes do sexo feminino (SLAVIN *et al.*, 2015).

1.5.2. Heterogeneidade de locus e a busca pela etiologia molecular do câncer de mama familiar

Apesar dos genes *BRCA1/2* representarem uma parcela significativa dos casos de CMF em que a etiologia genética é definida, existe grande heterogeneidade de locus associada ao aumento da predisposição dessa patologia (LIN *et al.*, 2016; SLAVIN *et al.*, 2017; TUNG *et al.*, 2016a). Em pacientes com histórico pessoal e/ou familiar de câncer de mama, o teste para mutações nos genes *BRCA1/2* é, na maioria dos casos, o passo inicial da investigação genética em busca da etiologia molecular da doença. Porém, em pacientes com ausência de mutações nos referidos genes ou quando há suspeita de síndrome de câncer hereditário causada por mais de um gene, os painéis multigênicos podem ser uma alternativa mais eficiente e com melhor custo-benefício (SLAVIN *et al.*, 2015).

A fim de verificar a contribuição para o CMF de variantes patogênicas em genes de predisposição, Slavin e colaboradores (2017) realizaram um estudo caso-controle em uma casuística de 2134 mulheres com CMF (probandas com câncer de mama e história familiar de câncer de mama ou ovário) e status negativo para mutações em *BRCA1/2*. Foi realizado o sequenciamento massivo paralelo de 26 genes em busca de mutações de ponto e CNVs. Do total de 2134 pacientes testadas, foram encontradas 181 variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em 175 pacientes, conforme ilustrado na Figura 2.

Os 26 genes estudados representam uma parcela relevante do espectro de genes associados ao CMF, porém, um número crescente de estudos demonstra a associação de novos genes à referida patologia. A maioria dos fatores moleculares associados participa de vias de manutenção da integridade do genoma conectadas aos genes *BRCA1/2*, em particular as vias de RRH, proteção das forquilhas de replicação de DNA, pontos de checagem do ciclo celular e *interstrand DNA crosslink repair* (e.g., via da anemia de Fanconi) (SANTOS-PEREIRA; AGUILERA, 2015).

O risco relativo para o câncer de mama pode diferir entre genes e variantes neles presentes, além de ser modulado pelo fundo genômico de cada indivíduo. Para a maioria dos novos genes descritos associados ao CMF, não é possível definir precisamente um risco individual, sendo esse um desafio para o manejo clínico de seus portadores e familiares. Pesquisas futuras contribuirão para definir o papel

individual dos genes de predisposição, e podem identificar mais claramente os efeitos aditivos ou sinérgicos de variantes patogênicas ou polimorfismos em múltiplos genes em conjunto. Atualmente, as variantes patogênicas com alta penetrância apresentam os riscos relativos mais precisos em função da maior rastreabilidade na segregação dos alelos ao longo das gerações (THOMPSON *et al.*, 2016).

Figura 2. Frequência de variantes patogênicas e provavelmente patogênicas em 26 genes de predisposição ao câncer de mama. Todas as 2134 pacientes testadas possuíam status negativo para mutações BRCA1/2 e câncer de mama e história familiar de câncer de mama ou ovário. Fonte: adaptado de SLAVIN *et al.*, 2017.

As variantes patogênicas em genes de alta penetrância frequentemente dirigem a oncogênese em síndromes de câncer hereditário, com um risco de câncer bem definido para cada local do corpo. Devido à diminuição do valor adaptativo de seus portadores, principalmente em decorrência do aumento da predisposição aos

diversos tipos de câncer desde o nascimento, tais genes mutados tendem a apresentar baixa incidência na população mundial. Porém, em casos em que a idade média de manifestação se encontra durante ou após a idade reprodutiva, a herdabilidade tende a ser maior, caso da maioria dos genes com penetrância moderada (MANOLIO *et al.*, 2009).

Atualmente, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11* e *TP53* são descritos como genes de alta penetrância para o câncer de mama, porém, variantes patogênicas dentro do mesmo gene podem apresentar diferentes penetrâncias e devem ser consideradas individualmente no manejo clínico de cada paciente. Mutações nesse grupo de genes são responsáveis por síndromes associadas, frequentemente, a mais de um tipo de câncer e, cada uma delas possui critérios diagnósticos específicos com diretrizes de manejo clínico individualizadas. A seguir será apresentada uma breve descrição das síndromes associadas aos genes descritos, todos eles responsáveis por uma parcela dos casos de CMF.

1.5.2.1. *CDH1* - Câncer Gástrico Difuso Hereditário

O gene *CDH1* codifica uma proteína de adesão célula-célula dependente de cálcio chamada E-caderina, expressa principalmente em junções entre as células epiteliais. Além de atuar na manutenção da estrutura tecidual, a E-caderina desempenha o papel de supressor tumoral. Mutações germinativas em *CDH1* podem causar câncer gástrico difuso hereditário, uma síndrome caracterizada pelo aumento da predisposição em diversas morbidades: cânceres de próstata, mama, colorretal, gástrico difuso e fissura labiopalatal (HANSFORD *et al.*, 2015). O risco durante a vida de câncer gástrico difuso em homens e mulheres portadores de variantes patogênicas em *CDH1* é de 67% e 83%, respectivamente. (KANGELARIS; GRUBER, 2007). Entretanto, portadoras de mutações nesse gene possuem *odds ratio* de até 6.6 para o câncer de mama (PHAROAH; GUILFORD; CALDAS, 2001).

1.5.2.2. *NF1* – Neurofibromatose tipo 1

Mutações germinativas no gene *NF1* são responsáveis pela neurofibromatose tipo 1, uma doença autossômica dominante caracterizada por alterações cutâneas e

risco aumentado de desenvolver tumores em diversas localidades. A incidência mundial da dessa patologia é de 1/3000 indivíduos, afetando ambos os sexos na mesma proporção e com igual distribuição entre todos os grupos étnicos. O produto proteico de *NF1*, a neurofibromina, atua como supressor tumoral, tendo sua expressão aumentada principalmente em células nervosas, (e.g., células de Schwann) (WILLIAMS *et al.*, 2009).

Seminog e Goldacre (2015) avaliaram a incidência de câncer de mama em portadoras de mutações germinativas em *NF1*. Das 3672 pacientes com variantes patogênicas confirmadas, 58 apresentaram câncer de mama (1.5%). Tal estudo demonstrou que o risco relativo de neoplasias mamárias para portadoras de variantes patogênicas em *NF1* é de 6,5 na faixa etária dos 30-39 anos.

1.5.2.3. *PALB2* – Anemia de Fanconi

O gene *PALB2* codifica um supressor tumoral que interage e se localiza com *BRCA2*, permitindo sua estabilização e acúmulo no núcleo. A proteína PALB2 recruta BRCA2 e RAD51 para os pontos de quebras do DNA, sendo uma importante base molecular para a estruturação do complexo multisubunitário BRCA1-PALB2-BRCA2, que desempenha um papel crucial no RRH (FOO *et al.*, 2017).

A anemia de Fanconi é uma desordem autossômica recessiva de instabilidade cromossômica caracterizada pela hematopoese incompleta, leucemia mielogênica aguda e outros tipos de tumores. Anormalidades físicas também estão presentes em aproximadamente 75% dos pacientes afetados, sendo comum uma ou mais das seguintes anormalidades: microcefalia, pigmentação anormal da pele, baixa estatura, malformações ósseas e alterações oftálmicas. Atualmente, *PALB2* é apenas um dos genes associados à forma autossômica recessiva dessa patologia; outros 18 genes apresentam variantes patogênicas que dirigem fenótipos semelhantes e recebem o nome de anemia de Fanconi ou Fanconi-like: *BRCA2*, *BRIP1*, *FANCA*, *FANCC*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*, *FANCI*, *ERCC4*, *FANCL*, *FANCM*, *MAD2L2*, *RAD51C*, *RFWD3*, *SLX4*, *UBE2T*, *XRCC2*. Complementarmente, o gene *RAD51* é responsável pela anemia de Fanconi com herança autossômica dominante e o gene *FANCB* com herança ligada ao cromossomo X (MEHTA; TOLAR, 2018).

Nos genes descritos, variantes patogênicas presentes em linhagem germinativa estão associadas ao aumento do risco de desenvolver diversos tipos de câncer, porém somente os genes *BRCA2*, *FANCC*, *FANCI*, *FANCM*, *PALB2*, *RAD51* e *RAD51C* estão associados estatisticamente ao desenvolvimento do câncer de mama, com penetrância variável de acordo com o gene e a variante apresentada (PARK *et al.*, 2014).

1.5.2.4. *PTEN* – Síndrome de Cowden

A síndrome de Cowden (SCW) possui herança autossômica dominante e decorre em 80% dos casos de mutações no gene *PTEN*. A incidência estimada da síndrome é de 1 em 200 mil pessoas, sendo a frequência de casos familiares estimada em 40-65% e penetrância estimada em 80% (HOBERT *et al.*, 2009; MARSH *et al.*, 1999). Ela se caracteriza por múltiplos hamartomas ao longo do corpo, com potencial para se tornarem tumores malignos principalmente na mama, tireoide, endométrio e pele (melanoma) (BLUMENTHAL *et al.*, 2008). Além do amplo espectro de tumores, a SCW também está associada a lesões mucocutâneas, doença fibrocística, macrocefalia e anormalidades tireoidianas.

Os pacientes com SCW relacionada ao gene *PTEN* possuem risco cumulativo vital de 90% de apresentarem alguma das morbidades descritas antes dos 20 anos. Em especial, o câncer de mama possui um risco de ocorrência ao longo da vida de 50% (ALLAIN, 2008). Mutações em outros genes promovem espectros de alterações que se sobrepõem à SCW associada ao gene *PTEN* e, por isso, recebem o nome de Cowden-like, são eles: *SDHB*, *SDHD*, *KLLN*, *PIK3CA*, *AKT1* e *SEC23B* (YEHIA *et al.*, 2015). Alguns desses genes estão associados com o aumento da predisposição ao câncer de mama e outras morbidades, porém, até o momento nenhum estudo conseguiu precisar o risco relativo específico para as neoplasias mamárias.

1.5.2.5. *STK11* - Síndrome de Peutz-Jeghers

O gene *STK11* codifica a proteína serina/treonina quinase, um supressor tumoral que regula a proliferação celular através da parada do ciclo celular na fase G1. *STK11* também participa da polarização celular, da via de sinalização WNT e

atua como regulador negativo de mTOR na via de sinalização TSC, sendo todos esses processos deflagrados a partir de estresse genotóxico (GAO *et al.*, 2011). Mutações germinativas em *STK11* são a principal causa molecular da síndrome de Peutz-Jeghers, caracterizada, assim como na síndrome de Cowden, por múltiplos hamartomas e alterações mucocutâneas decorrentes do crescimento celular descontrolado (CAMPOS, 2015). Os portadores de mutações germinativas em *STK11* apresentam um risco cumulativo vital acima de 85% de desenvolver qualquer tipo de câncer (HEARLE *et al.*, 2006). Os cânceres no trato gastrointestinal (os mais frequentes) e o câncer de mama apresentam risco cumulativo vital de 66% e 38%, respectivamente, em portadores de mutações no gene *STK11* (LIM *et al.*, 2004).

1.5.2.6. *TP53* – Síndrome de Li-Fraumeni

Mutações germinativas no gene *TP53* causam a síndrome de Li-Fraumeni, doença de herança autossômica dominante responsável pelo surgimento de um amplo espectro de múltiplos tumores ao longo da vida, incluindo tumores de mama, cerebral, sarcoma, leucemia e carcinoma adrenocortical. A maioria dos casos de câncer se manifesta do nascimento à juventude, frequentemente causando a morte do paciente em idade precoce. Portadores de mutações no gene *TP53* apresentam risco cumulativo vital de câncer de 90%, sendo o câncer de mama a principal morbidade entre as mulheres portadoras (GONZALEZ *et al.*, 2009). Apesar de a síndrome de Li-Fraumeni representar uma pequena parcela dos casos de câncer de mama (~0,1%), os portadores de mutações no gene *TP53* apresentam risco de câncer de mama 11 vezes maior do que indivíduos sem a mutação (risco relativo = 11) (THOMPSON *et al.*, 2016).

No Brasil, especialmente na região sul, uma mutação em particular no gene *TP53*, descrita como R337H, ocorre em alta frequência em pacientes com tumores adrenocorticais na infância. Achatz e colaboradores (2007) pesquisaram mutações germinativas no gene *TP53* em 45 pacientes do sul do Brasil, todos não aparentados e com histórico pessoal e familiar compatíveis com a síndrome de Li-Fraumeni. Foram encontradas variantes patogênicas em 13 pacientes (28,9%), sendo 6 delas (46,1%) a mutação R337H. A mesma mutação possui frequência estimada de 0,3% na população do sul do Brasil (ACHATZ; HAINAUT; ASHTON-PROLLA, 2009). Um

estudo realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto relatou uma frequência de 7,1% da mesma variante patogênica, R337H, em pacientes com câncer de mama e suspeita de SCMOH, evidenciando o importante papel do gene *TP53* no CMF no Brasil, especialmente da mutação descrita como de alta frequência na população da região sul-sudeste do país (CURY; FERRAZ; SILVA, 2014).

1.5.3. Vias de sinalização celular alteradas no câncer de mama familiar

As mais diversas formas de câncer compartilham entre si uma estrutura genética caracterizada por alterações, quase sempre, em genes que atuam no controle do ciclo celular ou na manutenção da integridade do genoma. Para o CMF, as principais vias de sinalização celular compreendem as vias de reparo por recombinação homóloga (RRH), reparo de pareamento incorreto (*mismatch repair*) (RPI) e reparo em trans entre cadeia (RTC) (SHIOVITZ; KORDE, 2015).

Ao analisar as redes de interação dos produtos gênicos associados ao CMF, observa-se uma acentuada convergência nas vias de manutenção do genoma conectadas aos genes *BRCA1/2*, atuando como redes complementares responsáveis pela resposta à diferentes formas de estresse genotóxico (e g., RRH) (NIELSEN; VAN OVEREEM HANSEN; SØRENSEN, 2016). Wang e colaboradores (2000) utilizaram imunoprecipitação juntamente com espectrometria de massa para analisar as proteínas associadas a *BRCA1*, identificando o complexo multisubunitário BASC (*BRCA1-associated genome surveillance complex*), composto pelas proteínas ATM, BLM, MSH2, MSH6, MLH1, RAD50, MRE11, NBS1.

Marcadamente, todos os genes que codificam o grupo de proteínas integrantes foram clinicamente associados ao CMF, tornando evidente o importante papel do complexo BASC e das vias de sinalização celular envolvidas para a etiologia molecular do CMF. Posteriormente, a compreensão sobre as interações realizadas pela proteína *BRCA1* foi atualizada, sendo descritas mais de 100 interações com diferentes peptídeos (JIANG; GREENBERG, 2015).

O mecanismo de recombinação homóloga utiliza a cromátide irmã não danificada como molde para realizar o reparo de alta precisão de quebras de dupla fita de DNA associadas à replicação. A recombinação homóloga está entre os

principais mecanismos para proteção da integridade do genoma nas células mitóticas, destacando-se pela baixa frequência de erros na sequência reparada, o que diminui a incidência de translocações e deleções cromossômicas quando comparada aos outros mecanismos de reparo (SCHLACHER *et al.*, 2011).

Quando ocorrem quebras na dupla-fita do DNA, os mecanismos de manutenção da integridade do genoma devem identificar e reparar o dano imediatamente. O complexo proteico MRN, composto pelos peptídeos MRE11A, RAD50 e NBN, é responsável pela identificação das extremidades livres do DNA. Posteriormente, o complexo sinaliza o ponto de verificação de dano ao DNA por meio da ativação da proteína ATM. Ambas as etapas são essenciais para o funcionamento do reparo ao promover o processamento da dupla-fita do DNA, expondo a fita simples para as próximas etapas do RRH (Figura 3) (PRAKASH *et al.*, 2015).

Outra importante via de reparo envolvida na oncogênese do CMF é a de RPI, atuando no reconhecimento e reparo de inserções errôneas, incorporações e exclusões incorretas de nucleotídeos. Variantes patogênicas presentes nos genes de RPI (*PMS2*, *MSH2*, *MSH6* e *MLH1*) são responsáveis pela síndrome de Lynch (Figura 3) (VASEN; TOMLINSON; CASTELLS, 2015). O funcionamento incorreto desta via resulta no acúmulo de mutações de ponto e de microssatélites. A eficácia da via de RRH é dependente do funcionamento correto da via de RPI, pois o acúmulo excessivo de nucleotídeos emparelhados erroneamente faz com que a precisão RRH seja reduzida devido ao emparelhamento incorreto da cromátide irmã utilizada como molde no reparo (THAM; KANAAR; LEBBINK, 2016). A ineficiência desses processos promove o acúmulo de mutações ao longo do genoma, com notável impacto clínico para o CMF.

