

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE POS GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE (PPGSCA)**

**MESTRADO PROFISSIONAL EM GENÉTICA APLICADA À MEDICINA  
COM ÊNFASE EM ONCOGENÉTICA**

**A IMPORTÂNCIA DE RECONHECER E  
CARACTERIZAR MULHERES BRASILEIRAS COM A  
SÍNDROME DO CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO  
HEREDITÁRIOS**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL**

**ALESSANDRA BORBA ANTON DE SOUZA**

Porto Alegre, Brasil

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE POS GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE (PPGSCA)**

**MESTRADO PROFISSIONAL EM GENÉTICA APLICADA À MEDICINA  
COM ÊNFASE EM ONCOGENÉTICA**

**A IMPORTÂNCIA DE RECONHECER E  
CARACTERIZAR MULHERES BRASILEIRAS COM A  
SÍNDROME DO CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO  
HEREDITÁRIOS**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Patrícia Ashton-Prolla**

**ALESSANDRA BORBA ANTON DE SOUZA**

A apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Porto Alegre, Brasil

2018

#### CIP - Catalogação na Publicação

Souza, Alessandra Borba Anton de  
A importância de reconhecer e caracterizar mulheres  
brasileiras com a síndrome do câncer de mama e ovário  
hereditários / Alessandra Borba Anton de Souza. --  
2018.  
096 f.  
Orientador: Patrícia Ashton-Prolla.

Dissertação (Mestrado Profissional) -- Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina,  
Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do  
Adolescente, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Câncer de mama . 2. Aconselhamento genético. 3.  
Síndromes de câncer de mama e ovário hereditários. 4.  
BRCA 1 e 2. I. Ashton-Prolla, Patrícia, orient. II.  
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE POS GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO  
ADOLESCENTE (PPGSCA)**

**MESTRADO PROFISSIONAL EM GENÉTICA APLICADA À MEDICINA  
COM ÊNFASE EM ONCOGENÉTICA**

**A IMPORTÂNCIA DE RECONHECER E  
CARACTERIZAR MULHERES BRASILEIRAS COM A  
SÍNDROME DO CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO  
HEREDITÁRIOS**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Patrícia Ashton-Prolla**

**ALESSANDRA BORBA ANTON DE SOUZA  
ESTA DISSERTAÇÃO FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM:**

27/08/2018

E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. André Fay

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS

Profa Dra Andreia Damin

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr. Maria Teresa San Severino

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS e Pontifícia Universidade  
Católica do Rio Grande do Sul -PUCRS

Porto Alegre, Brasil

2018

## **AGRADECIMENTOS**

Desafio tão grande quanto fazer a dissertação, é não esquecer de agradecer tantas pessoas importantes para mim.

Começo agradecendo a minha orientadora, Professora Doutora Patrícia Prolla, por todo ensinamento, paciência e empenho em ser uma professora excelente. Muito obrigada pelo exemplo que és como pessoa e profissional.

Desejo igualmente agradecer a todos os profissionais que trabalhei e me ajudaram no mestrado. São pessoas que aprendi muito e vários tornaram-se meus amigos. Meus sinceros agradecimentos para: Camila Bittar, Cristina Netto, Daniele Konzen, Gabriel Macedo, Clévia Rosset, Barbara Alemar, Fernanda Vianna, Marina Lemieszek e todos da equipe do laboratório que sempre me receberam muito bem.

Na minha trajetória como mastologista contei com incentivo, ensinamento e apoio de grandes profissionais. Desejo igualmente agradecer ao Professor Dr Antonio Frasson, a Dra Betina Vollbrecht, a Mestre Janaína Viegas, a Marcelle Moraes, a Nathalia Rossato e a Isabela Albuquerque Miranda.

Desejo igualmente agradecer a dois profissionais exemplares para mim, Professor Dr Felipe Zerwes e Dr Márcio Debiasi, que me ajudaram a encontrar a minha orientadora e incentivaram a seguir minha curiosidade sobre esse assunto fascinante: a genética.

Por último, quero agradecer à minha família, sem os quais eu não existiria e não seria a pessoa quem me tornei. Sempre contei com o apoio e amor incondicional dos meus pais André e Rosane, e dos meus avós Adão e Cláudia Borba, que seguem me iluminando com suas presenças em outra dimensão. Ao meu irmão Andre Jr, meu afilhado Gabriel, minha cunhada Greici e todos aqueles que fazem parte do meu grande conceito de família. Por fim, ainda parte da minha família, o Rodrigo Pasqua sempre me apoiou nos estudos e o tempo todo esteve ao meu lado, entendendo meus muitos momentos de afastamento e reclusão para os estudos.

Todos vocês são co-autores deste trabalho e fazem parte da minha vida.

Esta dissertação tem como resultado o conjunto de três trabalhos:

- Prevalência de pacientes com indicação de análise molecular genética para Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditários no Estudo AMAZONA III atendidas em um Hospital do Sul do Brasil, considerando apenas 3 critérios de indicação de testagem, projeto aprovado na Plataforma Brasil com número CAAE: 48573015.5.2007.5336
- Freqüência de mutações germinativas de *BRCA1* e *BRCA2* em uma série de casos de pacientes com câncer de mama metastático no Rio Grande do Sul, projeto aprovado na plataforma Brasil com número CAAE: 79930517.7.0000.5327
- Early-onset breast cancer in a patient with Neurofibromatosis Type 1 and Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome: does the double mutant status contribute to cancer anticipation? Relato de caso identificado durante o curso de uma das disciplinas de mestrado.

## RESUMO

O câncer de mama é o mais incidente na população feminina, excetuando-se os casos de câncer de pele. Calcula-se que 20 a 30% dos casos sejam de origem familiar e os outros 70 a 80% sejam esporádicos. Pacientes que apresentam critérios para neoplasia de origem familiar, necessitam de avaliação genética, uma vez que o diagnóstico de câncer hereditário resulta em condutas diferenciadas de manejo para o paciente e familiares com atuações custo-efetivas comprovadas. O Sistema Único de Saúde (SUS) no Brasil, que atende em torno de 70% da população, não cobre a realização de exames para avaliação de câncer hereditário. Os critérios para selecionar os indivíduos que se beneficiam dessa avaliação são bem estabelecidos por diretrizes internacionais, as quais embasaram também as recomendações da ANS (Agência Nacional de Saúde Suplementar) para a cobertura por parte dos convênios de saúde para consulta de aconselhamento genético e para realização de exames complementares. No Brasil, existem poucas publicações analisando os dados epidemiológicos das nossas pacientes em risco para câncer hereditário. Esse trabalho tem como objetivo contribuir com dados de indivíduos brasileiros para o conhecimento da Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditários e consiste em descrever a frequência de pacientes com indicação de análise molecular dos genes *BRCA1* e *BRCA2* em uma instituição específica no estudo multicêntrico AMAZONA III; em descrever a prevalência de mutações patogênicas e VUS em *BRCA1* e *BRCA2* em uma série de casos de câncer de mama metastáticos no Rio Grande do Sul e descrever uma paciente com câncer de mama em idade jovem, portadora de mutações germinativas em *BRCA2* e *NF1*, avaliando a contribuição de perda de

heterozigozidade no câncer de mama e um possível efeito de antecipação da idade ao diagnóstico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Câncer de mama. Aconselhamento genético. Síndromes de câncer de mama e ovário hereditários. *BRCA 1 e 2*.



## ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent malignant cancer among women worldwide and in Brazil. Approximately 20 to 30% of all breast cancer cases are familial and the other 70 to 80% are sporadic. Patients who present criteria for possible familial or hereditary breast cancer require genetic evaluation, since the diagnosis of hereditary cancer results in different management procedures for patients and their at-risk relatives with proven cost-effective interventions. The Brazilian National Health System (SUS), which covers 70% of the population, does not cover genetic tests for evaluating hereditary cancer. Criteria for selecting individuals who would benefit from this type of evaluation are established by international guidelines, which provided the basis for the recommendations issued by the Brazilian Regulatory Agency for private health care (ANS, Agência Nacional de Saúde - National Health Agency) regarding genetic counseling and testing. In Brazil, there are few publications analyzing epidemiological data of high-risk patients, especially those at risk for hereditary cancer. This study aims to contribute data from Brazilian individuals to the knowledge of the Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome in our population and consists of describing the frequency of patients with indication of molecular analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in a specific institution in the study multicenter AMAZONA III; describing the prevalence of pathogenic and VUS mutations in *BRCA1* and *BRCA2* in a series of metastatic breast cancer cases in Rio Grande do Sul and to describe a patient with breast cancer at a young age with *BRCA2* and *NF1* germline mutations, evaluating the contribution of loss of heterozygosity in breast cancer and a possible effect of anticipating age at diagnosis.

**KEYWORDS:** Breast cancer. Genetic counselling. Hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *BRCA1* and *BRCA 2*.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Percentual componente hereditário no câncer de mama. ....	16
<b>Figura 2.</b> Distribuição das variantes patogênicas no câncer de mama. ....	18
<b>Figura 3.</b> Risco cumulativo vital de câncer em pacientes mutadas BRCA1 e 2. ....	21
<b>Figura 4.</b> Centros da Rede Nacional de Câncer Familiar no Brasil. Segundo INCA.....	40
<b>Figure 1:</b> Family pedigree showing index case (arrow). ....	73
<b>Figure 2:</b> BRCA2 mutation on tumor / breast tissue – sanger method.....	74
<b>Figure 3:</b> BRCA2 mutation on in situ tumor (first tumor) in breast tissue –NGS method.....	74
<b>Figure 4:</b> NF1 mutation on tumor in breast tissue. ....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Manejo clínico nas portadoras de mutações nos genes <i>BRCA 1</i> e <i>BRCA2</i> . ....	22
<b>Tabela 2</b> - Manejo cirúrgico nas portadoras de mutações nos genes <i>BRCA 1</i> e <i>BRCA2</i> . ....	22
<b>Tabela 1.</b> Dados demográficos e tumorais das pacientes no estudo .....	51
<b>Tabela 2.</b> História pessoal e familiar de câncer .....	52
<b>Table 1:</b> Clinical and molecular data of mutation carriers .....	62

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Manejo para mama e ovário baseado nos resultados de testes genéticos. ....	30
<b>Quadro 2</b> - Quando referenciar para avaliação genética de HBOC .....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACMGG</b>	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
<b>AG</b>	<i>Aconselhamento Genético</i>
<b>ASCO</b>	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
<b>CDH1</b>	Câncer gástrico difuso hereditário
<b>HBOC</b>	<i>Hereditary breast and ovary cancer</i> = (síndrome de câncer de mama e ovário hereditários)
<b>HCPA</b>	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
<b>HER2</b>	<i>Human epidermal growth factor 2</i>
<b>HSL-PUCRS</b>	Hospital São Lucas da PUCRS
<b>INCA</b>	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
<b>MLPA</b>	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
<b>NCCN</b>	National Comprehensive Cancer Network
<b>NF</b>	Neurofibromatose
<b>NGS</b>	Next Generation Sequence
<b>NICE</b>	National Institute for Health and Care Excellence
<b>PARP</b>	Poly ADP-ribose Polymerase
<b>PSF</b>	Programa de Saúde da Família
<b>PV</b>	Pathogenics Variants = variantes patogênicas
<b>SC</b>	Síndrome de Cowden
<b>SLF</b>	Síndrome de Li-Fraumeni
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>USPSTF</b>	United States Preventive Services Task Force
<b>VUS</b>	<i>Variant of uncertain significance</i> = Variante de Significado Incerto
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1 CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO.....	16
2.2 A SÍNDROME DO CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO HEREDITÁRIOS .....	19
2.3 OS GENES BRCA1 E BRCA2.....	23
2.4 OUTROS GENES ASSOCIADOS A CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO.....	27
2.5 ACONSELHAMENTO GENÉTICO EM ONCOGENÉTICA .....	32
2.6 RESULTADOS DOS TESTES GENÉTICOS.....	36
2.7 MULHERES BRASILEIRAS COM A SÍNDROME DO CÂNCER DE MAMA E O OVÁRIOS HEREDITÁRIOS .....	38
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>43</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>
4.1 OBJETIVO GERAL.....	44
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	44
<b>5 RESULTADOS EM FORMATO DE ARTIGO.....</b>	<b>45</b>
5.1 ARTIGO 1: A SER SUBMETIDO NA REVISTA MASTOLOGY.....	45
5.2 ARTIGO 2: A SER SUBMETIDO PARA REVISTA JOURNAL OF BREAST CANCER.....	58
5.3 ARTIGO 3: A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA BREAST CANCER RES TREAT .....	67
<b>6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>81</b>
<b>7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>	<b>84</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO I - CRITÉRIOS NCCN 2018 .....</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO .....</b>	<b>88</b>
<b>ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO DE COLETA DE SANGUE PARA     BRCA PELO LABORATORIO PATHWAY GENOMIC .....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXO IV - ROLL DE PROCEDIMENTOS E EVENTOS EM SAUDE 2018.....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO V - AUTORIZAÇÃO DO GEBECAM .....</b>	<b>96</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Todos os cânceres se desenvolvem como resultado de uma ou mais mutações em certos genes, sendo os mais relevantes aqueles que estão envolvidos na regulação do crescimento celular e/ou no reparo do DNA, incluindo genes supressores de tumor e oncogenes. A causa básica do câncer é o dano a genes específicos. Mutações nestes genes se acumulam em células somáticas ao longo dos anos, até que a célula perde um número crítico de mecanismos de controle do crescimento e inicia um tumor. Na maioria dos casos, essas mutações ocorrem ao acaso ao longo da vida de uma pessoa e não são herdadas dos pais ou passadas para sua prole. No entanto, estudos de algumas famílias documentaram um risco aumentado de diversos tipos de câncer entre familiares de primeiro grau (pais, filhos e irmãos) e entre familiares de segundo e terceiro grau (avós, tios, netos, sobrinhos, primos) diagnosticados com câncer. Os indivíduos dessas famílias podem ter uma predisposição aumentada para câncer devido a presença de uma mutação germinativa de alta penetrância. As neoplasias diagnosticadas nesses indivíduos podem ser classificadas como de origem predominantemente hereditária. Um indivíduo identificado com uma mutação hereditária terá uma maior predisposição a desenvolver câncer ao longo da vida em comparação com seus pares da população geral. (ANTONIOU e EASTON, 2006; NCCN, 2018) Os cânceres hereditários se apresentam com transmissão vertical através do pai ou da mãe e, comumente, há associação com múltiplos diferentes tipos de tumor diagnosticados em idade jovem. (ATAOLLAHI *et al.*, 2015)

A avaliação de um indivíduo com risco de câncer de mama hereditário é baseada na história familiar do paciente e, em caso de paciente com câncer diagnosticado, também nas características da neoplasia (ex. subtipos histológicos, características imuno-histoquímicas, idade no diagnóstico e outros). Diferentes genes foram associados a predisposição hereditária

para câncer de mama ou ovário, incluindo os genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *CDH1*, entre outros.(MOYER, 2014)

Pacientes que apresentam critérios para possível neoplasia de origem hereditária têm indicação de realizar avaliação genética, uma vez que o diagnóstico de câncer hereditário resulta em condutas diferenciadas de manejo para o paciente e familiares em risco, incluindo estratégias de prevenção, rastreamento e tratamento.(PALUCH-SHIMON *et al.*, 2016) Esses critérios são bem estabelecidos por diretrizes internacionais (como a *U.S. Preventive Task Force* e NCCN), nas quais também foram baseadas as recomendações da Agência Nacional de Saúde (ANS) no Brasil (Anexo 1). Além disso, a realização de aconselhamento genético pré e pós teste é de fundamental importância tendo em vista a complexidade dos exames moleculares e nas condutas que devem ser orientadas com precisão após o resultado. (EUHUS, 2014)