Por fim, a via de RCT requer a participação de diversas vias de reparo, inclusive a de RRH e anemia de Fanconi. As intersecções em trans entre cadeias ocorrem devido ao contato do DNA com produtos tóxicos do metabolismo ou com reagentes quimioterápicos. O complexo proteico responsável pelo RCT inibe a progressão da forquilha de replicação do DNA, permitindo que os fatores do grupo de complementação da anemia de Fanconi realizem o reparo das lesões (BOGLIOLO; SURRALLÉS, 2015). Como descrito anteriormente, *BRCA2*, *BRIP1*, *RAD51C* e *PALB2* são genes do grupo de complementação da anemia de Fanconi que também atuam no RCT, evidenciando a extensa interação entre as proteínas

envolvidas nas vias na manutenção da integridade do genoma e a etiologia molecular do CMF.

Figura 3. Vias de estabilidade do genoma e a atuação dos genes associados ao câncer de mama familiar. **a.)** O RRH tem início com a excisão da extremidade 5' na região da quebra, deixando a extremidade 3' em forma de simples fita de DNA (sfDNA). Este processo é mediado pela proteína ATM e pelo complexo MRN. Posteriormente, BRCA2 e PALB2 transportam RAD51 para a extremidade 3'-sfDNA, formando a filamento nucleoproteico. O filamento interage com a sequência complementar na cromátide-irmã, utilizando-a como molde para a síntese de DNA. O RRH é finalizado pela ligação entre as extremidades do DNA. **b.)** O RPI promove a estabilidade do genoma ao corrigir o emparelhamento incorretos das bases do DNA. As proteínas MSH2, MSH2, PMS2, MLH1 participam do reconhecimento e "engajamento" da exonuclease 1 (EXO1), responsável pela excisão do seguimento que contém a base incorreta. Posteriormente, a DNA polimerase (POL) sintetiza o seguimento excisado. Fonte: adaptado de NIELSEN; VAN OVEREEM HANSEN; SØRENSEN, 2016.

Apesar do evidente papel das vias descritas, as recorrentes descobertas de novos genes associados ao CMF trazem à luz a extensa heterogeneidade de locus que, aparentemente, cobre apenas uma parte das vias envolvidas nessa patologia. Como exemplo notável, os genes de alta penetrância *CDH1* e *NF1*, são supressores tumorais, mas não participam das vias canônicas associadas à predisposição hereditária ao câncer de mama. O estudo aprofundado das vias canônicas e de outras vias menos compreendidas pode, em conjunto com estudos em modelos

animais, aumentar a possibilidade de alvos terapêuticos do CMF ou em casos de câncer esporádico que apresentam mutações somáticas nos mesmos genes (NIELSEN; VAN OVEREEM HANSEN; SØRENSEN, 2016).

1.6. Aconselhamento genético em câncer de mama

O AG individualizado e multidisciplinar é uma importante ferramenta, capaz de contribuir para melhoria do prognóstico dos pacientes, aperfeiçoar o rastreamento do estrato populacional com susceptibilidade aumentada para doenças genéticas bem como potencializar a eficácia de estratégias preventivas e terapêuticas disponíveis. Parte fundamental desse acompanhamento corresponde ao AG disponibilizado ao paciente que, segundo os critérios de inclusão, apresenta CMF ou aos seus familiares próximos, devido ao risco aumentado pelo compartilhamento de fatores genéticos e ambientais.

A *National Society of Genetic Counselors* - USA define o AG como “o processo de ajudar as pessoas a entenderem e se adaptarem às implicações médicas, psicológicas e familiares das contribuições genéticas para a doença” (RESTA *et al.*, 2006). Trata-se de um processo que inclui avaliação clínica, testes genéticos quando apropriados e recomendações para gestão do risco de ocorrência ou recorrência. Devido ao caráter psicoeducacional dinâmico com inúmeras implicações psicológicas, as informações devem ser transmitidas de maneira didática e não diretiva (AUSTIN; SEMAKA; HADJIPAVLOU, 2014).

No contexto de uma ou mais sessões de aconselhamento genético, o consulente deve ser informado sobre os mais diversos aspectos da condição genética em que está inserido, possibilitando escolhas informadas sobre o curso de ação clínica mais apropriada em virtude do risco individual, padrões éticos e religiosos e objetivos familiares, sejam elas voltadas às terapias e tratamentos disponíveis ou decisões reprodutivas (BIESECKER; PETERS, 2001).

O aconselhamento genético voltado ao câncer (esporádico ou familiar) depreende a participação multidisciplinar de diversos profissionais de forma integrada, objetivando a otimização dos benefícios e diminuição dos possíveis danos e angustias apresentadas pelos pacientes. No contexto colaborativo, é preconizada a participação de um aconselhador genético; um médico geneticista ou clínico (e.g.,

oncologista); profissionais de saúde mental; endocrinologistas e especialistas em reprodução (*NATIONAL CANCER INSTITUTE*, 2017).

O câncer de mama esporádico tem idade média de apresentação aos 62 anos e decorre de alterações na sequência ou expressão de genes responsáveis, sobretudo, pelo controle do ciclo celular ou pela manutenção da integridade do genoma. As mutações genéticas se acumulam progressivamente ao longo dos anos em decorrência da exposição à fatores ambientais e endógenos, até que as células mamárias obtêm a capacidade de transgredir as regras básicas do comportamento celular. (SIEGEL *et al.*, 2011) Nesses casos, o AG se fundamenta no risco absoluto da população em geral (aproximadamente 12% em mulheres), sendo seguidas as orientações de rastreio para a faixa etária vigente.

O CMF possui penetrância variável de acordo com a mutação presente em determinadas famílias. Devido ao espectro variável de apresentação clínica, alguns critérios de elegibilidade são utilizados para indicar quais pacientes sob suspeita devem buscar a avaliação de risco genético. Segundo as diretrizes mais recentes publicadas pelo NCCN, indivíduos que se enquadram em ao menos um dos seguintes critérios devem procurar buscar o AG para avaliação de risco hereditário de câncer de mama (DALY *et al.*, 2017):

- 1) Um indivíduo com câncer de ovário;
- 2) Um indivíduo com câncer de mama associada a qualquer um dos seguintes critérios
 - a) Uma mutação conhecida na família em um gene de susceptibilidade de câncer;
 - b) Câncer de mama diagnosticado ≤ 50 anos;
 - c) Câncer de mama triplo negativo diagnosticado ≤ 60 anos;
 - d) Dois casos isolados de câncer de mama no mesmo indivíduo.
 - e) Um indivíduo com câncer de mama em qualquer idade e
 - i) Um ou mais parentes próximos com câncer de mama diagnosticado ≤ 50 anos ou;
 - ii) Um ou mais parentes próximos com câncer de ovário em qualquer idade ou;
 - iii) Dois ou mais parentes próximos com câncer de mama, próstata (metastático), e/ou pâncreas em qualquer idade ou;
 - iv) História pessoal de câncer de pâncreas em qualquer idade, ou;

- v) Indivíduo com ascendência de população de risco (e. g., judeus Ashkenazi).
 - f) Câncer de mama no sexo masculino.
- 3) Um indivíduo com câncer de próstata metastático (com evidência radiográfica ou comprovado por biópsia);
 - 4) Um indivíduo com ascendência judaica Ashkenazi com câncer de mama, ovário ou pâncreas em qualquer idade;
 - 5) Um indivíduo com histórico pessoal e/ou familiar e três ou mais dos seguintes critérios (especialmente se diagnosticado com idade ≤ 50 anos, podendo incluir múltiplos cânceres primários no mesmo indivíduo): câncer de mama, câncer pancreático, câncer de próstata, melanoma, sarcoma, carcinoma adrenocortical, tumores cerebrais, leucemia, câncer gástrico difuso, câncer de cólon, câncer de endométrio, câncer de tireoide, câncer renal, manifestações dermatológicas, e/ou macrocefalia, ou pólipos hamartomatosos no trato gastrointestinal;
 - 6) Um indivíduo sem histórico pessoal de câncer, mas com:
 - a) Um parente próximo com qualquer dos seguintes critérios
 - i) Uma mutação descrita em um gene de suscetibilidade ao câncer dentro da família;
 - ii) Dois ou mais casos primários de câncer de mama em um mesmo indivíduo;
 - iii) Dois ou mais indivíduos com casos de câncer de mama primários no mesmo lado da família com pelo menos um diagnosticado ≤ 50 anos;
 - iv) Câncer de ovário;
 - v) Câncer de mama no sexo masculino.
 - b) Parente de primeiro ou segundo grau com câncer de mama ≤ 45 anos;
 - c) Histórico familiar de três ou mais dos seguintes (especialmente se diagnosticada com idade ≤ 50 anos, podendo incluir múltiplos cânceres primários no mesmo indivíduo): câncer de mama, câncer de pâncreas, câncer de próstata (metastático), melanoma, sarcoma, carcinoma adrenocortical, tumores cerebrais, leucemia, câncer gástrico difuso, câncer de cólon, câncer de endométrio, câncer de tireoide, câncer de rim, manifestações dermatológicas, e/ou macrocefalia, ou pólipos hamartomatosos de trato gastrointestinal.

A avaliação inicial do probando é frequentemente realizada por um clínico geral ou oncologista que pode não estar familiarizado com os conceitos de oncogenética e predisposição hereditária ao câncer (BURKE *et al.*, 2009). Quando um ou mais dos critérios apresentados forem preenchidos pelo probando, é indicada uma avaliação detalhada do histórico familiar e pessoal do paciente por um profissional de genética do câncer para a realização do AG.

No AG para câncer de mama com suspeita de risco hereditário, o histórico familiar deve ser colhido com extrema precisão. Deve ser elaborado um heredograma expandido incluindo três gerações ao redor dos indivíduos com diagnóstico de câncer, sendo recomendado verificar, preferencialmente por meio de registros médicos, as seguintes informações para os membros familiares: ocorrência de câncer (preferencialmente com avaliação anatomopatológica); bilateralidade; idade de diagnóstico; histórico reprodutivo e do uso de hormônios/contraceptivos orais; histórico de quimioterapia ou de cirurgia para redução de risco (salpingo-ooforectomia e mastectomia). Adicionalmente, um exame físico, conduzido por um médico qualificado, deve ser focado em sinais dermatológicos, alterações tireoidianas ou outras alterações físicas que podem estar associadas às síndromes com risco hereditário de câncer de mama (e.g., síndrome de Cowden) (LEVY; GARBER; SHIELDS, 2009).

1.6.1. Modelos de predição de risco

Após a detalhada verificação dos dados obtidos, recomenda-se a avaliação do risco absoluto de câncer de mama ou em outras localidades, bem como o risco de ser portador de uma variante patogênica em linhagem germinativa associada à predisposição hereditária ao câncer de mama. Alguns modelos estatísticos foram desenvolvidos para estimar o risco cumulativo vital de desenvolver câncer de mama. As tabelas de Claus podem ser utilizadas para fornecer o risco estimado de câncer de mama em mulheres de ascendência europeia sem mutações em linhagem germinativa associadas ao câncer, e que apresentem ao menos um parente de primeiro ou segundo grau com câncer de mama (CLAUS; RISCH; THOMPSON, 1994).

Outra ferramenta utilizada para estimar o risco de câncer de mama é o modelo de regressão logística multivariado de Gail, que utiliza dados do histórico pessoal e familiar da probanda para prever o risco para os próximos cinco anos e o risco cumulativo vital, até os 90 anos. Porém, esse modelo somente atribui valor aos parentes de primeiro grau com câncer, o que limita sua eficácia em mulheres com suspeita de síndrome hereditária de câncer de mama (COSTANTINO *et al.*, 1999; EUHUS *et al.*, 2002).

Além dos modelos que avaliam o risco absoluto do probando ser diagnosticado com câncer de mama, também são utilizados algoritmos para estimar a probabilidade de variantes patogênicas em *BRCA1/2*. Essas ferramentas são amplamente utilizadas na prática clínica como indicativo individualizado para a realização de teste moleculares nos referidos genes, podendo-se destacar os algoritmos BRCAPRO, BOADICEA e Myriad II (ANTONIOU *et al.*, 2008)

O histórico pessoal/familiar é utilizado para estimar o risco de câncer de mama por meio de diversos modelos disponíveis. Um risco cumulativo vital igual ou superior a 20% tem sido utilizado em diretrizes clínicas como o limiar para alterar a conduta clínica do paciente. No Brasil, o INCA, por meio da publicação da Rede Nacional de Câncer Familiar – Manual Operacional (2009), recomenda:

“Autoexame mensal, exame clínico das mamas semestral e mamografia anual, 5-10 anos antes da idade ao diagnóstico mais precoce na família ou a partir dos 40 anos de idade, associada a ultrassonografia mamária entre 40-50 anos de idade.”

Apesar dos modelos de predição de risco contribuírem para individualizar a conduta clínica do probando, algumas limitações devem ser observadas no contexto de cada modelo ou algoritmo. Um dos principais fatores limitantes é o desempenho inferior dos algoritmos de predição de variantes patogênicas nos genes *BRCA1/2* em populações racialmente diversas como a brasileira, sendo o AG importante para avaliar a viabilidade dos testes genéticos para mutações em genes associados ao CMF (KURIAN, 2010).

1.6.2. Acionabilidade e manejo clínico de variantes patogênicas com diferentes penetrâncias

Com a popularização dos testes genéticos baseados nas tecnologias de sequenciamento de nova geração, a procura por painéis genéticos para o câncer de mama vem crescendo exponencialmente nos últimos anos em resposta à diminuição do custo dos exames. Porém, o número de genes descritos atualmente associados ao CMF não é capaz de explicar a totalidade dos casos, o que dificulta o diagnóstico molecular em diversas situações. Outro aspecto limitante para a definição da etiologia genética nessa patologia é a dificuldade em classificar a patogenicidade das variantes encontradas. O melhor painel multigênico possível deve ser elaborado para minimizar o número de variantes de significado incerto (VUS), sendo a inclusão de genes com baixa penetrância ou identificados recentemente um complicador para a interpretação dos achados (STANISLAW; XUE; WILCOX, 2016).

Com o intuito de auxiliar a interpretação do grande número de dados gerados pelo NGS, o *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) em conjunto com a *Association for Molecular Pathology* dos EUA (AMP) recomenda um conjunto de diretrizes para a classificação de variantes genéticas. Com base em critérios objetivos, as variantes são classificadas de acordo com diversos aspectos: posição, tipo (e.g. *frameshift*), frequência populacional, entre outros. Posteriormente esses critérios são combinados de acordo com regras de pontuação para classificação final das variantes em quatro diferentes níveis de patogenicidade: patogênica, provavelmente patogênica, provavelmente benigna e benigna. Se uma variante não cumprir os critérios utilizados na definição de um desses conjuntos (patogênica ou benigna), ou se as evidências para classificação forem conflitantes, a variante é descrita como VUS (RICHARDS *et al.*, 2015).

A ASCO, visando prover diretrizes gerais para os testes genéticos e genômicos para susceptibilidade ao câncer publicou declaração recomendando testar os probandos somente quando: 1) há histórico pessoal e/ou familiar sugestiva de susceptibilidade genética ao câncer; 2) o teste pode ser interpretado adequadamente; e 3) os resultados auxiliarão no diagnóstico ou influenciarão o manejo clínico ou cirúrgico do paciente ou dos familiares em risco hereditário de câncer (ROBSON *et al.*, 2010).

Mesmo com a presença confirmada de uma ou mais variantes patogênicas,

torna-se complexo estimar o risco relativo em portadores assintomático e o risco de recorrência em pacientes diagnosticados, devido principalmente ao caráter multifatorial do câncer de mama. Nesses casos, a orientação de um aconselhador genético antes (pré-teste) e depois (pós-teste) da realização do teste genético pode trazer diversos benefícios ao fornecer informações relevantes para a tomada de escolhas informadas e adaptação às condições de risco (ROBSON *et al.*, 2015).

O AG pré-teste deve avaliar o risco de câncer do probando com base nas informações sobre o histórico pessoal e familiar, além de educá-lo, de forma didática, acerca de padrões de herança, expressividade variável, penetrância, heterogeneidade genética populacional entre outros conceitos relevantes para o entendimento da patologia. Os possíveis resultados do teste genético também podem ser abordados (Tabela 6), incluindo a classificação das possíveis variantes encontradas. No AG pós-teste é recomendado discutir as implicações clínicas (se houver) do resultado, abordando quais as opções disponíveis de manejo clínico estruturadas na alteração encontrada e no histórico pessoal/familiar do probando. Caso o indivíduo testado seja portador de variante(s) patogênica(s), outros parentes próximos podem ser testados de acordo com o risco hereditário de câncer (DALY, 2017).

Tabela 6. Possíveis resultados de teste genético em genes de predisposição ao câncer.

Verdadeiro positivo	O probando é portador de alteração em um gene de predisposição conhecido
Verdadeiro negativo	O probando não é portador de alteração em gene de predisposição que foi positivamente identificado em um membro familiar
Indeterminado (não informativo)	O probando não é portador de alteração em gene de predisposição e o status de portador de outros familiares é negativo ou desconhecido
Inconclusivo	Variante de significado incerto

Os testes genéticos para genes de predisposição ao câncer devem ser avaliados no contexto pessoal e familiar do probando para definir se o resultado é conclusivo. Em casos inconclusivos, a variante pode ser reavaliada posteriormente para verificar se houve alteração em seu status conforme novas atualizações são publicadas. Fonte: adaptado de DALY *et al.*, 2017.

Ao determinar a metodologia mais recomendada para o probando, deve-se considerar seu histórico pessoal e familiar objetivando maximizar a possibilidade de encontrar uma variante patogênica causal, com atenção especial aos aspectos técnicos e limitações das metodologias diagnósticas disponíveis. Nos EUA o *Genetic Testing Registry* (GTR), associado ao *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) fornece um local central para divulgação voluntária de testes genéticos fornecidos no país, além de informações sobre metodologias, genes avaliados, validade clínica e evidências da utilidade do teste (Tabela 7). Dentre as metodologias mais utilizadas para identificar alterações genéticas associadas ao CMF, destacam-se o *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA) para análise de deleções e duplicações e o NGS para análise por sequenciamento de toda região codificante, podendo ser realizadas concomitantemente em busca de mutações de ponto, indels e deleções e duplicações maiores. (CASTÉRA *et al.*, 2014)

Mesmo com o descobrimento de diversos genes associados ao CMF, os testes diagnósticos são largamente baseados em mutações nos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* ou em outros genes de alta penetrância, porém, estes representam somente uma parcela do espectro de genes associados ao CMF. Os demais genes associados à patologia não são frequentemente abordados no AG, devido principalmente ao número ainda limitado de informações precisas sobre o risco relativo de suas variantes patogênicas (GUO *et al.*, 2017).

Sendo assim, apesar do extenso arcabouço teórico acerca dos mecanismos genéticos e dos fatores de risco que predispõe o surgimento do câncer de mama, ainda existe uma lacuna no conhecimento quanto a sua etiologia, sendo de extrema relevância expandir o entendimento do espectro de susceptibilidade genética e precisar o risco atribuído às variantes patogênicas associadas ao CMF, potencialmente resultando em melhorias no rastreamento, prevenção e estratégias terapêuticas para os pacientes e suas famílias. Tal abordagem deve ser estudada à luz das novas tecnologias de sequenciamento de DNA em conjunto com estudos de interação entre genes prevalentemente mutados e as vias de sinalização celular em que eles participam.

Tabela 7. Testes genéticos registrados nos EUA para câncer de mama

Testes de genética molecular e citogenética	Metodologia	# de testes registrados por metodologia
Hibridação <i>in situ</i> fluorescente	FISH	1
Detecção de homozigidade	Microarray	1
Análise de deleção e duplicação	MLPA	220
Análise por sequenciamento de exons selecionados	Sequenciamento bidirecional por Sanger	16
Análise de variantes alvo	Sequenciamento bidirecional por Sanger	31
Busca de mutações em toda região codificante	NGS	9
Análise de mutações de exons selecionados	NGS	6
Análise por sequenciamento de toda região codificante	NGS	262
Total	5	*318

Testes de genética molecular e citogenética cadastrados no GTR, metodologias utilizadas e quantidade total por metodologia. Foram contabilizados somente testes genéticos de uso clínico credenciados nos EUA. **Determinados laboratórios utilizam mais de uma metodologia para buscar mutações no mesmo indivíduo, frequentemente a análise por sequenciamento de toda região codificante (NGS) juntamente com a análise de deleção e duplicação (MLPA). Fonte: adaptado de GTR, 2018.

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo geral

Avaliar a contribuição de genes e variantes genéticas presentes em linhagem germinativa e vias de sinalização celular ainda pouco estudadas para oncogênese do CMF, objetivando a complementação do atual conhecimento disponível para o aconselhamento genético dispendido aos pacientes atingidos pelo CMF e aos seus familiares.

1.7.2. Objetivos específicos

- 1) Revisão bibliográfica acerca dos genes associados à predisposição hereditária ao câncer de mama, com foco em genes e variantes patogênicas presentes em linhagem germinativa responsáveis pela oncogênese no CMF, bem como a atualização dos genes avaliados em painéis multigênicos para essa patologia.
- 2) Estudo de vias de sinalização celular predominantemente alteradas no CMF e interação entre os produtos proteicos dos genes de susceptibilidade ao câncer de mama.
- 3) Avaliar as variantes gênicas presentes em pacientes do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco (CEGH-CEL), que realizaram o painel multigênico para “câncer hereditário” com indicação clínica para pesquisa de mutações em genes associados ao câncer de mama.

Capítulo 2 - Metodologia

2.1 Revisão bibliográfica dos genes e variantes genéticas associadas ao câncer de mama familiar

As buscas foram realizadas nas bases de dados *Scientific Electronic Library Online* (SciELO), PubMed, GoogleScholar, *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) e *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Foram selecionados artigos de publicações científicas internacionais, em inglês, com data de publicação entre os anos de 2002 e 2018.

Os termos “*familial breast cancer*”, “*hereditary breast cancer*”, “*hereditary breast and ovarian cancer*”, “*hereditary predisposition to breast cancer*”, “*cancer genetic counseling*”, “*inherited risk of breast cancer*” e “*breast cancer susceptibility genes*” foram utilizados inicialmente para avaliar o maior número de genes com pressuposta associação ao risco hereditário de câncer de mama.

Posteriormente, foram incluídos artigos com delineamento observacional (estudos de coorte e caso controle) que atendiam os seguintes critérios: 1) realização sequenciamento gênico em linhagem germinativa para a avaliação da presença de variantes genéticas associadas à predisposição hereditária ao câncer de mama; 2) apresentação do risco estimado para o portador em uma das seguintes fórmulas: risco relativo, *Odds Ratio*, risco cumulativo vital, risco estratificado por idade do portador ou *Standardized incidence ratios* (SIR); 3) coorte exclusivamente composta por indivíduos do sexo feminino que satisfaçam um ou mais dos seguintes critérios: pacientes diagnosticadas com câncer de mama (preferencialmente em idade precoce) com ou sem histórico familiar de câncer de mama ou ovário; pacientes assintomáticos com histórico familiar de 3 ou mais casos de câncer de mama em parentes próximos do mesmo lado da família. Os dados obtidos na revisão bibliográfica foram compilados e tabulados, resumizando o conhecimento atual acerca da variabilidade gênica associada ao CMF.

2.2 Análise de vias de sinalização celular e interação entre os produtos gênicos representados na revisão bibliográfica

Com base nos genes associados ao CMF apurados na revisão bibliográfica, foi realizada análise de interação molecular e química entre os genes e seus produtos no *software* de bioinformática *Ingenuity® Pathway Analysis* - Qiagen® (IPA) - www.qiagenbioinformatics.com). O IPA é uma ferramenta computacional baseada em bancos de dados internacionais e estudos publicados da web, com informações revisadas para formar uma base de dados própria: *Ingenuity Knowledge Base*.

Para a presente análise, foi utilizada a função *core analysis*, que utiliza algoritmos para identificar mecanismos, relações, funções e vias de sinalização celular mais relevantes entre o grupo de genes indicados. O uso da função *core analysis* objetivou o mapeamento das vias canônicas e redes de interação entre os genes indicados, sendo estabelecidos o seguinte conjunto de critérios para delinear o ensaio: análise de expressão entre os genes indicados, interações diretas, confiança testada experimentalmente, máximo de 35 moléculas por rede, 25 redes por análise, *homo sapiens* como espécie avaliada e análise de todos os tecidos e células primárias.

As vias de sinalização celular foram escalonadas de acordo com o valor-*p*, obtidos por meio do teste exato de Fisher, sob hipótese nula de que os fatores atuantes dentro da via estão conectados de forma estocástica. As redes de interação entre os produtos dos genes indicados na análise foram avaliadas de acordo com uma pontuação gerada pelo *software*, considerando o número de moléculas e quantidade de conexões na rede de interação (KRÄMER *et al.*, 2014). As principais vias de sinalização celular e redes de interação entre genes-chave para a etiologia da doença foram utilizadas para avaliar indiretamente a composição de painéis multigênicos para o câncer de mama, com foco na avaliação funcional dos produtos gênicos.

2.3 Casuística, controles e painel multigênico realizado por pacientes do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco – USP

O uso do material genético e dados genômicos dos pacientes para essa pesquisa foi autorizado por meio de um termo de consentimento livre e esclarecido. O uso científico de amostras armazenadas no Biobanco do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-tronco (CEGH-CEL) foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, CAAE 46293315.0.0000.5464. Todas as amostras dos pacientes foram desidentificadas para manter o anonimato. Foram estudados 79 pacientes do sexo feminino, com idade entre 23 e 73 anos no momento do teste (média= 46,7; desv. padrão= 11,9), todos com diagnóstico de câncer de mama ou síndrome de predisposição ao câncer de mama, encaminhados ao laboratório do CEGH-CEL para realização de testes moleculares para câncer hereditário. As análises computacionais foram realizadas pela equipe técnica do CEGH-CEL e, posteriormente, os dados foram gentilmente cedidos para elaboração da presente dissertação. 78,4% (62/79) dos pacientes declararam ter um ou mais parentes próximos diagnosticados com câncer de mama. O painel multigênico utilizado foi personalizado para a plataforma MiSeq – Illumina (*Nextera Target Enrichment*), contendo ao todo 320 genes associados a patologias diversas, incluindo 89 genes associados a formas de câncer hereditário (rendimento médio de 100x a 200x). Os fragmentos obtidos no sequenciamento (reads) foram alinhados com a ferramenta *Burrows-Wheeler Aligner*. (LI; DURBIN, 2009) A triagem e remoção de duplicatas de PCR foi realizada com o programa Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>), e o controle de qualidade, a recalibração e chamada de variantes foram realizados utilizando o programa *Genome Analysis Toolkit* (GATK) (VAN DER AUWERA *et al.*, 2013). Para realizar a divisão de variantes multialélicas foi utilizado a linguagem ruby por meio da ferramenta Atlas2, (EVANI *et al.*, 2012) e a anotação de variantes em diversos bancos de dados públicos com o programa Annovar. (WANG; LI; HAKONARSON, 2010) A análise da variação do número de cópias foi realizada por meio do programa o NextGENe® (SoftGenetics). Do total de 89 genes avaliados no painel “câncer hereditário”, 21 genes associados ao câncer de mama foram selecionados e a coorte foi reanalisada para variantes patogênicas, provavelmente patogênicas ou VUS.

Capítulo 3 - Resultados

3.1 Compilação e tabulação dos dados da literatura

A revisão bibliográfica objetivou avaliar os genes e variantes genéticas que apresentam associação estatística com a predisposição ao câncer de mama, com atualização dos recentes achados científicos, compilação e organização sistemática das informações.

Por meio de uma extensa revisão da literatura direcionada às alterações genéticas responsáveis pela predisposição hereditária ao câncer de mama, foi definida uma lista de 49 genes com associação descrita ao CMF ou presentes em painéis multigênicos para predisposição ao câncer de mama: *ABRAXAS1*, *ATM*, *AXIN2*, *BARD1*, *BLM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CASP8*, *CDH1*, *CHEK2*, *CYP19A1*, *ESR1*, *FANCC*, *FANCI*, *FANCM*, *FGFR2*, *HMMR*, *LSP1*, *MAP3K1*, *MLH1*, *MRE11A*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *NF1*, *NQO2*, *PALB2*, *PHB*, *PIK3CA*, *PMS2*, *PPM1D*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RAD54L*, *RINT1*, *SDHD*, *STK11*, *TERT*, *TOX3*, *TP53*, *UIMC1*, *XRCC2*, *XRCC3*.

A associação dos genes e variantes patogênicas foi verificada por meio da avaliação de publicações científicas que realizaram estudos observacionais para determinação do risco de câncer de mama em seus portadores. Foram utilizados diversos bancos de dados e *genome browsers* para confirmar as informações levantadas (OMIM, NCBI, UCSC e ClinVar), constituindo um amplo panorama do espectro de genes associados à patologia.

O risco para o portador de variantes patogênicas é calculado por diferentes fórmulas, de acordo com o tipo de estudo realizado (caso-controle, GWAS, análise de segregação familiar), porém, todas têm como finalidade quantificar a força de associação entre um determinado fator (variante patogênica) e o câncer de mama.

Alguns autores apresentam um risco generalizado para variantes deletérias em determinados genes, frequentemente para mutações *nonsense*, *frameshift* ou em sítio de *splicing*, portanto, nem todos os genes listados possuem variantes específicas associadas ao risco de câncer de mama. Outros trabalhos apresentam o risco para mutações específicas, o que facilita a determinação individualizada do risco para cada portador, mas imprime certa variabilidade de acordo com a patogenicidade de cada variante.

Do total de 49 genes citados na literatura ou presentes em painéis multigênicos para o CMF, somente 45 possuem associação estatística definida para a susceptibilidade ao câncer de mama. Os genes *ABRAXAS1*, *PIK3CA*, *RAD54L* e *SDHD* estão mutados em famílias com casos recorrentes de câncer de mama ou ovário, mas não possuem um risco descrito especificamente associado ao câncer de mama, portanto, foram desconsiderados nas análises posteriores.

Tabela 8. Genes com associação estabelecida entre o câncer de mama e variantes patogênicas.