No Brasil, ainda são poucas as ações governamentais que objetivam a identificação, orientação e acompanhamento de indivíduos e famílias de alto risco para câncer hereditário. O Sistema Único de Saúde, embora reconheça e remunere o aconselhamento genético, não cobre os custos da análise genética das pacientes com indicação de testagem molecular. Além disso, os serviços de genética médica da rede pública estão concentrados em poucos hospitais do Brasil. (ASHTON-PROLLA e SEUANEZ, 2016)

Dados específicos sobre a estatística de câncer de mama hereditário no Brasil não estão disponíveis. Também há uma significativa deficiência no acesso ao teste genético de mutações nos genes *BRCA*, tanto em países da América do Norte e Europa, mas especialmente na América Latina. Recente publicação na JAMA liderada por Allison Kurian, demonstrou um interesse das pacientes com diagnóstico de câncer de mama receberem informações sobre predisposição hereditária e testes genéticos. Entre as pacientes de alto risco, apenas 52,9% realizaram o teste genético, resultando na perda de identificação de pacientes com mutações e redução das oportunidades de prevenção de ocorrência de novos cânceres. A grande

importância desse estudo consiste na possibilidade de podermos falar do aconselhamento genético para identificação de pacientes de alto risco. (KURIAN *et al.*, 2017)

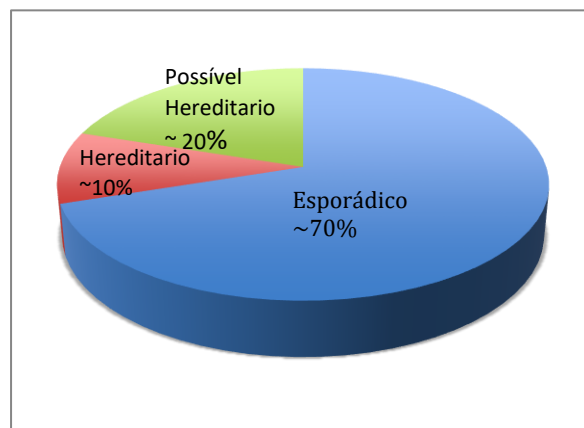
Neste trabalho revisaremos a Síndrome de câncer de mama e ovário hereditários (do inglês, Hereditary Breast and Ovarian Cancer, HBOC) e contribuir com dados de pacientes brasileiras sobre câncer de mama hereditário, através de 3 trabalhos que envolvem análise da prevalência de pacientes com indicação de testagem molecular em um grupo de mulheres com câncer de mama, revisão de dados de pacientes que já haviam realizado o exame, e análise molecular específica de um relato de caso. Como já exposto anteriormente, é de extrema importância caracterizar mais detalhadamente os resultados da análise molecular da população brasileira.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO

Câncer de mama é uma doença na qual células mamárias se tornam anormais e se multiplicam, formando um tumor maligno. É a forma mais comum de câncer e a segunda causa mais comum de morte por doença neoplásica em mulheres no mundo. Uma em cada 8 mulheres desenvolverão câncer de mama ao longo da vida nos países desenvolvidos. Existem inúmeros fatores de risco conhecidos como: radiação, hormônios, obesidade na pós menopausa entre outros. O risco individual aumenta proporcionalmente com o número de parentes afetados e com a idade do acometimento. Estima-se que 70 a 80% sejam esporádicos, resultantes da exposição a múltiplos fatores de risco.(PALUCH-SHIMON *et al.*, 2016) Embora até 30% dos casos de câncer de mama são atribuídos a fatores hereditários, apenas uma fração desses casos (5-10%) apresentam mutações germinativas de alta penetrância transmitidas de maneira autossômica dominante. (APOSTOLOU e FOSTIRA, 2013)



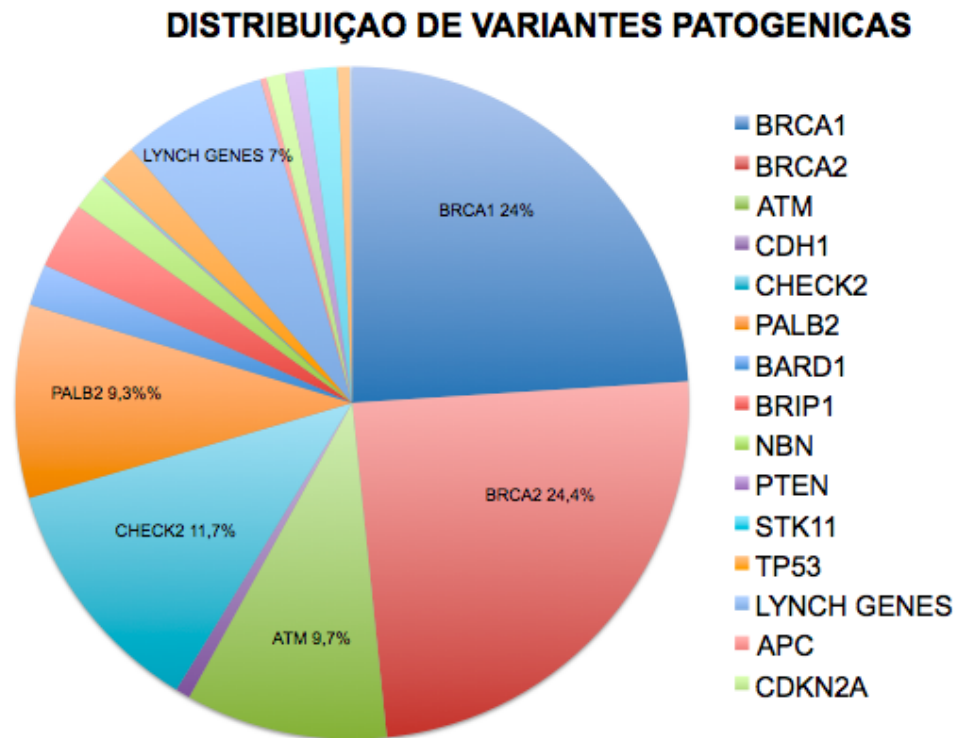
**Figura 1.** Percentual componente hereditário no câncer de mama. Gráfico adaptado EUHUS, 2014: Em torno de 30% dos casos de câncer de mama tem um componente genético. Avanços foram feitos nas últimas duas décadas sobre os fatores hereditários relacionados a suscetibilidade ao câncer de mama, embora muito ainda precisa ser descoberto. Esses avanços estão baseados na descoberta e caracterização de inúmeros genes de alto risco, incomuns, responsáveis ao agrupamento de câncer de mama em algumas famílias. Mais recentemente, um grande número de variantes comuns foi relacionado com um risco individual de efeito modesto nos estudos de largas escala populacional sobre genômica.(ASHWORTH e *et al.*, 2014)

A perda de função de cerca de pelo menos 30 genes diferentes já conhecidos hoje apresenta clara correlação com padrões de hereditariedade, ou seja, indivíduos portadores de mutações em um destes genes apresentam maior probabilidade de desenvolverem câncer de mama, bem como outros tipos de câncer durante a vida, em comparação com a população em geral. A identificação de indivíduos portadores dessas alterações genéticas é fundamental, pois não só pode ser extremamente útil para guiar tratamento clínico-cirúrgico de pacientes acometidas por neoplasias, mas também pode orientar estratégias personalizadas de prevenção e de redução de risco para familiares portadores assintomáticos. Uma vez identificada a mutação no probando, há 50% de chance de que familiares de primeiro grau sejam também portadores dessa mutação.(GARICOCHEA, 2017)

As principais síndromes genéticas associadas a alto risco de desenvolvimento de câncer de mama são: síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC) com mutações nos genes *BRCA 1* e *BRCA 2*, síndrome de Li-Fraumeni com mutação no gene *TP53*, síndrome de Cowden com mutação no gene *PTEN*, síndrome do câncer gástrico difuso hereditário com mutação no gene *CDH1* e síndrome de Peutz-Jeghers com mutação no gene *STK11*. Entre estas, as mutações deletérias nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são as mais prevalentes.(GARICOCHEA, 2017)

Historicamente, o câncer de mama hereditário é associado com a síndrome HBOC. Com a introdução de teste genéticos mais acessíveis através das plataformas de seqüenciamento NGS (que permite análise de diversos genes em inúmeras pacientes de uma única vez), aumentou o número de indivíduos identificados com risco genético aumentado para câncer de mama. Recentemente, um estudo americano publicou resultados de 35.409 mulheres com câncer de mama que foram testadas com um painel de 25 genes relacionados a essa patologia. O resultado na figura 2 abaixo mostra a grande predominância dos genes *BRCA*, porém 51% das variantes identificadas foram em outros genes. Isso demonstra a complexidade desse assunto e como

estamos adquirindo conhecimento conforme a tecnologia melhora e conhecemos melhor as características das pacientes .(BUYS *et al.*, 2017)



**Figura 2.** Distribuição das variantes patogênicas no câncer de mama. Gráfico adaptado BUYS *et al.*, 2016: 35.409 mulheres com câncer de mama testadas com painel de 25 genes. Um total de 9,3% das mulheres testadas foram identificadas com uma variante patogênica, sendo que mais de 50% em outros genes não *BRCA1* e 2.

Apesar de mutações nesses 2 genes *BRCA* serem importantes no câncer hereditário da mama, em mulheres com critérios para essa suspeita, seja pela história familiar ou pela história pessoal, a investigação genética não deve se limitar ao estudo destes dois genes. A disponibilidade de novas tecnologias que permitam a análise simultânea de múltiplos genes a menor custo é uma ferramenta importante para auxiliar a definir as causas do câncer hereditário da mama em diferentes populações. (STANISLAW *et al.*, 2016)

Como a atual utilidade clínica está restrita aos genes de alto risco, esse trabalho irá focar na principal síndrome associada ao câncer de mama: Síndrome do câncer de mama e ovário hereditários (Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome – HBOC).

Saber identificar pacientes de alto risco hoje faz parte da boa prática médica. Essas pacientes se beneficiam de acompanhamento com aconselhamento genético individualizado de acordo com cada caso pessoal e familiar. Uma vez a paciente tendo sido identificada como de alto risco já existem estudos robustos e guidelines que demonstram benefícios de medidas de rastreamento e terapêuticas bem eficazes para diversos tipos de síndromes e situações de alto risco, mesmo sem identificação de uma síndrome específica.

## 2.2 A SÍNDROME DO CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO HEREDITÁRIOS

Mutações deletérias nos genes *BRCA1* e *BRCA2* causam a síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC) que é uma síndrome autossômica dominante. A síndrome HBOC resulta em um risco significativamente maior de desenvolvimento câncer de mama e ovário, estimado em até 7 e 25 vezes mais, respectivamente, quando comparado como o risco da população geral, dependendo sobre a população estudada. A presença de uma mutação em *BRCA* também foi demonstrado em múltiplos estudos ser associado a um risco aumentado em câncer de próstata, pâncreas e melanoma. A associação entre mutações *BRCA* e alto risco de câncer gástrico, câncer colo-retal e câncer uterino permanece fraca e, portanto, triagem e prevenção desses tipos de câncer entre portadores não é indicada. (PALUCH-SHIMON *et al.*, 2016)

A prevalência estimada de mutações *BRCA1/2* depende da população e pode variar entre 1 em 300 a 1 em 800 indivíduos. Mais de 2000 mutações diferentes foram identificadas nesses genes. Em populações geograficamente isoladas ou que apresentem alto coeficiente de consanguinidade, como, por exemplo certas populações russas, finlandesas e judaicas Ashkenazi, a prevalência é ainda maior. Nestes grupos, um pequeno número de mutações comuns é responsável pela maioria dos casos de afetados, por um fenômeno chamado “efeito

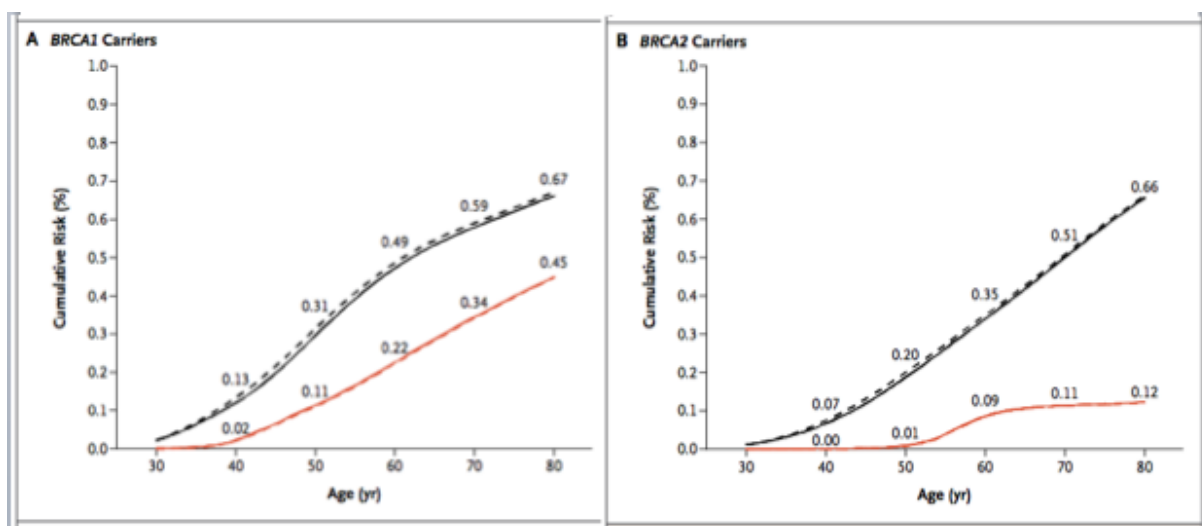
fundador”. (ASHTON-PROLLA e NETTO, 2015) Na população judaica Ashkenazi, a prevalência é de 2,5% (1 em 40 indivíduos). Nessa população as mutações mais prevalentes são: *BRCA1* (185delAG [= c.68\_69delAG], 5382InsC [= c.5266dupC]) ou *BRCA2* (6174delT [= c.5946delT]). As mutações fundadoras têm também foram descritas em outros locais. (PALUCH-SHIMON *et al.*, 2016)

A penetrância é variável e não é claramente compreendida, estimativas de variam de 41 a 90%. No presente, não está claro se a penetrância está relacionada com a mutação específica na família e o quanto fatores adicionais, genéticos ou ambientais, afetam a expressão da doença. Um estudo recente de triagem populacional sugeriu que mesmo entre aqueles sem história familiar de câncer, o risco de desenvolvimento ao longo da vida de câncer de mama e/ou de câncer de ovário aos 80 anos foi de até 83% ( $\pm 7\%$ ) na presença de *BRCA1*, 76% ( $\pm 13\%$ ) na presença de uma mutação *BRCA2* e o risco foi maior nas coortes mais contemporânea. (GABAI-KAPARA *et al.*, 2014)

Entre os homens que abrigam um *BRCA1* ou Mutação *BRCA2*, existe um risco estimado ao longo da vida para câncer de mama ao redor de 1,2% a 7%, respectivamente, e um aumento de risco para câncer de próstata de 2 a 6 vezes. (PALUCH-SHIMON *et al.*, 2016; NCCN, 2018) Portadores de mutação em *BRCA2* também apresentam um risco aumentado de câncer de pâncreas e melanoma. (NCCN, 2018)