Gene	Forma de herança	Risco de CM	IC de 95%	Valor-p	Variantes associadas ao risco	Outros tipos de câncer	Observações	Referências
ABRAXAS1	-	Sem estimativa de risco	-	-	-	-	-	RENAULT <i>et al.</i> , 2016
ATM	AD	OR: 3.28	2.06–5.21	3.64X10E-06	-	-	p.Val2424Gly promove um risco elevado de câncer de mama	SLAVIN <i>et al.</i> , 2017
AXIN2	AD	OR: 3.1	1.6-5.8	<0.001	rs2240308	Colorretal	-	ARISTIZABAL-PACHON <i>et al.</i> , 2015
BARD1	AD	OR: 3.18	1.34-7.36	1.22X10E-2	-	-	-	SLAVIN <i>et al.</i> , 2017
BLM	AR	OR 3.3	1.9-5.6	1.9 × 10E-5	c.1642C>T (p.Gln548X)	Colorretal	-	PROKOFYEVA <i>et al.</i> , 2013
BRCA1	MF, AD	OR: 5.91	5.25-6.67	2.2x10E-186	-	Ovário e próstata	-	KURIAN <i>et al.</i> , 2017
BRCA2	AD	OR: 3.31	2.95-3.71	2.7x10E-95	-	Ovário e próstata	-	KURIAN <i>et al.</i> , 2017
BRIP1	AD	RR: 2	1.2-3.2	0.012	-	Ovário	-	SEAL <i>et al.</i> , 2006
CASP8	AD	OR: 1.28	1.21-1.35	<5x10E-6	-	-	Variantes com efeito protetivo	CAMP <i>et al.</i> , 2012
CDH1	AD	OR: 6.6	31017	<0.05	c.1588insC e p.Gli832Ala	Gástrico difuso	Específico de câncer de mama lobular	PHAROAH; GUILFORD; CALDAS, 2001
CHEK2	AD	RCV: 37%/ OR: 3.0	26%-56%	<0.05	c.1100delC	-	-	WEISCHER <i>et al.</i> , 2008/ EASTON <i>et al.</i> , 2015
CYP19A1	AR (?)	OR: 1.09-1.56	0.78-2.80	<0.05	rs28566535, rs1870049, rs1004982	-	-	CHEN <i>et al.</i> , 2008
ESR1	AD	RR: 1.29	1.21–1.37	2.0X10E-15	rs2046210	-	-	EASTON <i>et al.</i> , 2007

Gene	Forma de herança	Risco de CM	IC de 95%	Valor-p	Variantes associadas ao risco	Outros tipos de câncer	Observações	Referências
FANCC	AR	SIR: 2.4	1.1-2.7	<0.05	p.Leu554Pro, c.711+4A>T, c.322delG	-	-	BERWICK <i>et al.</i> , 2007
FANCI	AR	OR: 1.3	0.1-14.9	<0.05	c.2957_2969del	-	Risco estimado para pacientes com CMF em idade precoce	MANTERE, 2017
FANCM	AR	OR: 1.86	1.26–2.75	0.0018	c.5101C>T (p.Gln1701X)	-	-	KIISKI <i>et al.</i> , 2014
FGFR2	-	OR: 1.26	1.23–1.30	2x10E-76	-	-	-	EASTON <i>et al.</i> , 2007
HMMR	AD	OR: 2.73 (<40 anos)	1.08–3.75	<0.05	rs10515860	-	-	PUJANA <i>et al.</i> , 2007
LSP1	-	OR: 1.07	1.04–1.1	3x10E-9	rs3817198	-	Patogenicidade associada a mutações em BRCA1/2	EASTON <i>et al.</i> , 2007
MAP3K1	-	OR: 1.13	1.10–1.16	7x10E-20	rs889312	-	Patogenicidade associada a mutações em BRCA1/2	EASTON <i>et al.</i> , 2007
MLH1	AD	OR: 3.41	1.53-7.59	<0.05	-	Colorretal, endometrial e ovário	-	HARKNESS <i>et al.</i> , 2015
MRE11A	AR	OR: 2.88	0.79-10.5	0.009	-	-	-	DAMIOLA <i>et al.</i> , 2014
MSH2	AD	RCV: 11.2%	1.4-21.0	0.014	-	Colorretal, endometrial e ovário	-	HARKNESS <i>et al.</i> , 2015
MSH6	-	SIR: 2.11	7.3-27.9	<0.05	-	Colorretal, endometrial e ovário	-	SLAVIN <i>et al.</i> , 2017
MUTYH	-	RR: 1.3	0.86–2.21	<0.05	c.37-2487T>G	Gastrointestinal	Risco associado ao CM do subtipo histológico lobular	OUT <i>et al.</i> , 2012
NBN	-	RR: 2.7	1.9-3.7	<0.05	c.657del5	-	-	TUNG <i>et al.</i> , 2016b

Gene	Forma de herança	Risco de CM	IC de 95%	Valor-p	Variantes associadas ao risco	Outros tipos de câncer	Observações	Referências
NF1	-	RR: 6.5	2.6–13.5	<0.05	-	Tumor da bainha de nervo periférico, cérebro e sistema nervoso central	Em mulheres na faixa etária dos 30-39 anos	SEMINOG; GOLDACRE, 2015
NQO2	AD	OR: 1.53	1.02–2.31	<0.05	rs2070999	-	O mesmo estudo relata outras variantes com efeito protetor para o câncer de mama	YU <i>et al.</i> , 2009
PALB2	AD	OR: 6.95	3.71-12.70	2.33x10E-8	-	Pâncreas	-	SLAVIN <i>et al.</i> , 2017
PHB	AD	OR: 1.09-1.45	1.10-1.89	<0.05	rs6917	-	-	TANG <i>et al.</i> , 2013
PIK3CA		Sem estimativa de risco	-	-	-	-	Mutações em <i>PIK3CA</i> predisõem à síndrome de Cowden- <i>like</i> , com risco de CM desconhecido.	ORLOFF <i>et al.</i> , 2013
PMS2	AR	SIR: 3.8	21.9-40.7	<0.05	-	Colorretal, endometrial e ovário	-	NIELSEN; VAN OVEREEM HANSEN; SØRENSEN, 2016
PPM1D	-	RR: 2.7	1.3–5.3	5.38x10E-3	-	-	-	RUARK <i>et al.</i> , 2013
PTEN	AD	RCV: 85.2%	71.4-99.1%	<0.05	-	Tireoide e endométrio	-	TAN <i>et al.</i> , 2012
RAD50	-	OR: 3.21	0.68-15.2	<0.05	-	-	-	DAMIOLA <i>et al.</i> , 2014
RAD51	AD	OR: 2.35	1.36- 4	4.7x10E-3	-	Ovário	Algumas variantes estão associadas ao risco em portadores de mutações em <i>BRCA2</i>	GAL <i>et al.</i> , 2006
RAD51B	-	RR: 1.37	1.09-1.48	0.003	rss999737	-	Risco para pacientes com CM de início precoce	SHI <i>et al.</i> , 2017

Gene	Forma de herança	Risco de CM	IC de 95%	Valor-p	Variante associadas ao risco	Outros tipos de câncer	Observações	Referências
RAD51C	-	OR: 3.44	1.51–7.80	5.32x10E–3	-	-	<i>RAD51C</i> possui forte associação ao CO mas também está mutado em famílias com CMO	MEINDL <i>et al.</i> , 2010
RAD51D	-	OR: 3.07	1.21-7.88	<0.05	-	Ovário	-	COUCH <i>et al.</i> , 2017
RAD54L	-	Sem estimativa de risco	-	-	-	-	-	-
RINT1	-	RR: 3.2	1.29–8.17	0.013	-	-	-	PARK <i>et al.</i> , 2014
SDHD	-	Sem estimativa de risco	-	-	-	Tireoide e endométrio	<i>SDHD</i> está associado à síndrome de Cowden, porém, não há estimativas para o risco de CM	NI <i>et al.</i> , 2017
STK11	AD	RCV: 32% aos 60 anos	15%-59%	<0.05	-	Cólon, pâncreas, Tumores de cordão sexual/estroma de ovário	-	LIM <i>et al.</i> , 2004
TERT	AD	OR: 1.48	-	1.9x10E-9	rs10069690	-	Risco calculado em pacientes com CM antes dos 50 anos	MEINDL <i>et al.</i> , 2010
TOX3	-	OR: 2.4	1.16–1.24	1x10E-35	rs3803662	-	-	EASTON <i>et al.</i> , 2007
TP53	AD	RR: 25%/ OR: 11	0.61-201	0.03	-	-	-	NIELSEN; VAN OVEREEM HANSEN; SØRENSEN, 2016/ THOMPSON <i>et al.</i> , 2016
UIMC1	-	OR: 2.92	1.2–5.1	0.01	p.Ala342Thr, p.Met353Thr e p.Tyr575Asp	-	-	AKBARI <i>et al.</i> , 2009

Gene	Forma de herança	Risco de CM	IC de 95%	Valor-p	Variantes associadas ao risco	Outros tipos de câncer	Observações	Referências
XRCC2	AR	OR: 1.33	1.12-1.57	0.001	rs3218408	-	-	LIN <i>et al.</i> , 2011
XRCC3	AD	OR: 1.1-1.3	1.1-1.6	0.015	-	Melanoma	-	KUSCHEL <i>et al.</i> , 2002

Os genes *ABRAXAS1*, *PIK3CA*, *RAD54L* e *SDHD* estão presentes em painéis multigênicos de câncer de mama, mas não possuem estimativa de risco. *AR*: autossômica recessiva; *AD*: autossômica dominante; *RR*: risco relativo; *OR*: odds ratio; *SIR*: standardized incidence ratio; *RCV*: risco cumulativo vital aos 80 anos na ausência de outras causas de morte; *RE*: receptor de estrogênio; *CM*: câncer de mama; *CMO*: câncer de mama e ovário.

* Quando a coluna “risco de câncer de mama” apresentar dois valores, as referências estarão na ordem de apresentação.

3.2. Principais vias de sinalização celular e redes de interação representadas nos genes associados ao câncer de mama familiar

A partir da lista de 45 genes associados ao CMF descritos na Tabela 8, foi realizada uma “*core analysis*” no *software* de bioinformática IPA, com o objetivo de avaliar a participação dos respectivos produtos gênicos nas vias de sinalização celular e redes de interação. A Figura 4 apresenta um sumário das vias canônicas, doenças hereditárias e funções celulares e moleculares mais representativas dentro do grupo de genes/moléculas avaliados. As colunas estão organizadas de acordo com o valor-*p*, calculado por meio do teste exato de Fisher, que representa a probabilidade da associação ou sobreposição entre um conjunto de moléculas em um determinado contexto biológico/via se deva ao acaso.

As vias canônicas são diagramas construídos e revisados com base vias metabólicas e de sinalização celular bem estabelecidas, extraídas a partir de periódicos científicos, artigos de revisão, livros textos ou base de dados (KEGG e LIGAND) e inseridas na base de dados da Qiagen: *Ingenuity Knowledge Base* (IKB). Todas as interações são avaliadas no contexto celular para favorecer a validade biológica dos achados descritos. Ao inserir a lista de genes associados ao CMF, a *core analysis* resultou em vias canônicas que representam as rotas biológicas conhecidas mais significativamente afetadas pelos genes 45 genes avaliados.

Ao todo, foram descritas 179 vias de sinalização metabólicas e de sinalização celular relacionadas aos genes avaliados, todas com significância estatística (valor-*p* <0.05). As cinco principais vias canônicas representadas foram “participação de BRCA1 na resposta ao dano no DNA (valor-*p*: 8.80E-35); “sinalização no câncer de mama hereditário” (valor-*p*: 9.05E-32); “reparo por recombinação homóloga” (valor-*p*: 6.93E-16); “sinalização no câncer de ovário” (valor-*p*: 1.71E-14) e “sinalização de ATM” (valor-*p*: 9.23E-13), todas com associação ao CMF descritas na literatura (NIELSEN; VAN OVEREEM HANSEN; SØRENSEN, 2016; TAMIMI *et al.*, 2012). A interação dos genes/moléculas da lista de dados dentro das respectivas vias de sinalização celular está demonstrada nas Figuras 5 a 9.

Adicionalmente, foi realizada uma análise de interação para demonstrar as inúmeras redes de conexões realizadas entre os genes/moléculas da lista de dados e suas atuações em nível molecular. Cada conexão representa uma relação

conhecida entre moléculas descritas no IKB. Um número elevado de conexões em uma rede de interação representa uma função biológica relevante dentro do conjunto de dados fornecidos.

Figura 4. Sumário das principais vias canônicas (azul), doenças hereditárias (vermelho) e funções celulares e moleculares (verde) representadas na lista de 45 genes associados ao CMF.

As redes de interação são geradas por um algoritmo baseado nas interações descritas entre as moléculas do IKB. A partir do banco de dados, são selecionadas moléculas focais, aquelas com evidências científicas de interação com um grupo específico de moléculas, para estruturar as possíveis interações. Posteriormente, são adicionadas moléculas relacionadas para conectar duas ou mais redes de interação menores, formando uma rede única abrangente.

Cada rede de interação recebe uma pontuação baseada no Teste exato de Fisher, considerando os seguintes critérios: número de moléculas focais na rede de interação, tamanho da rede de interação, número total de moléculas focais analisadas e o número total de moléculas do IKB com potencial para serem incluídas na rede de interação. Quanto maior a pontuação de determinada rede de interação, menor a probabilidade de encontrar o número observado das moléculas da listadas em uma rede ao acaso (KRÄMER *et al.*, 2014).

A partir da análise de interação dos 45 genes, foram obtidas duas redes de interação principais, com pontuações de 70 e 20, representas nas Figuras 10 e 11, respectivamente. Para refinar a relevância das conexões, foram avaliadas 35 moléculas a cada análise e consideradas somente interações diretas. As moléculas com maior convergência de interações estão destacadas com símbolos maiores e identificação em negrito.

Devido à relevância funcional das conexões presentes nas redes de interação, todas as moléculas (em vermelho) presentes na Figura 10 e as moléculas ESR1, CDH1 e CASP8 presentes na Figura 11 foram utilizadas como um dos critérios de seleção para avaliar os genes indicados para compor um painel multigênico atualizado para a susceptibilidade ao câncer de mama.

Figura 5. Representação esquemática da participação de BRCA1 na via de resposta ao dano no DNA. As moléculas destacadas em roxo fazem parte da lista de dados com 45 genes associados ao CMF. O dano ao DNA ativa a cascata de sinalização para controle do ciclo e reparo do DNA, com destaque para BRCA1, com papel central no reconhecimento ao dano e reparo do DNA. Complex A: complexo BRCA1-A; Complex B: complexo BASC; Complex C: complexo MRN. Fonte: Ingenuity Knowledge Base - Qiagen©

Figura 7. Representação esquemática da via de reparo do DNA por recombinação homóloga. As moléculas destacadas em roxo fazem parte da lista de dados com 45 genes associados ao CMF. A quebra da dupla-fita de DNA devido a fontes exógenas e endógenas é reconhecida por NBS (ou proteína NBN), responsável pela ativação da cascata de sinalização com participação de diversas moléculas associadas ao CMF e do complexo MRN, culminando no reparo da quebra de dupla-fita de DNA por recombinação homóloga. Fonte: Ingenuity Knowledge Base - Qiagen©

Figura 8. Representação esquemática da via de sinalização do câncer de ovário. Mutações nos genes BRCA1, BRCA2, MLH1, MSH2, PIK3CA, PTEN e TP53 desempenham papel significativo na patogênese do câncer de ovário ao promover instabilidade genômica e tumorigênese. Mutações nos genes BRCA1/2 estão associadas a 90% dos casos de câncer de ovário hereditário, porém, mutações nos respectivos genes estão associadas a somente 20% dos casos de câncer de mama familiar. Fonte: Ingenuity Knowledge Base- Qiagen©

Figura 9. Representação esquemática da via de sinalização de ATM. ATM é um regulador chave de diversas cascatas de sinalização ativadas em resposta a quebras na fita de DNA por agentes genotóxico. Essas respostas envolvem a ativação de CHEK1 e CHEK2, reparo de DNA e apoptose.

Fonte: Ingenuity Knowledge Base - Qiagen©

Fonte: Ingenuity Knowledge Base - Qiagen®

Figura 10. Rede de interação entre moléculas associadas ao CMF e outros produtos. As figuras em vermelho (30/35) representam moléculas com associação descrita com o câncer de mama familiar, com destaque para os focos de interação em BARD1, TP53 e BRCA1. As figuras em verde (5/35) representam moléculas sem associação descrita com a patologia, mas que interagem com outras moléculas da rede. Fonte: Ingenuity Knowledge Base - Qiagen©

Com o objetivo avaliar a composição dos painéis multigênicos clínicos oferecidos por laboratórios de genética molecular no Brasil, EUA e Europa, foi realizado um levantamento dos genes pesquisados e a sobreposição entre os painéis. Para isso, os painéis para câncer de mama dos seguintes laboratórios foram avaliados: Fulgent Genetics, LabCorp, Invitae, CentoGene, Myogene, Reference Laboratory, Fleury, Igenomix, CEGH-CEL.

Figura 11. Rede de interação entre moléculas associadas ao CMF e outros produtos. Os símbolos em vermelho (12/35) representam moléculas com associação descrita com o câncer de mama familiar, com destaque para ESR1, um gene descrito com baixa penetrância, mas desempenha papel chave na rede de interação. As setas em azul destacam sua ligação com as moléculas PTEN, CDH1, produtos de genes com alta penetrância para o CMF, e CASP8, com baixa penetrância. As figuras em verde (23/35) representam moléculas sem associação descrita com a patologia, mas que interagem com outras moléculas da rede. Fonte: Ingenuity Knowledge Base - Qiagen©

Os genes pesquisados nos painéis descritos foram somados para integrar uma lista generalizada para cada localidade (Brasil, EUA e Europa) e, posteriormente, as listas foram inseridas em um gráfico de Venn para avaliar a sobreposição entre os genes pesquisados nas três localidades. Tal abordagem permite estimar, mesmo que para um número restrito de laboratórios, uma “lista consenso” (Figura 12) contendo o grupo de genes pesquisado com maior frequência no Brasil, EUA e Europa. Notavelmente, a “lista consenso” apresenta majoritariamente genes com alta e média penetrância (ver Tabela 8), o que possibilita a adoção de estratégias de

manejo clínico para os portadores de variantes patogênicas nesses genes (DALY *et al.*, 2017; TUNG *et al.*, 2016b).

Tabela 9. Painéis multigênicos para predisposição hereditária ao câncer de mama.