Para portadoras de mutação no gene *BRCA1* o risco cumulativo vital de câncer de mama até os 80 anos é estimado em 67% e para câncer de ovário em 45% (entende-se ovário, trompas e peritônio). Já para portadoras de mutação no gene *BRCA2* esses riscos são de 66% e 12% para mama e ovário, respectivamente, conforme observamos na figura 3 abaixo. Esses dados são baseados em um estudo populacional de 2.785 famílias, sendo 537 carreadoras de mutação. Uma mulher de 60 anos assintomática portadora de uma mutação em *BRCA2* apresenta um risco aproximado de 48% de desenvolver câncer de mama até os 80 anos. Esse dado é muito

importante para a compreensão de que o risco de desenvolver câncer para as portadoras de mutação nesses genes nunca diminuí e, até hoje, não temos exames que indiquem quem são as pacientes que desenvolverão a doença e as que não desenvolverão. (ANTONIOU *et al.*, 2003; HARTMANN e LINDOR, 2016)



**Figura 3.** Risco cumulativo vital de câncer em pacientes mutadas BRCA1 e 2. Gráfico do artigo *The Role of Risk-Reducing Surgery in Hereditary Breast and Ovarian Cancer*, representando o risco cumulativo vital para câncer de mama e ovário nas portadoras de mutação em *BRCA1* (A da esquerda) e *BRCA2* (B direita). As linhas lisas representam coorte de 1940-1949 e as pontilhadas coorte de com início em 1949. As linhas pretas representam câncer de mama e as vermelhas câncer de ovário, peritoneo e trompas. (HARTMANN e LINDOR, 2016)

Algumas características já são bem conhecidas dos indivíduos que apresentam câncer de mama na síndrome HBOC. Depois de um primeiro câncer de mama, as portadoras de mutação nesses genes apresentam um aumento considerável de risco para um câncer de mama contralateral (variando de 8 a 20% nos 5 anos subsequentes do diagnóstico). Mais de 75% dos casos de câncer desenvolvidos em portadoras de mutação em *BRCA1* são triplo negativo (receptor de estrogênio, receptor de progesterona e HER2 negativos). E entre todos os tumores de mama triplo negativos de 7 a 28% são em portadoras de mutação em *BRCA1*. Ao contrário, os casos de câncer em portadoras de mutação em *BRCA2*, são mais semelhantes aos que

ocorrem na população geral, sendo em torno de 77% com receptor de estrogênio positivo e, apenas, 16% de triplo negativos. (HARTMANN e LINDOR, 2016)

Um resumo do manejo sugerido para indivíduos assintomáticos da Síndrome HBOC quanto a relação ao câncer de mama e ovário baseados nas recomendações do NCCN e da ESMO, encontra-se resumido na tabela 1 e 2 abaixo.

**Tabela 1** - Manejo clínico nas portadoras de mutações nos genes *BRCA 1* e *BRCA2*.

	Procedimento	Idade a começar	Frequência
Vigilância câncer de mama	Auto - exame	18 anos	Mensal
	Exame clínico	25 anos	1 - 2x ao ano
	RM contraste	25 - 75 anos	1x ao ano
	Mamografia	30 - 75 anos	1x ao ano
Vigilância câncer de ovário	Ecografia transvaginal?	30 anos	Sem evidência – A cada 6 meses
	Ca – 125?	30 anos	Sem evidência - 6m

Fonte: Baseado nas recomendações do NCCN e da ESMO.(PALUCH-SHIMON *et al.*, 2016; NCCN, 2018)

**Tabela 2** - Manejo cirúrgico nas portadoras de mutações nos genes *BRCA 1* e *BRCA2*.

Cirurgias Redutoras Risco	Procedimento	Idade a começar	Evidência
	Mastectomia redutora de risco		Discutir
	Salpingo - ooforectomia	35 – 40 anos:BRCA1 40 – 45 anos:BRCA2	Recomendar

Fonte: Baseado nas recomendações do NCCN e da ESMO. (PALUCH-SHIMON *et al.*, 2016; NCCN, 2018)

### 2.3 OS GENES BRCA1 E BRCA2

Em 1994 a Myriad Genetics anunciou a clonagem do *BRCA1*, que recebeu este nome três anos antes quando Mary-Claire King através da análise de ligação em famílias com casos precoces de câncer de mama, localizou um locus no cromossomo 17. Mais tarde, percebeu-se que famílias com alta incidência de câncer de mama masculino não tinham mutações no *BRCA1*, o que levou a investigação de outros genes de susceptibilidade ao câncer e à identificação do *BRCA2*. (MAKDISSI, 2004)

Os genes *BRCA* são estruturalmente complexos e encontram-se organizados ao longo de segmentos genômicos com aproximadamente 100 Kilobases. Sabe-se que os seus produtos protéicos normais estão envolvidos em processos celulares fundamentais, tais como a manutenção da integridade do genoma e regulação transcricional. (ASHTON-PROLLA e NETTO, 2015)

O gene *BRCA1* foi mapeado pela primeira vez no braço longo do cromossomo 17 (17q21) em 1990, e codifica uma fosfoproteína nuclear de 1863 aminoácidos, que contem o domínio RING (*Really Interesting New Gene finger*) cisteína enriquecido. Ele é composto por 24 éxons, dos quais 22 codificam uma proteína. (AMENDOLA e VIEIRA, 2005)

Por sua vez, o gene *BRCA2* encontra-se no braço longo do cromossomo 13 (13q12) e foi descoberto em 1994, codificando uma fosfoproteína de 3418 aminoácidos. Sua estrutura é ainda mais complexa, sendo composto por 27 éxons, dos quais 26 são codificantes. (AMENDOLA e VIEIRA, 2005)

Esses dois genes são supressores tumorais, estando envolvidos em mecanismos de reparação do DNA, tais como o mecanismo de recombinação homóloga e reparação de erros na dupla hélice acoplados à transcrição, ambos essenciais à manutenção da estabilidade genômica. Estas funções acontecem pelas interações desses dois genes com as proteínas envolvidas no reparo do DNA, tais como RAD51. (KORF e MIKHAIL, 2017)



As mutações herdadas são alelos dominantes no nível do indivíduo, mas são alelos recessivos no nível da célula (células heterozigotas não formam tumores). Indivíduos nascem heterozigotos, mas geralmente desenvolvem a doença após um segundo evento somático. Uma propriedade geral dos genes supressores de tumor é que eles normalmente bloqueiam a proliferação celular incontrolada que pode levar ao câncer. Geralmente, isto é feito pela participação nas vias que regulam o ciclo celular, como por exemplo através do reconhecimento de fosforilação. Inúmeros genes supressores de tumor codificam inibidores de cinases dependentes de ciclinas, que inativam as CDK e, assim, evitam que elas fosforilem as proteínas-alvo. Supressores de tumor também podem controlar a proliferação celular por intermédio de seus efeitos na transcrição ou interações célula-célula. (KORF e MIKHAIL, 2017)

Os riscos de câncer de mama e ovário variam de acordo com o tipo e a localização das mutações *BRCA1* ou *BRCA2*. Um estudo recente mostrou três regiões ligadas ao câncer de mama (*Breast cancer cluster regions - BCCRs*) localizadas em c.179 a c.505 (BCCR), c.4328 a c.4945 (BCCR), c.5261 a c.5563 (BCCR) e uma região ligada ao câncer de ovário (OCCR) de c.1380 a c.4062 (aproximadamente exon11), avaliando um total de 19.581 portadoras de mutações *BRCA1*. Essa população consistiu em 9052 mulheres (46%) com câncer de mama, 2317 (12%) com câncer de ovário, 1041 (5%) com câncer de mama e ovário e 7171 (37%) sem câncer. Com base em inúmeros estudos biológicos, as proteínas BRCA têm múltiplas funções nas células, e todas essas funções, não apenas a função de reparo do DNA, mas também outras novas funções de acordo com um relatório recente, podem estar ligadas à carcinogênese. (TAKAOKA e MIKI, 2018)

As proteínas BRCA desempenham importantes funções em diferentes processos celulares, incluindo a ativação e a regulação transcricional, o reparo de lesões no DNA, além do controle do ciclo celular, da proliferação e diferenciação celular. A função desses genes na

recombinação homologa e reparo de DNA é sugerida por uma forte interação bioquímica de suas proteínas com outras envolvidas nesse processo. (APOSTOLOU e FOSTIRA, 2013)

O gene *BRCA1* codifica uma fosfoproteína nuclear, a qual atua como gene supressor tumoral através da manutenção da estabilidade genômica. A proteína codificada se combina com outros supressores tumorais, sensores de danos do DNA, e transdutores de sinais, formando um grande complexo protéico com subunidades conhecido como complexo de vigilância do genoma associado a *BRCA1*. Outra função do desse gene é o controle do checkpoint e faz parte do complexo de vigilância do genoma associado do BRCA1 (BASC). Este complexo inclui proteínas tais como a NBS1, os complexos RAD50-MRE11, MLH1-PMS1 e MSH2-MSH6, a BLM e o fator C de replicação do DNA. As células com *BRCA1 e 2* funcionantes entram em apoptose após os pontos de checagem, mas células com BRCA1 e 2 defeituosas sobrevivem na presença de instabilidade genômica.(APOSTOLOU e FOSTIRA, 2013)

A expressão de mRNA de *BRCA1* e dos receptores de estrogênio estão estritamente ligados, sugerindo uma relação funcional entre os dois genes, *BRCA1* tem habilidade de regular a resposta celular aos estrogênios. (AMENDOLA e VIEIRA, 2005)

A presença de um domínio RING finger (domínio de ligação ao zinco) no gene BRCA1, que é frequentemente encontrado em proteínas de regulação transcricional, sugere que BRCA1 esteja envolvido na regulação transcricional. Contudo, sabe-se que os domínios RING finger são encontrados em um grande variedade de proteínas de diferentes funções, e é indicativa da interação proteína-proteína, além da interação com DNA.(AMENDOLA e VIEIRA, 2005)

Este complexo BRCA1-BARD1 funciona como uma ligase ubiquitina E3. O heterodímero é muito mais eficiente nesta atividade do que suas proteínas componentes. As mutações do domínio BRCA1 RING que o desvinculam do BARD1 e anulam sua atividade da ligase E3 são frequentemente associadas à predisposição ao câncer. Uma mutação BRCA1

RING (C61G) associada ao câncer que reduz a atividade da ligase E3 e a ligação BARD1 é importante para a supressão do câncer de mama. (TAKAOKA e MIKI, 2018)

A ineficiência de células deficientes em BRCA para lidar corretamente com regiões de replicação de DNA alterados corrobora sua sensibilidade às quimioterapias clássicas de câncer que se baseiam na replicação. Esses fármacos incluem agentes de bloqueio de replicação ou de reticulação bem estabelecidos, tais como compostos de platina, que estão demonstrando promessa clínica em pacientes com câncer deficientes em *BRCA1*. Recentemente, os inibidores da enzima poli (ADP) -ribose polimerase1 (PARP1) foram desenvolvidos para o tratamento de câncer de ovário e mama associado à mutação *BRCA1/2*. PARP1 promove o reparo de quebras de DNA de uma única cadeia não tóxicas (ssDNA) por reparo de excisão de base. Os inibidores de PARP1 (PARP1i) bloqueiam esta via de reparo do DNA, desencadeando o colapso de garfos de replica paralisados, levando à persistência de lesões de DNA normalmente reparadas por recombinação homóloga. Muitos PARP1i mostraram excelente eficácia em estudos laboratoriais de células mutantes BRCA deficientes em RH. (TAKAOKA e MIKI, 2018)

Em ensaios clínicos de PARP1i altamente potente, os resultados estimulantes e decepcionantes foram relatados. A otimização adicional dos regimes de tratamento e a melhor seleção de pacientes são necessárias para maximizar seu potencial em cada terapia. Há três questões importantes a serem consideradas. Primeiro, no caso de pacientes que mantêm um alelo *BRCA2* de tipo selvagem, os tumores gerariam nova resistência primária ao PARP1i e provavelmente não se beneficiariam com os medicamentos. Em segundo lugar, um tumor deficiente em *BRCA* com instabilidade cromossômica pode ter maior risco de novas mutações que adquiram resistência ao tratamento secundário, incluindo reversões que restauram parcialmente a função de recombinação homóloga inativa. Finalmente, a recombinação homóloga diminuída (mas não ausente) nos tecidos somáticos não tumorais de portadores de

mutação *BRCA* poderia potencializar a toxicidade de regimes combinando PARP1i com drogas antituberculosas clássicas ou tratamento PARP1i de longo prazo. (TAKAOKA e MIKI, 2018)

O gene *BRCA2* está envolvido na manutenção da estabilidade genômica e, mais especificamente, com a via da recombinação homóloga. Essa via repara quebras/ danos da dupla fita do DNA. A maioria das mutações são *frameshifts* (quando ocorre inserção ou deleção de um ou 2 pares de bases numa sequência codificadora de proteína, alterando a matriz de leitura). (APOSTOLOU e FOSTIRA, 2013)

#### 2.4 OUTROS GENES ASSOCIADOS A CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO

Historicamente, o risco de câncer de mama e ovários hereditários (HBOC) foi associado a mutações no gene *BRCA 1* (*breast cancer 1*) e *BRCA 2* (*breast cancer 2*). No entanto, é estimado que mais da metade dos indivíduos que preenchem critérios de HBOC para testar os genes *BRCA 1* e *BRCA2* segundo o NCCN 2018 são portadores de variantes patogênicas em outros genes. Câncer de mama é também um componente de várias outras síndromes. Já está bem estabelecido que mulheres que carregam mutações patogênicas nos seguintes genes: em *TP53* (*tumor protein 53*), *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*), *STK11* (*serine/threonine kinase 11*) e *CDH1* (*cadherin 1*) têm um risco aumentando de desenvolver câncer de mama ao longo da vida. Mutações em outros genes *ATM* (*ataxia telangectasia mutated*), *CHECK2* (*checkpoint kinase 2*) e *PALB2* (*partner and localizer of BRCA2*) também causam um risco alto a moderado para câncer de mama. (BUYS *et al.*, 2017)

Testes genéticos permitem pacientes com riscos de câncer aumentado a receber manejo médico apropriado que pode diminuir riscos de desenvolver a doença para o próprio indivíduo e para seus familiares. (BUYS *et al.*, 2017)

A síndrome de Li Fraumeni (SLF) é um síndrome autossômica dominante de predisposição a vários tipos de câncer, especialmente sarcomas, tumores do sistema nervoso central, leucemias, tumores de mama e tumores adrenocorticais em idade jovem. Estima-se uma prevalência de 1:5000 indivíduos da população geral. No Brasil, especialmente na região sul e sudeste, há evidências de que uma mutação no mesmo gene causador da SLF, com uma penetrância reduzida quando comparada as mutações clássicas de TP53 e um espectro de tumor diferenciado, acomete em torno de 1:300 indivíduos dessa população. Enquanto na SLF clássica o câncer de mama se apresenta em idade extremamente jovem (mais usual antes dos 30 anos), na mutação mais comum nessa região do Brasil, os estudos apontam para câncer de mama em idade não tão jovem (em torno dos 40 anos). (ANDRADE *et al.*, 2016; MACEDO *et al.*, 2016) Na Síndrome de Li-Fraumeni clássica, o risco de uma pessoa desenvolver câncer é cerca de 90% até os 70 anos de idade.(BALLINGER *et al.*, 2017)

Os riscos e benefícios de estratégias de rastreamento e prevenção na SLF para mulheres são: mamografia anual a partir dos 20-25 anos, ressonância mamária com contraste anual dos 20 aos 75 anos, mamografia anual intercalando com a ressonância dos 30 aos 75 anos. Deve-se discutir benefícios de mastectomia redutora de risco. Para homens e mulheres deve-se realizar exame clínico anual a partir dos 20-25 anos direcionado para a detecção dos tumores mais comuns. Nos casos de crianças, devido a alta prevalência de alguns tumores infantis nessa síndrome, as mesmas devem ser testadas com o benefício de rastreamento, detecção precoce e melhora de sobrevida dos tumores infantis de alta prevalência, como por exemplo o tumor adreno-cortical. Existem estudos demonstrando benefício de rastreamento com “ressonância de corpo inteiro” com um protocolo bem estabelecido resultando em diminuição de mortalidade.(BALLINGER *et al.*, 2017; NCCN, 2018)