País	Laboratório	Teste	Genes analisados
EUA	Fulgent Genetics	Breast Cancer Comprehensive Panel	<i>ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, MLH1, MRE11, MSH2, NBN, NF1, PALB2, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53 e XRCC2</i>
	LabCorp	VistaSeq Breast Cancer Panel	<i>ABRAXAS1, ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, MRE11A, MUTYH, NF1, NBN, PALB, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, STK11 e TP53</i>
	Invitae*	Invitae Breast Cancer Panel	<i>ABRAXAS1, ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHECK2, FANCC, MRE11, MUTYH, NBN, NF1, PALB2, PIK3CA, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, RINT1, SDHD, STK11, TP53 e XRCC2.</i>
Alemanha	CentoGene	CentoBreast	<i>ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, NBN, PALB2, PTEN, RAD51C, STK11 e TP53</i>
Inglaterra	Myogene	Breast Cancer Test	<i>ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, NBN, NF1, PALB2, PPM1D, PTEN, RAD51C, STK11 e TP53.</i>
Espanha	Reference Laboratory	Breast Cancer Test	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHECK2, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, STK11 e TP53.</i>
Brasil	Fleury	Painel de Câncer de Mama e Ovário Hereditário	<i>ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, NBN, PALB2, PMS1, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, STK11 e TP53.</i>
	Igenomix	Painel Multigênico 21 (Câncer de Mama e ovário)	<i>ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51, STK11 e TP53.</i>
	CEGH-CEL**	Câncer - NGS	<i>ATM, BLM, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, FANCC, FANCI, FANCM, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, STK11 e TP53.</i>

*O painel Invitae "Breast Cancer Panel" possui duas configurações diferentes: a reduzida chamada "Primary panel" contém 12 genes, e a estendida, utilizada nesse trabalho, contém 25 genes pesquisados. ** O painel "Câncer - NGS" do laboratório CEGH-CEL inclui pesquisa por mutações em 94 genes. Para fins de comparação, somente foram considerados na Tabela os genes relacionados à susceptibilidade ao câncer de mama.

Figura 12. Sobreposição entre os genes pesquisados em 9 painéis multigênicos para o câncer de mama. A “lista consenso” se encontra no centro do gráfico, totalizando 16 genes pesquisados com maior frequência em todos os países avaliados. *Variantes patogênicas em linhagem germinativa nos genes *ABRAXAS1*, *PIK3CA*, *RAD54L* e *SDHD* estão presentes em famílias com recorrência de casos de câncer de mama e/ou câncer de ovário, porém, até o momento não há estimativas de risco para o câncer de mama.

Com base nos resultados descritos anteriormente, foram utilizados três critérios de seleção para identificar quais genes, a partir da lista de 45 genes descritos na Tabela 8, são indicados para compor um painel atualizado para a susceptibilidade ao câncer de mama, são eles: sobreposição dos genes pesquisados em painéis multigênicos (lista consenso); genes participantes das redes de interação obtidas no *software* IPA e penetrância estimada para cada gene. A Figura 13 resume a sequência de aplicação dos critérios de seleção até a lista final de genes (lista 4).

Como produto final da aplicação dos critérios de seleção, a lista 4 apresenta os genes indicados para compor um painel multigênico atualizado de

susceptibilidade ao câncer de mama. Excluir os genes de baixa penetrância da lista 3 objetivou selecionar genes com maior relevância clínica e, em caso de detecção de variante patogênica, o resultado pode influenciar de maneira direta no manejo clínico ou cirúrgico do paciente ou dos familiares com predisposição aumentada de câncer de mama.

Figura 13. Sequência de aplicação dos critérios de seleção e listas de genes de acordo com o critério aplicado. Os números entre parênteses representam o número total de genes presentes na lista.

Conforme referenciado na tabela 8, os genes da lista 4 apresentam os respectivos riscos associados ao câncer de mama: *BLM* (OR: 3.8), *HMMR* (OR: 2.73), *MRE11* (OR: 2.88), *MSH6* (SIR: 3.8), *PMS2* (OR: 3.8), *RAD50* (OR: 2.2), *RAD51* (OR: 2.35), *RINT1* (RR: 3.2) e *UIMC1* (OR: 2.92).

3.3. Frequência de variantes deletérias em genes associados ao câncer de mama familiar na população brasileira e internacional

A fim de comparar a frequência de variantes potencialmente deletérias nos genes da lista consenso (Fig. 12) e da lista 4 (Fig. 13), presentes na população brasileira e internacional, foi realizada uma análise nos bancos de dados ABraOM e ExAC. As variantes foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios em ambos os bancos de dados: variantes *nonsense*, *frameshift* ou em sítios de *splicing* com frequência menor do que 0.005. Para o banco de dados ABraOM, foram desconsideradas variantes anotadas que não passaram pelo filtro GATK (*GATK PASS filter*); e para o banco de dados ExAC, foram desconsideradas variantes com anotação dúbia (flag LC LoF).

O banco de dados ABraOM é um repositório de variantes exônicas de brasileiros, com o objetivo de divulgar à comunidade científica a variabilidade genética encontrada no Brasil. A coorte atual conta com os dados de sequenciamento de exomas de 609 idosos de uma amostra da cidade de São Paulo. O *Exome Aggregation Consortium* (ExAC) reúne os dados de sequenciamento de exoma de 60.706 indivíduos não aparentados obtidos por meio da junção de dados de vários estudos populacionais do continente Africano, Americano, Europeu e Asiático.

A Tabela 10 apresenta a frequência de variantes deletérias para cada um dos 27 genes presentes na lista consenso e lista 4 nos bancos de dados ABraOM e ExAC. As frequências encontradas em ambos os bancos de dados são, em sua maioria, de ordem de grandezas semelhantes. Todas as variantes deletérias são raras nas populações pesquisadas, ou seja, encontram-se em frequência menor do que 0.01 e, no banco de dados ABraOM, 25.9% (7/27) dos genes pesquisados não possuem variantes que satisfaçam os critérios definidos para a presente análise (frequência = 0). Tais frequências reduzidas em ambos os bancos de dados são um indicativo da patogenicidade e consequente letalidade de mutações em genes associados a diversas formas de câncer.

Vale destacar as frequências elevadas de variantes deletérias nos genes *BRCA2* e *TP53* dentro da população brasileira, $9.03E-03$ e $7.39E-03$,

respectivamente. Ambos os genes apresentam alta penetrância e participam da oncogênese em diversas formas de câncer, particularmente o gene *TP53* na síndrome de Li-Fraumeni.

Tabela 10. Frequência de variantes *nonsense*, *frameshift* e em sítio de *splicing* nos bancos de dados ABraOm e ExAC para os genes da lista consenso e lista

Genes lista consenso	Freq. de variantes ABraOM	Freq. de variantes ExAC	Genes lista 4	Freq. de variantes - ABraOM	Freq. de variantes ExAC
<i>ATM</i>	2.46E-03	1.40E-03	<i>BLM</i>	8.21E-04	8.95E-04
<i>BARD1</i>	8.21E-04	3.82E-04	<i>HMMR</i>	8.21E-04	3.30E-03
<i>BRCA1</i>	1.64E-03	1.21E-03	<i>MRE11A</i>	8.21E-04	3.06E-04
<i>BRCA2</i>	9.03E-03	1.75E-03	<i>MSH6</i>	2.46E-03	2.16E-03
<i>BRIP1</i>	0	8.98E-04	<i>PMS2</i>	6.06E-03	5.76E-03
<i>CDH1</i>	0	4.97E-05	<i>RAD50</i>	1.64E-03	1.31E-03
<i>CHEK2</i>	3.28E-03	2.77E-03	<i>RAD51</i>	0	8.24E-06
<i>MLH1</i>	0	2.85E-03	<i>RINT1</i>	8.21E-04	4.71E-04
<i>MSH2</i>	8.21E-04	1.31E-04	<i>UIMC1</i>	0	1.98E-04
<i>MUTYH</i>	3.28E-03	1.73E-03			
<i>NBN</i>	1.64E-03	6.80E-04			
<i>NF1</i>	3.48E-03	3.94E-04			
<i>PALB2</i>	0	6.55E-04			
<i>PTEN</i>	0	1.65E-05			
<i>RAD51C</i>	8.21E-04	5.37E-04			
<i>RAD51D</i>	8.21E-04	3.89E-04			
<i>STK11</i>	1.64E-03	8.17E-05			
<i>TP53</i>	7.39E-03	8.24E-06			

3.4. Variantes gênicas presentes em pacientes do CEGH-CEL que realizaram o painel multigênico para susceptibilidade hereditária ao câncer de mama

Todos os 79 pacientes são do sexo feminino e foram diagnosticados com câncer de mama ou síndrome associada à predisposição ao câncer de mama (3/79) (síndromes de Lynch e Li-Fraumeni). Os pacientes foram encaminhados ao

laboratório do CEGH-CEL para realização do painel multigênico para predisposição hereditária ao câncer (MiSeq – Illumina), contendo ao todo 89 genes associados à formas de câncer hereditário, porém, somente 21 genes associados ao câncer de mama foram selecionados e a coorte foi reanalisada para variantes patogênicas, provavelmente patogênicas e ou de significado incerto (VUS). Os seguintes genes foram completamente sequenciados: *ATM*, *AXIN2*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *MLH1*, *MRE11A*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RAD51*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11*, *TP53*. Nem todos os pacientes realizaram o teste de MLPA para os genes descritos.

Os pacientes apresentavam idade entre 26 e 73 anos no momento do teste (média= 49,5; desvio padrão= 12,1), e 78,4% (62/79) declararam ter um ou mais parentes de primeiro grau diagnosticados com câncer de mama ou outro câncer associado (e.g., câncer de ovário). As amostras foram desidentificadas, sendo atribuído um número sequencial de identificação de acordo com a ordem de realização do teste.

Os dados do painel multigênico foram filtrados para variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas utilizando a anotação do ClinVar disponível, bem como para variantes *frameshift* raras e *nonsense* (frequência menor que 0,5%) não disponíveis no ClinVar ou bancos de dados de doenças (LOF).

Foram descritas variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas em 24.05% dos pacientes (19/79), 63.15% foram detectadas nos genes *BRCA1/2* (Figura 14). Do total de pacientes portadores de mutações classificadas como patogênicas, 18 declararam possuir histórico familiar de câncer de mama ou câncer relacionado (Tabela 11), evidenciando a forte associação entre o histórico familiar e a presença de variantes patogênicas responsáveis pela oncogênese do CMF. Do total de pacientes testados, 17.72% apresentaram variantes classificadas como VUS (14/79) (Figura 14). A parcela dos pacientes detectados com variantes de significado incerto também se apresentou enriquecida com histórico familiar positivo para câncer de mama (Tabela 11).

As Tabelas 12 e 13 listam as variantes patogênicas/provavelmente patogênicas e VUS detectadas na coorte. Dentre as 18 variantes patogênicas, 6 foram descritas como mutações em sítio de *splicing*, 4 grandes deleções (mais de um éxon), 4 *frameshift*, 2 *nonsense* e 3 SNV não-sinônima. As variantes descritas

como VUS apresentaram prevalência de mutações SNV não-sinônima, 11 de um total de 14; foram descritas outras 2 em sítios de *splicing* e uma *frameshift*.

Tabela 11. Estratificação da coorte do CEGH-CEL de acordo com o histórico familiar e a presença de variantes patogênicas, benignas ou VUS.

	Histórico familiar		Total
	Sim	Não	
Variante não detectada	33	13	46
Benigna/ provavelmente benigna	1	1	2
VUS	13	1	14
Variante patogênica/ provavelmente patogênica	18	1	19

A frequência das variantes descritas nos pacientes foi investigada no Arquivo Brasileiro Online de Mutações (ABraOM) (NASLAVSKY *et al.*, 2017). O banco de dados ABraOM, mesmo com uma coorte de somente 609 indivíduos, representa uma valiosa fonte de dados ao proporcionar um panorama da variabilidade genética presente na população brasileira. Das 14 variantes patogênicas/provavelmente patogênicas reportadas nos pacientes do CEGH-CEL, somente uma (rs397507404) foi reportada no banco de dados ABraOM, com frequência alélica de 0.000821. As VUS rs786202232 e rs200310662 também são encontradas com a mesma frequência alélica no ABraOM.

Figura 14. Frequência de VUS e variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas reportadas nos 21 genes pesquisados.

Tabela 12. Descrição das variantes patogênicas e provavelmente patogênicas identificadas na coorte do CEGH-CEL.

ID	Clínica	Histórico familiar	Gene	Mutação	Tipo de mutação	cDNA	rs	Proteína	Freq. alélica ABraOM
P-38	CM	sim	ATM	Patogênica	Grande deleção	del ex 34-38	-	p.?	0
P-67	CM	sim	ATM	Patogênica	Grande deleção	del ex 34-38	-	p.?	0
P-16	CM/CT	sim	BRCA1	Patogênica/provavelmente patogênica	Sítio de <i>splicing</i>	c.5074+2T>C	rs80358089	p.?	0
P-19	CM	sim	BRCA1	Patogênica	<i>Nonsense</i>	c.1687C>T	rs80356898	p.Gln563*	0
P-60	CM bilateral/CO/CF	sim	BRCA1	Patogênica	<i>Frameshift</i> (deleção)	c.4391del	rs80357916	p.Pro1464Leufs*2	0
P-34	CM	sim	BRCA1	Patogênica	Sítio de <i>splicing</i>	c.441+2A>T	rs397509173	p.?	0
P-37	CM triplo negativo	não	BRCA1	Patogênica	<i>Nonsense</i>	c.1612C>T	rs80356893	p.Gln538*	0
P-40	CM	sim	BRCA1	Patogênica	<i>Frameshift</i> (inserção)	c.5266dupC	rs397507246	p.Gln1756Profs*74	0
P-44	CM	sim	BRCA1	Patogênica/provavelmente patogênica	Sítio de <i>splicing</i>	c.5074+2T>C	rs80358089	p.?	0
P-46	CM	sim	BRCA1	Patogênica/provavelmente patogênica	Sítio de <i>splicing</i>	c.5074+2T>C	rs80358089	p.?	0
P-59	CM bilateral triplo negativo	sim	BRCA1	Patogênica/provavelmente patogênica	Sítio de <i>splicing</i>	c.5074+2T>C	rs80358089	p.?	0
P-48	CM	sim	BRCA2	Patogênica/provavelmente patogênica	Sítio de <i>splicing</i>	c.8488-1G>A	rs397507404	p.?	0.000821
P-75	CM	sim	BRCA2	Patogênica	<i>Frameshift</i> (deleção)	c.658_659delGT	rs80359604	p.Val220Ilefs*4	0
P-5	CM	sim	BRCA2	Patogênica	<i>Frameshift</i> (deleção)	c.6405_6409del	rs80359584	p.Asn2135Lysfs*3	0

ID	Clínica	Histórico familiar	Gene	Mutação	Tipo de mutação	cDNA	rs	Proteína	Freq. alélica ABraOM
P-71	Cisto adenomatoso (M/O)/ PC	sim	CHEK2	Provavelmente patogênica	SNV não-sinônima	c.470T>C	rs17879961	p.Ile157Thr	0
P-77	Síndrome de Lynch	sim	MLH1	Patogênica	Grande deleção	del ex 17-19	-	p.?	0
P-54	CM	sim	MRE11A	Patogênica	SNV não-sinônima	c.350A>G	rs137852760	p.Asn117Ser	0
P-79	Síndrome de Lynch	sim	MSH2	Patogênica	Grande deleção	del ex 14	-	p.?	0
P-76	CM	sim	TP53	Patogênica	SNV não-sinônima	c.1010G>A	rs121912664	p.Arg337His	0

A coluna com a frequência alélica do banco de dados ABraOM compara a frequência dos alelos descritos na coorte do CEGH dentro da coorte de 609 pacientes saudáveis do banco de dados brasileiro. CM: câncer de mama; CO: câncer de ovário; CE: câncer de endométrio; CC: câncer de cólon; CT: câncer de tireoide; CF: câncer de fígado; PC: pólipos Colorretal; CCR: câncer colorretal.

Tabela 13. Descrição das VUS identificadas na coorte do CEGH-CEL.