Mutações germinativas no gene *PTEN* são causadoras da síndrome de Cowden. Essa é um síndrome autossômica dominante caracterizadas por múltiplos hamartomas com alto risco

de tumores malignos e benignos da tireóide, mama e endométrio. Lesões mucocutâneas, anormalidades na tireóide, doença fibrocística e macrocefalia também podem ser critérios diagnósticos. Indivíduos afetados tem risco ao longo da vida de desenvolver câncer de mama de 50%, câncer de tireóide de 10% e 5 a 10% de desenvolver câncer de endométrio. Mais de 90% dos indivíduos com síndrome de Cowden irão expressar alguma manifestação clínica até os 20 anos. (APOSTOLOU e FOSTIRA, 2013)

A síndrome de Peutz-Jeghers é causada por mutação germinativa no gene *STK11*. Também é um síndrome autossômica dominante e é caracterizada por sintomas clínicos como pigmentação mucocutânea e polipose hamartomatosa. Além de um risco elevado de câncer gastrointestinal, também apresenta um risco aumentado de outros cânceres como: mama, intestino, pâncreas, ovário, útero, estômago, colo uterino, pulmão e testículo foram descritos. (APOSTOLOU e FOSTIRA, 2013; NCCN, 2018)

A síndrome do câncer gástrico difuso hereditário é causada por mutações no gene *CDH1*, e frequentemente, é associada com histologia de células de anel de sinete. As pacientes acometidas por essa síndrome apresentam um risco elevado de câncer gástrico, câncer de mama do tipo lobular e câncer colo-retal. (APOSTOLOU e FOSTIRA, 2013)

Avaliações de risco e estratégias de detecção precoce em indivíduos com mutações nos genes relacionados a HBOC estão sendo extensivamente estudados. No entanto, se sabe muito menos sobre o manejo em portadores de mutações em genes menos comum de alta penetrância (*PTEN*, *STK11*, *CDH1*), e, menos ainda sobre o manejo em portadores dos genes de moderada-alta penetrância (*PALB2*, *CHECK2*, *ATM*, *NF1*, *RAD51D*, *BRIP1*). Com a introdução dos testes de painéis de genes na prática clínica, teremos mais pacientes portadores de mutações identificados. O quadro 1 abaixo, baseado no NCCN 2018 para pacientes de alto risco genético de câncer de mama e ovário, nos auxilia como manejar esses pacientes.

**Quadro 1 - Manejo para mama e ovário baseado nos resultados de testes genéticos.**

GENE	MANEJO PARA CÂNCER DE MAMA	MANEJO PARA CÂNCER DE OVÁRIO	MANEJO PARA OUTRAS NEOPLASIAS
<i>PTEN</i>	-MMG anual e RM a partir 30 anos  -MRR: considerar de acordo com história familiar	Sem risco elevado	Endométrio, tireóide, intestino, rim: encaminhar para especialista
<i>STK11</i>	-MMG anual e RM  -MRR: considerar de acordo com história familiar	Risco aumentado para câncer de ovário não epitelial	Câncer Intestino, gástrico, pâncreas, útero, pulmão entre outros: encaminhar para especialista
<i>CDH1</i>	Risco elevado para cancer lobular  -MMG anual e considerar RM a partir 30 anos  -MRR: considerar de acordo com história familiar	Sem risco elevado	Câncer gástrico difuso: encaminhar para especialista
<i>PALB2</i>	-MMG anual e considerar RM a partir 30 anos  -MRR: considerar de acordo com história familiar	Evidência insuficiente	Evidências insuficientes
<i>CHEK2</i>	-MMG anual  -Considerar RM a partir 40 anos  -MRR: considerar de acordo com história familiar	Sem risco elevado	Câncer de intestino: encaminhar para especialista
<i>ATM</i>	- MMG anual  -Considerar RM a partir 40 anos  - MRR: considerar de acordo com história familiar	Sem risco elevado	Evidências insuficientes: pâncreas e prostata
<i>NF1</i>	-MMG anual a partir 30 anos  -Considerar RM dos 30- 50 anos  -MRR: considerar de acordo com história familiar	Sem risco elevado	GIST, tumores malignos de nervo periférico: encaminhar para especialista
<i>RAD51C/D</i>	Evidência insuficiente	Considerar SORR aos 45-50 anos.	-
<i>BRIP1</i>	Sem risco elevado	Considerar SORR aos 45-50 anos.	
<i>MSH2</i> <i>MLH1</i> <i>MSH6</i> <i>PMS2</i> <i>EPCAM</i>	Evidência insuficiente:  Se basear na história familiar	Risco elevado:  Considerar SORR	Câncer de intestino, endométrio, gástrico, pâncreas e outros:  Encaminhar para especialista

Fonte: Adaptado do NCCN versão 2018.

Notas: MMG = mamografia, RM= ressonância mamária, MRR= mastectomia redutora de risco, SORR= salpingo-ooforectomia redutora de risco

Interesse especial nesta dissertação encontra-se na relação do gene *NF1* e câncer de mama, devido ao relato de caso do artigo três. Pacientes com neurofibromatose possuem manifestações clínicas muito variadas, sendo manchas café com leite e neurofibromas as manifestações mais comumente encontradas. Indivíduos com neurofibromatose têm maior probabilidade de desenvolver câncer ao longo da vida, quando comparados com a população geral (risco ao longo da vida de desenvolver câncer de 59,6% em pacientes com mutação em *NF1* versus 30,8% na população geral). Dois estudos populacionais associam como principais neoplasias relacionadas a esse gene: neoplasia maligna de bainha do nervo periférico, tumores do tecido conjuntivo, tumor cerebral (principalmente gliomas) e câncer de mama em idade jovem. (USITALO *et al.*, 2016; WALKER *et al.*, 2006)

Pacientes com neurofibromatose com menos de 50 anos possuem um risco 4 a 5 vezes maior de desenvolver câncer de mama, e um risco 3 vezes maior de morrer pelo câncer. Um grande número de tumores de mama esporádicos seqüenciados reportam mutação no gene *NF1*, o que pode ser uma terapia alvo potencial no futuro. (PHILPOTT *et al.*, 2017). O câncer de mama em pacientes com neurofibromatose está mais associado a um prognóstico desfavorável, com receptores hormonais negativos e *HER2* amplificado. Quando comparadas com pacientes da mesma idade, estadiamento e status dos receptores de estrogênio e Her 2 as pacientes com mutação no gene *NF1* tiveram pior sobrevivência. (USITALO, *et al.*, 2017)

Além das mutações nos genes citados acima, inúmeros loci moleculares com variações foram associados com um discreto aumento ou proteção ao câncer de mama. Uma variação em um único nucleotídeo numa sequência do DNA (pode ser em região não codificadora) que ocorre em mais de 1% da população e não sendo causadora de doença (pode estar associado a patologias) é chamada de polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs, do inglês: single-nucleotide polymorphism). Essas variantes podem seguir o modelo poligênico ou ambiental, para causar uma pequena fração de câncer de mama familiar. A maioria foi estudada nos grandes



trabalhos de pesquisa de genoma (GWAS – *genome wide association studies*). No risco de avaliação final de câncer de mama, 6 SNPs (poliformismo de um único nucleotídeo) foram associados com significância estatísticas: *MAP3K1*, *FGFR2*, *LSP1*, *TNRC19*, *H19* e *CASP8*. A associação de SNPs pode ser uma hipótese do motivo de uma mesma mutação patogênica ter uma penetrância diferente em famílias com predisposição hereditária ao câncer. (APOSTOLOU e FOSTIRA, 2013) .