ID	Clínica	Histórico familiar	Gene	Mutação	Tipo de mutação	cDNA	rs	Proteína	Freq. alélica ABraOM
P-12	CM	sim	ATM	VUS	SNV não-sinônima	c.4388T>G	rs138327406	p.Phe1463Cys	0
P-26	CM	sim	ATM	VUS	SNV não-sinônima	c.8110T>C	-	p.Cys2704Arg	0
P-55	CM	sim	ATM	VUS	SNV não-sinônima	c.6209A>G		p.Asn2070Ser	0
P-71	Cisto adenomatoso (M/O)/ PC	sim	ATM	VUS	SNV não-sinônima	c.1703G>T	rs200381392	p.Arg568Ile	0
P-12	CM	sim	ATM	VUS	SNV não-sinônima	c.4388T>G	rs138327406	p.Phe1463Cys	0
P-53	CM	sim	AXIN2	VUS	SNV não-sinônima	c.1712G>A	-	p.Gly571Asp	0
P-68	CM	sim	BARD1	VUS	SNV não-sinônima	c.1940A>G	rs786202232	p.Gln647Arg	0.000821
P-74	CM	sim	BARD1	VUS	SNV não-sinônima	c.1498G>A	rs779468443	p. Asp500Asn	0
P-6	CM/CO	não	BRCA2	VUS	SNV não-sinônima	c.2755G>A	rs431825298	p.(Glu919Lys)	0
P-64	CM	sim	BRIP1	VUS	SNV não-sinônima	c.1941G>C	rs786202760	p.Trp647Cys	0
P-7	CM/CO	sim	BRIP1	VUS	<i>Frameshift</i>	c.1510del	-	p.Ile504Serfs* 22	0
P-1	CM/CO	sim	CDH1	VUS	SNV não-sinônima	c.670C>T	rs200310662	p.Arg224Cys	0.000821
P-22	CM	sim	CDH1	VUS	Sítio de <i>splicing</i>	c.164-32A>G	-	p.?	0
P-36	CM triplo negativo	não	RAD51C	VUS	Sítio de <i>splicing</i>	c.571+4A>G	rs587780257	p.?	0

A coluna frequência alélica do banco de dados ABraOM compara a frequência dos alelos descritos na coorte do CEGH dentro da coorte de 609 pacientes saudáveis do banco de dados brasileiro. CM: câncer de mama; CO: câncer de ovário; CE: câncer de endométrio; CC: câncer de cólon; CT: câncer de tireóide; CF: câncer de fígado; PC: pólipos Colorretal; CCR: câncer colorretal.

Capítulo 4 - Discussão

4.1. Determinação do risco hereditário de câncer de mama e o impacto no aconselhamento genético

O aconselhamento genético é uma etapa primordial do processo de avaliação do risco hereditário de câncer de mama, e contempla a educação do consulente sobre os diversos aspectos da etiologia genética do câncer, o risco de desenvolver a patologia e a probabilidade de ser portador de uma variante patogênica associada à susceptibilidade genética, assim como elucidar as limitações e riscos inerentes aos testes genéticos (RILEY *et al.*, 2012).

O fator de risco mais relevante para o câncer de mama depois do gênero e envelhecimento é a história familiar da doença (LALLOO; EVANS, 2012). A apresentação de diversos casos em uma família e no paciente avaliado é utilizada como critério diagnóstico para o CMF, sendo a ocorrência ao longo das gerações, frequentemente em idade pré-menopausa, um importante indicativo da presença e segregação de uma variante genética promovendo a oncogênese (NIELSEN; VAN OVEREEM HANSEN; SØRENSEN, 2016).

Diversas ferramentas computacionais estão disponíveis para calcular o risco individualizado de desenvolver câncer de mama e até mesmo de ser portador de uma variante patogênica associada à patologia (principalmente para *BRCA1/2*) de acordo com o histórico pessoal/familiar do probando (ANTONIOU *et al.*, 2008). No contexto atual de popularização e barateamento das tecnologias de NGS, os testes genéticos têm sido alvo de constantes debates acerca dos benefícios e limitações para o paciente e seus familiares, porém, painéis multigênicos para a susceptibilidade ao câncer de mama têm sido cada vez mais consumidos (GUO *et al.*, 2017; RICH *et al.*, 2015; STANISLAW; XUE; WILCOX, 2016).

Como descrito nas diretrizes do ASCO, um teste genético deve ser interpretado adequadamente para que os resultados auxiliem no diagnóstico ou influenciem o manejo clínico, podendo resultar em diversos benefícios para o probando e seus familiares: 1) possíveis medidas de redução de risco; 2) esclarecimento da etiologia molecular; 3) identificação de familiares com risco hereditário de câncer; 4) particularizar as opções de vigilância e a idade de início dos

exames de triagem para o câncer de mama; 5) orientações individualizadas de tratamento (e.g., inibidores de PARP em portadores de mutações em *BRCA1*); 6) opções reprodutivas como diagnóstico genético pré-implantacional (PGD) ou doação de gameta (APOSTOLOU; FOSTIRA, 2013).

Além dos evidentes benefícios oriundos da realização de painéis multigênicos em probandos com predisposição hereditária ao câncer de mama, existem riscos envolvidos nos possíveis resultados, como o acarretamento de problemas emocionais, financeiros ou sociais. Em casos de resultado positivo, o probando pode sofrer discriminação genética (por planos de saúde ou no meio profissional) ou estigmatização por apresentar risco aumentado de desenvolver câncer. No âmbito familiar, o teste pode gerar tensões ao revelar informações sobre outros membros da família e não somente da pessoa testada (ROLNICK *et al.*, 2011).

O impacto emocional antecipado é descrito como uma das principais barreiras para a realização de testes genéticos, além da ansiedade ou medo de um possível resultado positivo (GEER *et al.*, 2001). Para diminuir os impactos negativos, devem ser abordadas no AG pré-teste as limitações inerentes às metodologias utilizadas, tais como: a presença de variante patogênica pode auxiliar na estimativa do risco de câncer, mas não pode ser considerada como afirmação futura de seu desenvolvimento em probandos assintomáticos ou de recorrência em pacientes já diagnosticados com câncer; o resultado negativo em probando não afetado com variante familiar conhecida não exclui o risco de um câncer futuro; e o resultado não conclusivo (Tabela 6) não exclui a possibilidade de o probando ser portador de uma variante patogênica, pois o resultado pode decorrer de limitações da metodologia utilizada, qualidade do teste ou até mesmo fenocópia (RILEY *et al.*, 2012).

Determinadas intervenções clínicas podem ser opções válidas para redução de risco em portadores de variantes patogênicas associadas ao CMF. Tais medidas devem ser ajustadas de acordo com a penetrância estimada da variante encontrada, idade e planejamento familiar; visando promover o diagnóstico precoce através do rastreamento e redução do risco de ocorrência em portadores assintomático. As opções de manejo clínico disponíveis incluem o rastreamento por meio de mamografia e/ou ressonância magnética, exame clínico da mama, mastectomia preventiva e fármacos redutores de risco (NIELSEN; VAN OVEREEM HANSEN; SØRENSEN, 2016).

As diretrizes para indivíduos com risco hereditário de câncer de mama

possuem consenso somente no manejo clínico de portadores de mutações de alta penetrância, como *BRCA1/2*, *TP53* e *PALB2*. (DALY *et al.*, 2017; ROBSON *et al.*, 2010). Como descrito anteriormente, mulheres portadoras de variante patogênica de alta penetrância nos genes *BRCA1/2* são orientadas a participar de ações de rastreamento de câncer de mama e ginecológico, além de receber informações sobre os benefícios de cirurgias profiláticas (salpingo-ooforectomia e mastectomia bilateral).

A utilização preventiva de fármacos redutores de risco tem sido indicada nesses casos, sendo o tamoxifeno a principal opção, com benefícios comprovados em mulheres pré-menopausa ao reduzir a incidência geral do câncer de mama em 50% (CUZICK *et al.*, 2003). O efeito redutor de risco do tamoxifeno é particularmente expressivo em portadores de mutações patogênicas em *BRCA2*, mas é limitado em portadores de mutações no gene *BRCA1* (KING *et al.*, 2001).

Apesar da consolidação na literatura de diversas opções de manejo clínico para variantes de alta penetrância, as variantes de penetrância moderada ainda são motivo de discussão quanto à validade clínica, devido principalmente à incerteza sobre como, ou até mesmo se, a identificação de tais mutações pode ser utilizada para alterar a conduta clínica em seus portadores. Independentemente da existência de diretrizes clínicas para os portadores dessas variantes, milhares de pacientes estão realizando painéis genéticos. Em estudos recentes, investigadores identificaram mutações de penetrância moderada em 1,1-3,4% dos pacientes com histórico sugestivo de predisposição hereditária ao câncer de mama (COUCH *et al.*, 2015a; LIN *et al.*, 2016; SLAVIN *et al.*, 2017; TUNG *et al.*, 2016a).

Tung e colaboradores (2016b) propõem uma estrutura de aconselhamento genético para portadores de variantes patogênicas de penetrância moderada ao câncer de mama com base no risco estimado em cinco anos e risco cumulativo vital para cada mutação. Porém, para a maioria dos genes de penetrância moderada, ainda não existem estudos populacionais robustos caracterizando o risco estratificado por idade, o que dificulta o manejo clínico do paciente para ações de rastreio em idade precoce (EASTON *et al.*, 2015). Outro fator limitante é o risco aumentado em portadores da mesma variante patogênica com histórico familiar se comparado àqueles sem nenhum caso relatado na família (ADANK *et al.*, 2013).

O *American College of Radiology Appropriateness Criteria* recomenda a realização anual de mamografia e ressonância magnética da mama com início aos

25-30 anos (ou 10 anos antes da idade de diagnóstico em parente próximo afetado com idade mais precoce) em pacientes que apresentem risco cumulativo vital $\geq 20\%$, definido com base em modelos de predição largamente dependente da história familiar, ou com parente de primeiro grau diagnosticado com câncer de mama pré-menopausa (MAINIERO *et al.*, 2013).

O NCCN também recomenda iniciar o rastreamento anual por meio de ressonância magnética 10 anos antes da idade de diagnóstico em parente próximo afetado com idade mais precoce, para mulheres com risco cumulativo vital $\geq 20\%$, porém, não antes dos 25 anos (DALY *et al.*, 2017).

Ambas as diretrizes apresentadas determinam o risco cumulativo vital $\geq 20\%$ como premissa para iniciar o rastreamento do câncer de mama em idade inicial precoce. Devido à ausência de dados ou diretrizes para o manejo clínico de portadores de variantes de penetrância moderada, o limite de 20% pode ser empregado para justificar as mesmas indicações de manejo clínico em portadores de variantes que promovam um risco cumulativo vital de grandeza equivalente, como é o caso de diversas mutações em genes de penetrância moderada associados ao CMF (e g., NBN c.657del5) (TUNG *et al.*, 2016b).

Como demonstrado no tópico 3.1 (Compilação e tabulação dos dados da literatura), um amplo espectro de genes possui associação estatística com o CMF. O risco de câncer de mama para os portadores varia de acordo com a penetrância do gene ou variante patogênica em questão. Do total de 45 genes com associação estatística ao CMF, somente oito apresentam alta penetrância ($OR > 5$): *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *STK11* e *TP53*. Na presença de variantes patogênicas, os referidos genes promovem síndromes caracterizadas pela ocorrência de múltiplos cânceres primários em diversas localidades, conforme descrito no tópico 1.4.2. Devido à clara associação com o CMF, todos os genes de alta penetrância são frequentemente pesquisados em painéis multigênicos para essa patologia (Figura 12).

Outro fator a ser considerado no aconselhamento genético é a variação do risco de câncer de mama de acordo de variante patogênica presente. Mesmo em pacientes portadores da mesma variante, o risco de câncer pode ser modulado pela idade atual, gênero e pelo histórico pessoal e familiar do paciente. BYRNES, SOUTHEY e HOPPER (2008), por meio de um estudo caso-controle, demonstraram que variantes patogênicas em genes de baixa/moderada penetrância (*ATM*, *BRIP1*,

e *CHEK2*), com interação descrita junto aos genes *BRCA1/2*, podem apresentar alta penetrância em mulheres com forte histórico familiar ou pessoal de câncer de mama, particularmente em casos de início precoce, evidenciando a relevância clínica de pesquisar outros genes além de *BRCA1/2*.

Por fim, um dilema presente em qualquer teste de sequenciamento gênico e, por consequência, para o aconselhamento genético é apresentado pela detecção de uma VUS. Nesses casos, recomenda-se que outros membros familiares sejam testados para melhor caracterizar este achado. Caso isso não seja possível, o aconselhamento genético deve ser baseado no histórico pessoal e familiar do consultante (MAINIERO *et al.*, 2013; BEVERS *et al.*, 2018). Adicionalmente, os pacientes podem ser encaminhados para estudos que visam definir a relevância clínica da variante encontrada, são exemplos deles: ClinVar, ClinGen e PROMPT.

Com o acúmulo exponencial de informações acerca da genética do câncer de mama, é importante pontuar que os dados e diretrizes apresentadas demonstram o conhecimento clínico e científico atual, estando sujeitos a alterações decorrentes de atualizações nas técnicas de biologia molecular, de rastreio e tratamentos disponíveis. Revisões da literatura como a realizada no presente trabalho contribuem para facilitar o acesso a informações atualizadas e relevantes para o aconselhamento genético por profissionais da saúde envolvidos no processo.

4.2. Análise das vias de sinalização celular e redes de interação representadas entre os genes associados ao câncer de mama familiar

A análise realizada no programa IPA possibilitou a obtenção escalonada das vias de sinalização celular e redes de interação mais representativas dentro da lista de 45 genes associados ao CMF. As figuras 5 a 9 descrevem a participação dos genes/moléculas nas cinco vias de sinalização com maior associação estatística ao CMF e, quando alteradas, promovem a oncogênese no tecido mamário e em diversas outras localidades, são elas: participação de BRCA1 na resposta ao dano no DNA; sinalização no câncer de mama hereditário; reparo por recombinação homóloga; sinalização no câncer de ovário e sinalização de ATM.

Reconhecidamente, as referidas vias de sinalização já foram descritas na literatura com papel relevante na patogênese do câncer de mama (ALLAIN, 2008;

JIANG; GREENBERG, 2015; NIELSEN; VAN OVEREEM HANSEN; SØRENSEN, 2016). Outras 174 vias de sinalização metabólicas e de sinalização celular apresentaram significância estatística (valor- $p < 0.05$).

Outras formas de câncer também são influenciadas pelo conjunto de genes avaliados, como os cânceres de ovário, endométrio, melanoma, colorretal, pulmão, glioma, entre outros, devido a alterações principalmente no funcionamento normal das vias de reparo de DNA e estabilidade do genoma. Sendo assim, a detecção de variantes patogênicas em painéis multigênicos para o câncer de mama pode auxiliar no aconselhamento genético para outros tipos de câncer.

A análise de interação entre os 45 genes avaliados deu origem a duas redes de interação principais, representadas nas Figuras 10 e 11. Do total de 70 moléculas presentes nas duas redes de interação, 60% (42/70) possuem associação estatística com o câncer de mama. A Figura 10 apresenta a principal rede de interações, com 30 genes/moléculas associadas à susceptibilidade aumentada ao câncer de mama. Três genes/moléculas se destacam como núcleos de interação principais: BARD1, BRCA1 e TP53, interagindo diretamente com ao menos 12 outras participantes da rede.

Mutações nos genes *BRCA1* e *TP53* são extensivamente pesquisadas quando há suspeita de CMF. Ambos apresentam penetrância elevada e estão associados às síndromes CMOH e Li-Fraumeni, respectivamente (CHEN; PARMIGIANI, 2007; LALLOO; EVANS, 2012). Apesar de o gene *BARD1* apresentar penetrância moderada (Tabela 8), sua posição central na rede de interação reflete a ligação direta de seu produto gênico com a proteína BRCA1 para a formação de uma E3 ubiquitina ligase. Tal interação é necessária para que o complexo BRCA1/BARD1 se ligue estavelmente nos locais de danos no DNA e realize adequadamente o reparo da quebra de fita dupla do DNA (WU *et al.*, 2015).

Do total de 18 genes presentes na lista consenso (Figura 12), 12 estão presentes nas redes de interações apresentadas, evidenciando a relevância funcional e causal dos genes pesquisados com maior frequência em painéis nacionais e internacionais bem como a validade biológica das redes de interações obtidas na análise realizada no *software* IPA (KRÄMER *et al.*, 2014).

As moléculas CDH1, NF1, PTEN e STK11 estão presentes somente na rede de interação com menor *score* associado (Figura 11), porém, todos os quatro genes descritos apresentam alta penetrância associada ao câncer de mama. A ausência

das referidas moléculas na rede de interação principal decorre da participação em vias alternativas àquelas frequentemente alteradas na oncogênese do câncer de mama (NIELSEN; VAN OVEREEM HANSEN; SØRENSEN, 2016). Portanto, a despeito do papel relevante na patogênese do CMF, demonstrado pela alta penetrância dos respectivos genes, a interação entre as demais moléculas associadas à patologia se mostra diminuta.

A participação da molécula *ESR1* como nóculo central em uma das redes de interações é um resultado relevante considerando sua baixa penetrância associada ao câncer de mama: RR: 1.29 (95% IC, valor-p= 2.0×10^{-15}) (EASTON *et al.*, 2007). O gene *ESR1* codifica um dos receptores de hormônio estrogênio localizados no núcleo. O hormônio estrogênio e seus receptores participam de diversos processos fisiológicos complexos e, mais especificamente na oncogênese, atuam na regulação da expressão gênica e modulam a proliferação e diferenciação celular em tecidos-alvo (TOSKA *et al.*, 2017).

Aproximadamente 70% dos cânceres de mama são do subtipo molecular luminal A ou luminal B, e expressam índices elevados de RE e RP (Figura 15) (CREIGHTON, 2012; YERSAL; BARUTCA, 2014). A maioria desses tumores apresenta boa resposta ao tratamento com agonistas do hormônio estrogênio (e.g., tamoxifeno), porém, muitos tumores se tornam refratários a esse tratamento ao longo do tempo. Toy e colaboradores (2013) demonstraram que os indivíduos portadores de mutações em *ESR1* apresentam proliferação celular pela via de sinalização do estrogênio mesmo na ausência desse hormônio, o que reduz a eficácia do tratamento em determinadas linhagens mutadas.

Apesar da associação do receptor de estrogênio na patogênese do câncer de mama ser bem descrita na literatura, os genes/moléculas participantes da via de sinalização do estrogênio são pouco abordados. Devido à relevância funcional para o CMF do gene *ESR1* evidenciada na rede de interação (Figura 11), os genes participantes da via de sinalização do estrogênio podem ser novos candidatos para associação com o câncer de mama e outras formas de cânceres com notável modulação hormonal (e.g., ovário e endométrio).

Figura 15. Via de sinalização dos subtipos moleculares Luminal A e Luminal B no câncer de mama. O receptor de estrogênio pode ser ativado na membrana plasmática ou no núcleo, disparando a cascata de sinalização que culmina na progressão do ciclo celular (G1/S) mesmo na presença de danos no DNA. Fonte: modificado de KANEHISA *et al.*, 2017.

4.3. Atualização dos painéis multigênicos para susceptibilidade ao câncer de mama

Estima-se que 5-10% de todos os casos de câncer decorram de variantes patogênicas herdadas (LALLOO; EVANS, 2012). Ao extrapolar esse valor para a estimativa de novos casos anuais de câncer de mama no Brasil (INCA, 2018), aproximadamente 2.985-5.970 indivíduos apresentaram essa patologia devido à predisposição hereditária.

Apesar do amplo espectro de alterações genéticas relacionadas à susceptibilidade hereditária ao câncer de mama, os genes *BRCA1* e *BRCA2* são os mais frequentemente mutados em pacientes com CMF. Na população mundial, inclusive no Brasil, variantes patogênicas em *BRCA1/2* são encontradas em 15-22% em pacientes com idade de início precoce ou forte HF (CARRARO *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2016; RICH *et al.*, 2015). Alguns desvios dessa frequência são encontrados em populações com forte efeito fundador, como a judia Ashkenazi.

No Brasil, 80% da população é atendida pelo Sistema Único de Saúde (SUS), onde não estão disponíveis testes moleculares para as formas hereditárias de câncer (CARRARO *et al.*, 2013). Para completar o cenário desfavorável, os planos

de saúde realizam exames moleculares seguindo as regras do Rol de Procedimentos e Eventos em Saúde 2018, preconizando a realização em etapas caso o resultado seja negativo: 1º) sequenciamento da região codificadora de *BRCA1/2*; 2º) sequenciamento da região codificadora de *BRCA1/2* e MLPA de *BRCA1/2*; 3º) repetir MLPA de *BRCA1/2*; 4º) painel multigênico de câncer de mama e/ou ovário.

Tendo em vista que aproximadamente 78-85% dos pacientes com HF de câncer de mama apresentam resultados negativos em exames para busca de variantes patogênicas nos genes *BRCA1/2*, torna-se evidente a necessidade de expandir as buscas por mutações em outros genes associados ao CMF. Como demonstrado na Figura 12 (lista consenso), 18 genes são frequentemente analisados em painéis multigênicos nas três localidades avaliadas: Brasil, EUA e Europa.

De fato, os genes da lista consenso apresentam alta ou moderada penetrância e participam com destaque nas vias de sinalização e redes de interação associadas ao câncer de mama, evidenciando sua relevância funcional na oncogênese dessa patologia. Complementarmente, a análise da frequência de variantes potencialmente deletérias (*nonsense*, *frameshift* ou em sítios de *splicing* com frequência menor do que 0.005) nos bancos de dados ABraOM e ExAC destaca a raridade de variantes patogênicas nos genes da lista consenso tanto na população brasileira como na população mundial (Tabela 10). Tais frequências reduzidas (<0.01) são um indicativo da patogenidade e consequente letalidade de mutações em genes associados a diversas formas de câncer.

Porém, com o avanço e barateamento das tecnologias de NGS, torna-se possível expandir as buscas por mutações para um número maior de genes, objetivando a caracterização molecular de uma parcela mais representativa dos pacientes com CMF.

Por meio de três critérios de seleção baseados na função celular, interação e penetrância individual dos genes associados ao CMF, foi proposta uma lista com nove genes (lista 4) indicados para compor um painel multigênico atualizado de acordo com o conhecimento científico vigente (Figura 13). Do ponto de vista populacional, os referidos genes também possuem frequência diminuta (<0.01) de variantes potencialmente deletérias nos bancos de dados ABraOM e ExAC, um

indicativo da patogenicidade e validade da inclusão dos nove genes sugeridos em testes genéticos oferecidos à população brasileira e mundial.

A caracterização das alterações moleculares responsáveis pelo CMF é essencial para enriquecer a qualidade do AG disponibilizado aos pacientes e seus familiares. Avaliar a presença de variantes patogênicas proporciona a orientação individualizada e estimativa mais precisa dos riscos de ocorrência em familiares próximos e recorrência de tumores no probando. O benefício imediato dos painéis multigênicos é a possibilidade de orientar o manejo clínico de forma mais precisa, seja com cirurgias profiláticas ou medicamentos antitumorais oferecidos para portadores de determinadas variantes patogênicas com acionabilidade clínica (SLAVIN *et al.*, 2017).

4.4. Avaliação da coorte do CEGH-CEL no contexto de variabilidade genética da população brasileira (ABraOM)

Do total de 79 pacientes avaliados, 24.05% (19/79) apresentaram variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas e 17.72% (14/79) apresentaram VUS. Outros dois grupos internacionais realizaram o sequenciamento completo de genes associados ao CMF em coortes de pacientes com prevalência de HF de câncer de mama ou ovário, descrevendo valores semelhantes aos da coorte do CEGH-CEL (Tabela 14), o que corrobora os resultados obtidos no presente trabalho.

As variantes patogênicas/possivelmente patogênicas detectadas nos genes *BRCA1/2* corresponderam a 63.15% do total, evidenciando a relevância de mutações nos referidos genes para etiologia do câncer de mama, principalmente no grupo de pacientes com histórico familiar positivo (Tabela 12). Outros estudos que avaliaram coortes e listas de genes semelhantes a do painel realizado no CEGH-CEL descrevem que, do total de variantes patogênicas identificadas, entre 54 e 75% estava presentes nos genes *BRCA1/2* (COUCH *et al.*, 2015; LIN *et al.*, 2016; TUNG *et al.*, 2016a).

Até o momento, existem poucos estudos populacionais no Brasil dedicados à avaliação da presença de mutações em *BRCA1/2*. DE SOUZA e colaboradores (2018) realizaram o sequenciamento dos genes *BRCA1/2* em 157 pacientes de naturalidade brasileira que cumpriam os critérios da NCCN para o câncer de mama hereditário, identificando variantes patogênicas em 17% da coorte. CARRARO e

colaboradores (2013), também em estudo com a população brasileira, avaliaram 54 pacientes com diagnóstico de câncer de mama precoce, encontrando uma frequência de mutações em *BRCA1/2* de 20%. Na coorte do CEGH-CEL, 15% dos pacientes apresentaram variantes patogênicas/possivelmente patogênicas nos respectivos genes, frequência semelhante à encontrada em trabalhos anteriores.

Tabela 14. Comparação entre a frequência de variantes patogênicas e VUS por paciente obtidos a partir do sequenciamento de genes associados ao câncer de mama familiar em coortes com características semelhantes

Estudo	# de indivíduos na coorte	# de genes avaliados	Genes avaliados	Freq. de variantes patogênicas por paciente	Freq. de VUS por paciente	Característica da coorte
CEGH-CEL	79	21	<i>ATM, AXIN2, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51, RAD51C, RAD51D, STK11 e TP53</i>	24.05%	17.27%	Pacientes com CM, 78,4% apresentavam histórico familiar de CM ou CO
LIN <i>et al.</i> , 2016*	133	25	<i>ATM, BRCA1, BRCA2, CDH1, CHEK2, FANCC, FANCI, FANCM, FGFR2, MLH1, MRE11, MSH2, MUTYH, NBN, NBS1, PALB2, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, STK11, TP53, XRCC2 e XRCC3</i>	22%	9%	Pacientes com CM, 72,9% apresentavam histórico familiar de CM ou CO
TUNG <i>et al.</i> , 2016a	488	25	<i>APC, ATM, BARD1, BMPRA1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDKN2A, CHEK2, EPCAM, NBN, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, PALB2, PMS2, RAD51C, RAD51D, PTEN, SMAD4, STK11e TP53</i>	10.70%	33.20%	Pacientes com CM, 49% apresentavam histórico familiar de CM ou CO

CM: câncer de mama; CO: câncer de ovário. Fonte: LIN *et al.*, 2016, TUNG *et al.*, 2016a.

Cinco pacientes da coorte foram diagnosticados com câncer de mama triplo negativo, um subtipo de prognóstico desfavorável e menor média de sobrevivência dentre todos os subtipos moleculares. Conforme descrito na literatura, o subtipo triplo negativo representa três quartos dos casos dos pacientes com mutações deletérias em *BRCA1* (YANG *et al.*, 2007); dos cinco pacientes com câncer de mama triplo negativo, dois apresentaram mutações patogênicas em *BRCA1* (P-37 e P-59), um apresentou VUS em *RAD51C* (P-36) e dois não apresentaram variantes nos genes avaliados.

Como descrito anteriormente, o histórico familiar é o fator de risco mais relevante para o câncer de mama após o gênero e o envelhecimento (LALLOO; EVANS, 2012). Na coorte CEGH-CEL, 78,4% dos pacientes declararam possuir um ou mais parentes próximos com câncer de mama ou câncer relacionado. Pacientes em que não foram detectadas variantes patogênicas ou VUS apresentavam histórico familiar positivo em 71.7% (33/46) dos casos, porém, em pacientes com variantes patogênicas ou VUS detectadas, o histórico familiar positivo estava presente em 94.7% (18/19) e 92.8% (13/14) dos casos, respectivamente. Tais dados evidenciam a forte associação entre o histórico familiar e a presença de variantes responsáveis pela oncogênese do CMF.

As VUS encontradas na parcela dos pacientes enriquecida com histórico familiar positivo e a baixa frequência no banco de dados ABraOM são um indicativo de patogenicidade. Futuramente, as VUS descritas na coorte avaliada podem ser reclassificadas, porém, é necessário que a casuística do CEGH-CEL e do banco de dados ABraOM sejam mais robustas para avaliarmos com maior acurácia a patogenicidade individual das variantes, bem como a contribuição com outros centros de pesquisas brasileiros para compor um panorama mais preciso das variantes gênicas responsáveis pelo câncer de mama familiar em nosso país.

Capítulo 5 - Conclusão

- Atualmente, 45 genes possuem associação ao câncer de mama familiar, 18 são frequentemente avaliados em painéis multigênicos brasileiros e internacionais para a predisposição hereditária ao câncer de mama.
- Ao todo, 179 vias de sinalização celular têm potencial de promover a oncogênese no tecido mamário na presença de mutações em genes de predisposição ao câncer de mama.
- Devido à relevância funcional do gene *ESR1* na rede de interações entre os genes associados ao câncer de mama familiar, sugerimos a avaliação de outros genes participantes da via de sinalização do estrogênio como novos candidatos à associação com o câncer de mama familiar.
- Com base na função celular, interação e penetrância individual dos genes associados ao CMF, sugerimos a adição de oito genes na composição de um painel multigênico atualizado para a predisposição hereditária ao câncer de mama: *BLM*, *HMMR*, *MRE11A*, *MSH6*, *PMS2*, *RAD50*, *RAD51*, *RINT1* e *UIMC1*.
- Entre os pacientes do CEGH-CEL, 24.05% apresentaram variantes patogênicas e 17.72% apresentaram VUS. Do total de variantes patogênicas detectadas, 63.15% estavam presentes em *BRCA1* e *BRCA2*. Tais dados são semelhantes aos obtidos em estudos internacionais e nacionais realizados em coortes com características similares, possibilitando a utilização de painéis multigênicos com composições análogas na população brasileira, norte-americana e europeia.
- Significância da via de sinalização de ATM para o câncer de mama familiar e frequência de VUS no gene *ATM* (1/3) são um indicativo da relevância funcional das variantes identificadas.
- As VUS descritas na coorte do CEGH-CEL estavam presentes prevalentemente em pacientes com histórico familiar positivo de câncer de mama e/ou ovário, porém, apresentam frequência reduzida no banco de dados ABraOM.

Bibliografia

ACHATZ, Maria Isabel Waddington et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer letters**, v. 245, n. 1-2, p. 96-102, 2007.

ACHATZ, Maria Isabel Waddington; HAINAUT, Pierre; ASHTON-PROLLA, Patricia. Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? **The lancet oncology**, v. 10, n. 9, p. 920-925, 2009.

ADANK, Muriel A. et al. Excess breast cancer risk in first degree relatives of CHEK2* 1100delC positive familial breast cancer cases. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 8, p. 1993-1999, 2013.

ADEM, C. et al. Primary breast sarcoma: clinicopathologic series from the Mayo Clinic and review of the literature. **British journal of cancer**, v. 91, n. 2, p. 237, 2004.

AKBARI, Mohammad Reza et al. Germline RAP80 mutations and susceptibility to breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 113, n. 2, p. 377-381, 2009.

ALLAIN, Dawn C. Genetic counseling and testing for common hereditary breast cancer syndromes: a paper from the 2007 William Beaumont hospital symposium on molecular pathology. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 5, p. 383-395, 2008.

AMENDOLA, Luis Cláudio Belo; VIEIRA, Roberto. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Rev Bras Cancerol**, v. 51, n. 4, p. 325-30, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2016. **Cancer Facts & Figures** 2016, p. 1–9, 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2018. **American Cancer Society**, p. 1–9, 2018.

ANTONIOU, Anthony et al. 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. **The American Journal of Human Genetics**, v. 72, n. 5, p. 1117-1130, 2003.

ANTONIOU, Antonis 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. **Journal of medical genetics**, 2008.

APOSTOLOU, Paraskevi; FOSTIRA, Florentia. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.

AUSTIN, Jehannine; SEMAKA, Alicia; HADJIPAVLOU, George. Conceptualizing genetic counseling as psychotherapy in the era of genomic medicine. **Journal of genetic counseling**, v. 23, n. 6, p. 903-909, 2014.

BIESECKER, Barbara B.; PETERS, Kathryn F. Process studies in genetic counseling: peering into the black box. **American journal of medical genetics**, v. 106, n. 3, p. 191-198, 2001.

BLUMENTHAL, Gideon M.; DENNIS, Phillip A. PTEN hamartoma tumor syndromes. **European journal of human genetics**, v. 16, n. 11, p. 1289, 2008.

BOGLIOLO, Massimo; SURRALLS, Jordi. Fanconi anemia: a model disease for studies on human genetics and advanced therapeutics. *Current opinion in genetics & development*, v. 33, p. 32-40, 2015. BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 2012.

BURKE, Wylie et al. Genetic assessment of breast cancer risk in primary care practice. **American Journal of Medical Genetics Part A**, v. 149, n. 3, p. 349-356, 2009.

BYRNES, Graham B.; SOUTHEY, Melissa C.; HOPPER, John L. Are the so-called low penetrance breast cancer genes, ATM, BRIP1, PALB2 and CHEK2, high risk for women with strong family histories? **Breast Cancer Research**, v. 10, n. 3, p. 208, 2008.

CAMPOS, Fábio Guilherme; FIGUEIREDO, Marleny Novaes; MARTINEZ, Carlos Augusto Real. Colorectal cancer risk in hamartomatous polyposis syndromes. **World journal of gastrointestinal surgery**, v. 7, n. 3, p. 25, 2015.

CARRARO, Dirce Maria 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**, v. 8, n. 3, p. e57581, 2013.

CASTÉRA, Laurent et al. Next-generation sequencing for the diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer using genomic capture targeting multiple candidate genes. **European Journal of Human Genetics**, v. 22, n. 11, p. 1305, 2014.

CHEANG, Maggie CU et al. Defining breast cancer intrinsic subtypes by quantitative receptor expression. **The oncologist**, v. 20, n. 5, p. 474-482, 2015.

CHEN, Sining; PARMIGIANI, Giovanni. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical**

Oncology, v. 25, n. 11, p. 1329, 2007.

CLAUS, Elizabeth B.; RISCH, Neil; THOMPSON, W. Douglas. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. **Cancer**, v. 73, n. 3, p. 643-651, 1994.

COMMITTEE ON NEW APPROACHES TO EARLY DETECTION AND DIAGNOSIS OF BREAST CANCER; NATIONAL CANCER POLICY BOARD; BOARD ON SCIENCE, TECHNOLOGY, AND E. P. P. AND G. A. D. **Saving Women's Lives: Strategies for Improving Breast Cancer Detection and Diagnosis**. [s.l: s.n.].

COSTANTINO, Joseph P. et al. Validation studies for models projecting the risk of invasive and total breast cancer incidence. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 18, p. 1541-1548, 1999.

COTTERCHIO, Michelle et al. Hormonal factors and the risk of breast cancer according to estrogen-and progesterone-receptor subgroup. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 12, n. 10, p. 1053-1060, 2003.

COUCH, Fergus J. et al. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 33, n. 4, p. 304, 2015.

CREIGHTON, Chad J. The molecular profile of luminal B breast cancer. **Biologics: targets & therapy**, v. 6, p. 289, 2012.

CURTIS, Christina et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature**, v. 486, n. 7403, p. 346, 2012.

CURY, Nathalia M.; FERRAZ, Victor EF; SILVA, Wilson A. TP53 p. R337H prevalence in a series of Brazilian hereditary breast cancer families. **Hereditary cancer in clinical practice**, v. 12, n. 1, p. 8, 2014.

CUZICK, J. et al. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. **The Lancet**, v. 361, n. 9354, p. 296-300, 2003.

DALY, Mary B. et al. NCCN guidelines insights: genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian, version 2.2017. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 15, n. 1, p. 9-20, 2017.

DE SOUZA TIMOTEO, Ana Rafaela et al. A portrait of germline mutation in Brazilian at-risk for hereditary breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 172, n. 3, p. 637-646, 2018.

DESANTIS, Carol et al. Breast cancer statistics, 2013. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 64, n. 1, p. 52-62, 2014.

DISTELMAN-MENACHEM, Tal et al. Analysis of BRCA1/BRCA2 genes' contribution to breast cancer susceptibility in high risk Jewish Ashkenazi women. **Familial cancer**, v. 8, n. 2, p. 127-133, 2009.

EASTON, Douglas F. et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1087, 2007.

EUHUS, David M. et al. Limitations of the Gail model in the specialized breast cancer risk assessment clinic. **The breast journal**, v. 8, n. 1, p. 23-27, 2002.

EVANI, Uday S. et al. Atlas2 Cloud: a framework for personal genome analysis in the cloud. **BMC genomics**, v. 13, n. 6, p. S19, 2012.

FERLAY, Jacques et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015.

FOO, Tzeh Keong et al. Compromised BRCA1–PALB2 interaction is associated with breast cancer risk. **Oncogene**, v. 36, n. 29, p. 4161, 2017.

FOULKES, William D. Inherited susceptibility to common cancers. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 20, p. 2143-2153, 2008.

GEER, Katherine P. et al. Factors influencing patients' decisions to decline cancer genetic counseling services. **Journal of genetic counseling**, v. 10, n. 1, p. 25-40, 2001.

GONZALEZ, Kelly D. et al. Beyond Li-Fraumeni syndrome: Clinical characteristics of families with p53 germline mutations. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 15_suppl, p. 11031-11031, 2008.

GUO, Fangjian et al. Use of BRCA mutation test in the US, 2004–2014. **American journal of preventive medicine**, v. 52, n. 6, p. 702-709, 2017.

HAMADA, Jun-ichi et al. Increased oxidative DNA damage in mammary tumor cells by continuous epidermal growth factor stimulation. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 3, p. 214-219, 2001.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HANSFORD, Samantha et al. Hereditary diffuse gastric cancer syndrome: CDH1 mutations

and beyond. **JAMA oncology**, v. 1, n. 1, p. 23-32, 2015.

HARKNESS, Elaine F. et al. Lynch syndrome caused by MLH1 mutations is associated with an increased risk of breast cancer: a cohort study. **Journal of medical genetics**, p. jmedgenet-2015-103216, 2015.

HEARLE, Nicholas et al. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. **Clinical Cancer Research**, v. 12, n. 10, p. 3209-3215, 2006.

HOBERT, Judith A.; ENG, Charis. PTEN hamartoma tumor syndrome: an overview. **Genetics in Medicine**, v. 11, n. 10, p. 687, 2009.

HOWLADER, N. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975–2014, SEER Cancer Statistics Review. 2016.

JIANG, Qinqin; GREENBERG, Roger. Deciphering the BRCA1 tumor suppressor network. **Journal of Biological Chemistry**, p. jbc. R115. 667931, 2015.

KANGELARIS, Kirsten N.; GRUBER, Stephen B. Clinical implications of founder and recurrent CDH1 mutations in hereditary diffuse gastric cancer. **Jama**, v. 297, n. 21, p. 2410-2411, 2007.

KIM, Benjamin et al. Anaplastic large cell lymphoma and breast implants: a systematic review. **Plastic and reconstructive surgery**, v. 127, n. 6, p. 2141-2150, 2011.

KING, Mary-Claire et al. 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**, v. 286, n. 18, p. 2251-2256, 2001.

KRÄMER, Andreas et al. Causal analysis approaches in ingenuity pathway analysis. **Bioinformatics**, v. 30, n. 4, p. 523-530, 2013.

KUMAR, Rajnish; SHARMA, Anju; TIWARI, Rajesh Kumar. Application of microarray in breast cancer: An overview. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 4, n. 1, p. 21, 2012.

KURIAN, Allison W. BRCA1 and BRCA2 mutations across race and ethnicity: distribution and clinical implications. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 22, n. 1, p. 72-78, 2010.

KURIAN, A. W. et al. Breast and Ovarian Cancer Penetrance Estimates Derived From Germline Multiple-Gene Sequencing Results in Women. **JCO Precision Oncology**, 2017.

LALLOO, F.; EVANS, D. G. Familial breast cancer. **Clinical genetics**, v. 82, n. 2, p. 105-114, 2012.

LEVY, Douglas E.; GARBER, Judy E.; SHIELDS, Alexandra E. Guidelines for genetic risk assessment of hereditary breast and ovarian cancer: early disagreements and low utilization. **Journal of general internal medicine**, v. 24, n. 7, p. 822-828, 2009.

LI, Heng; DURBIN, Richard. Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. **Bioinformatics**, v. 26, n. 5, p. 589-595, 2010.

LIM, Wendy et al. Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers¹. **Gastroenterology**, v. 126, n. 7, p. 1788-1794, 2004.

LIN, Po-Han et al. Multiple gene sequencing for risk assessment in patients with early-onset or familial breast cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 7, p. 8310, 2016.

MAINIERO, Martha B. et al. ACR appropriateness criteria breast cancer screening. **Journal of the American College of Radiology**, v. 13, n. 11, p. R45-R49, 2016.

MANOLIO, Teri A. et al. Finding the missing heritability of complex diseases. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 747, 2009.

MAREEL, Marc; LEROY, Ancy. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. **Physiological reviews**, v. 83, n. 2, p. 337-376, 2003.

MARSH, Debbie J. et al. PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations in Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome. **Human molecular genetics**, v. 8, n. 8, p. 1461-1472, 1999.

NASLAVSKY, Michel Satya et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. **Human mutation**, v. 38, n. 7, p. 751-763, 2017.

NATIONAL CANCER INSTITUT. Cancer Genetics Risk Assessment and Counseling (PDQ®). **National Cancer Institute**, p. 1–81, 2013.

NELEN, Marcel R. et al. Novel PTEN mutations in patients with Cowden disease: absence of clear genotype–phenotype correlations. **European Journal of Human Genetics**, v. 7, n. 3, p. 267, 1999.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK et al. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61, 2012.

NIELSEN, Finn Cilius; VAN OVEREEM HANSEN, Thomas; SØRENSEN, Claus Storgaard. Hereditary breast and ovarian cancer: new genes in confined pathways. **Nature Reviews**

Cancer, v. 16, n. 9, p. 599, 2016..

OLIVEIRA, Andre M.; ROSS, Jeffrey S.; FLETCHER, Jonathan A. Tumor suppressor genes in breast cancer: the gatekeepers and the caretakers. **Pathology Patterns Reviews**, v. 124, n. suppl_1, p. S16-S28, 2005.

ORLOFF, Mohammed S. et al. Germline PIK3CA and AKT1 mutations in Cowden and Cowden-like syndromes. **The American Journal of Human Genetics**, v. 92, n. 1, p. 76-80, 2013.

PAPE-ZAMBITO, Dana et al. Identifying a highly-aggressive DCIS subgroup by studying intra-individual DCIS heterogeneity among invasive breast cancer patients. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e100488, 2014.

PETO, Julian; MACK, Thomas M. High constant incidence in twins and other relatives of women with breast cancer. **Nature genetics**, v. 26, n. 4, p. 411, 2000.

PHAROAH, Paul DP et al. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **International journal of cancer**, v. 71, n. 5, p. 800-809, 1997.

PRAKASH, Rohit et al. Homologous recombination and human health: the roles of BRCA1, BRCA2, and associated proteins. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 7, n. 4, p. a016600, 2015.

RENAULT, Anne-Laure et al. ABRAXAS (FAM175A) and Breast Cancer Susceptibility: No Evidence of Association in the Breast Cancer Family Registry. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0156820, 2016.

RENNEVILLE, A. et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. **Leukemia**, v. 22, n. 5, p. 915, 2008.

RESTA, Robert et al. A new definition of genetic counseling: National Society of Genetic Counselors' task force report. **Journal of genetic counseling**, v. 15, n. 2, p. 77-83, 2006.

RICH, Thereasa A. et al. Hereditary breast cancer syndromes and genetic testing. **Journal of surgical oncology**, v. 111, n. 1, p. 66-80, 2015.

RICHARDS, Sue 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. **Genetics in medicine**, v. 17, n. 5, p. 405, 2015.

RILEY, Bronson D. et al. Essential elements of genetic cancer risk assessment, counseling, and testing: updated recommendations of the National Society of Genetic Counselors.

Journal of genetic counseling, v. 21, n. 2, p. 151-161, 2012.

ROBSON, Mark E. et al. American Society of Clinical Oncology policy statement update: genetic and genomic testing for cancer susceptibility. **Journal of clinical oncology**, v. 28, n. 5, p. 893-901, 2010.

ROBSON, Mark E. et al. American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 31, p. 3660–3667, 2015.

ROLNICK, Sharon J. et al. Barriers in identification and referral to genetic counseling for familial cancer risk: the perspective of genetic service providers. **Journal of Genetic Counseling**, v. 20, n. 3, p. 314, 2011.

SANTOS-PEREIRA, José M.; AGUILERA, Andrés. R loops: new modulators of genome dynamics and function. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 10, p. 583, 2015.

SCHLACHER, Katharina et al. Double-strand break repair-independent role for BRCA2 in blocking stalled replication fork degradation by MRE11. **Cell**, v. 145, n. 4, p. 529-542, 2011.

SEAL, Sheila et al. Truncating mutations in the Fanconi anemia J gene BRIP1 are low-penetrance breast cancer susceptibility alleles. **Nature genetics**, v. 38, n. 11, p. 1239, 2006.

SEMINOG, O. O.; GOLDACRE, M. J. Age-specific risk of breast cancer in women with neurofibromatosis type 1. **British journal of cancer**, v. 112, n. 9, p. 1546, 2015.

SHIOVITZ, Stacey; KORDE, Larissa A. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. **Annals of Oncology**, v. 26, n. 7, p. 1291-1299, 2015.

SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2011. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, p. 212–236, 2011.

SLAVIN, Thomas Paul et al. Clinical application of multigene panels: challenges of next-generation counseling and cancer risk management. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 208, 2015.

SLAVIN, Thomas P. et al. The contribution of pathogenic variants in breast cancer susceptibility genes to familial breast cancer risk. **NPJ breast cancer**, v. 3, n. 1, p. 22, 2017.

STANISLAW, Christine; XUE, Yuan; WILCOX, William R. Genetic evaluation and testing for hereditary forms of cancer in the era of next-generation sequencing. **Cancer biology & medicine**, v. 13, n. 1, p. 55, 2016.

TAMIMI, Rulla M. et al. Traditional breast cancer risk factors in relation to molecular subtypes

of breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 131, n. 1, p. 159-167, 2012.

THAM, Khok-Chian; KANAAR, Roland; LEBBINK, Joyce HG. Mismatch repair and homeologous recombination. **DNA repair**, v. 38, p. 75-83, 2016.

THOMPSON, Ella R. et al. Panel testing for familial breast cancer: calibrating the tension between research and clinical care. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 13, p. 1455-1459, 2016.

TOSKA, Eneda et al. PI3K pathway regulates ER-dependent transcription in breast cancer through the epigenetic regulator KMT2D. **Science**, v. 355, n. 6331, p. 1324-1330, 2017.

TOY, Weiyi et al. ESR1 ligand-binding domain mutations in hormone-resistant breast cancer. **Nature genetics**, v. 45, n. 12, p. 1439, 2013.

TUNG, Nadine et al. Frequency of germline mutations in 25 cancer susceptibility genes in a sequential series of patients with breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 13, p. 1460, 2016.

TUNG, Nadine et al. Counselling framework for moderate-penetrance cancer-susceptibility mutations. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 13, n. 9, p. 581, 2016b.

VAN DER AUWERA, Geraldine A. et al. From FastQ data to high-confidence variant calls: the genome analysis toolkit best practices pipeline. **Current protocols in bioinformatics**, v. 43, n. 1, p. 11.10. 1-11.10. 33, 2013.

VANAGS, Andrejs et al. Population screening for hereditary and familial cancer syndromes in Valka district of Latvia. **Hereditary cancer in clinical practice**, v. 8, n. 1, p. 8, 2010.

VASEN, Hans FA; TOMLINSON, Ian; CASTELLS, Antoni. Clinical management of hereditary colorectal cancer syndromes. **Nature reviews Gastroenterology & hepatology**, v. 12, n. 2, p. 88, 2015.

WALERYCH, Dawid et al. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. **Carcinogenesis**, v. 33, n. 11, p. 2007-2017, 2012.

WANG, Kai; LI, Mingyao; HAKONARSON, Hakon. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 16, p. e164-e164, 2010.

WANG, Yi et al. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. **Genes & development**, v. 14, n. 8, p. 927-939, 2000.

WEISCHER, Maren et al. CHEK2* 1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 4, p. 542-548, 2008.

WILLIAMS, Virginia C. et al. Neurofibromatosis type 1 revisited. **Pediatrics**, v. 123, n. 1, p. 124-133, 2009.

WU, Wenwen et al. Interaction of BARD1 and HP1 is required for BRCA1 retention at sites of DNA damage. **Cancer research**, 2015.

YANG, Xiaohong R. et al. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 16, n. 3, p. 439-443, 2007.

YANG, Xiaohong R. et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 3, p. 250-263, 2010.

YEHIA, Lamis et al. Germline heterozygous variants in SEC23B are associated with Cowden syndrome and enriched in apparently sporadic thyroid cancer. **The American Journal of Human Genetics**, v. 97, n. 5, p. 661-676, 2015.

YERSAL, Ozlem; BARUTCA, Sabri. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 3, p. 412, 2014.

ZIV, Elad et al. Mammographic breast density and family history of breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 7, p. 556-558, 2003.