Avaliação genética cada vez mais está fazendo parte no manejo inicial da mulher com diagnóstico de câncer de mama e ovário e dos indivíduos com risco elevado para esses cânceres. O aconselhamento genético foi incorporado nos cuidados oncológicos para auxiliar as estratégias de manejo e tratamento. Quanto mais informações soubermos sobre as síndromes genéticas e suas relações com câncer e fatores ambientais, mais individualizados e com melhores resultados serão os manejos dos indivíduos portadores de mutação.

## 2.5 ACONSELHAMENTO GENÉTICO EM ONCOGENÉTICA

O aconselhamento genético (AG) é um processo no qual são fornecidas ao paciente e seus familiares, informações sobre a natureza, o modo de herança e as implicações de ser portador da doença genética em questão, com o intuito de auxiliá-los no processo de tomada de decisões médicas e/ou pessoais. Além disso, quando a investigação envolve realização de teste genético, este divide-se em AG pré-teste e AG pós-teste. (ASHTON-PROLLA e NETTO, 2015) A *National Society of Genetic Counselors* define o AG como “ um processo de ajudar pessoas a entenderem e adaptarem as contribuições genéticas para doenças com suas implicações médicas, psicológicas e familiares”. Dessa forma, se torna a chave principal na avaliação para uma possível risco de câncer hereditário e deve ser realizado por um profissional treinado para tal e com experiência na área de genética e oncologia. (STANISLAW *et al.*, 2016)

O aconselhamento genético em câncer difere do aconselhamento genético "tradicional" de várias maneiras. Pacientes que procuram aconselhamento genético em câncer raramente estão preocupados com decisões reprodutivas, que são muitas vezes o foco principal no aconselhamento genético "tradicional"; em vez disso, estão buscando informações sobre as chances – suas e de parentes – de desenvolver câncer. Além disso, os riscos calculados não são absolutos, mas podem mudar ao longo do tempo, à medida que as histórias familiar e pessoal mudam e o paciente envelhece. As opções de redução de risco disponíveis frequentemente são radicais (por exemplo, a quimioprevenção ou cirurgia profilática) e não são apropriadas para todos pacientes e para todas as idades. O acompanhamento e o manejo devem ser ajustados para a idade do paciente, desejo reprodutivo, status menopausal, categoria de risco, acesso a programas de rastreamento e preferências pessoais. Os planos de vigilância e de manejo também devem ser adaptados à idade do paciente, o estado, status menopausal, categoria de risco, a facilidade de triagem, e preferências pessoais, as quais provavelmente modificarão ao longo da vida do paciente. (BONADIES *et al.*, 2011)

O AG em oncologia irá englobar anamnese com história familiar completa, realização de heredograma com informações de idade de acometimento e tipo de câncer dos familiares, coleta de dados de característica do câncer do paciente (se presente), exame físico incluindo perímetro cefálico e observação de lesões cutâneas, expectativas do paciente diante da consulta e de possíveis exames, além de explicação sobre os tipos de exames, possíveis resultados e possíveis manejos. (STANISLAW *et al.*, 2016; NCCN, 2018) Além disso, na consulta poderá ser realizado modelos matemáticos de cálculo de risco de câncer individualmente, resultado em condutas de aconselhamento diferenciadas de acordo com os resultados. Pode, também, ser calculada a probabilidade do paciente ser portador de mutação em *BRCA1/2*. (NCCN, 2018)

O teste genético para análise de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* é oferecido em um contexto clínico para indivíduos previamente identificados como possuindo alto risco para

síndrome HBOC, assim como para familiares de indivíduos com uma mutação previamente identificada nos genes em questão. Os critérios de identificação de testagem diferem muitas vezes de uma sociedade para outra em alguns detalhes variando apenas na sensibilidade que se deseja ao testar. O NCCN apresentam as recomendações mais amplas. Essas recomendações encontram-se resumidas no quadro 2 e na íntegra no anexo.

Em relação aos tipos de exames a serem oferecidos, o seqüenciamento direto por método de Sanger é a técnica tradicionalmente empregada para diagnóstico de mutações pontuais nessas síndromes. Devido ao alto custo e intenso trabalho exigido para o seqüenciamento completo desses genes, uma nova tecnologia vem sendo implementada em vários centros e está gradualmente substituindo o seqüenciamento direto, o chamado seqüenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing* -NGS). Essa tecnologia é altamente sensível, específica e é menos custosa. No entanto, requer ampla validação e treinamento em bioinformática para interpretação de dados gerados. Uma proporção entre 5 e 30% das famílias com características típicas da síndrome HBOC podem ter mutações do tipo rearranjos gênicos que não são detectadas pelo seqüenciamento Sanger e nem por algumas plataformas de NGS. Esses rearranjos podem ser deleções ou duplicações de grandes porções de um dos genes e devem-se principalmente a eventos de recombinação desigual entre sequências repetitivas de DNA como as sequências *Alu*. Técnicas específicas para detecção de rearranjos (p. ex MLPA) devem ser utilizadas nos casos suspeitos de HBOC que tenha um resultado negativo de seqüenciamento realizado por uma técnica que não cobre rearranjos.(ASHTON-PROLLA e NETTO, 2015)

**Quadro 2** - Quando referenciar para avaliação genética de HBOC.

<b>INDIVÍDUO AFETADO COM 1 OU MAIS DOS SEGUINTE ACHADOS:</b>	<b>INDIVÍDUO NÃO AFETADO COM CÂNCER COM UM OU MAIS DOS SEGUINTE ACHADOS:</b>
Câncer de ovário de origem epitelial em qualquer idade	> ou = 2 tumores primários na mama, sendo em 1 indivíduo ou em 2 indivíduos diferentes do mesmo lado da família (ou materno ou paterno)
Mutação conhecida na família relacionada a câncer	Familiar de até terceiro grau com: -> > ou = 1 cancer de ovário -> cancer de mama masculino -> mutação patogênica conhecida -> > ou = 2 tumores primários na mama, sendo em 1 indivíduo ou em 2 indivíduos diferentes do mesmo lado da família (ou materno ou paterno), com pelo menos 1 antes dos 50 anos
Câncer de mama triplo negativo em idade igual ou inferior a 60 anos	> ou = 1 parente de primeiro ou segundo grau: com cancer de mama antes dos 45 anos
Idade jovem para câncer de mama (por ex, testagem do gene <i>BRCA</i> é sugerida quando igual ou inferior a 45 anos ou abaixo de 50 anos se história familiar desconhecida)	-> História familiar de 3 ou mais (incluindo múltiplos primários num mesmo indivíduo): -cancer de tireóide; cancer de endométrio -cancer gástrico difuso; cancer adrenocortical -cancer de pâncreas; sarcoma -alterações dermatológicas e/ou macrocefalia -leucemia; linfoma -melanoma; cancer de próstata (gleason >7) -carcinoma adrenocortical; cancer de rim -pólipos harmatomoso trato gastrointestinal -cancer de intestino
Dois cânceres de mama primários (concomitantes ou não, ipsilateral ou contralateral), sendo um deles abaixo dos 50 anos	
Câncer de mama masculino	
Descendência judia Ashkenazi, com câncer de mama, ovário ou pancreático em qualquer idade	
Câncer de mama em qualquer idade e: -> > ou = 1 parente de até terceiro grau com câncer de mama antes 50 anos ou -> 1 parente de até terceiro grau com câncer de ovário epitelial -> > ou = a 2 parentes de até terceiro grau com cancer de mama e/ou pancreático -> câncer pancreático -> populações de risco aumentado – os critérios podem ser adaptados	
História pessoal de câncer de mama (invasor ou cdis) ou familiar de 3 ou mais, incluindo múltiplos primários no mesmo indivíduo: -> cancer de tireóide; cancer de endométrio -> cancer gástrico difuso; cancer adrenocortical -> cancer de pâncreas; sarcoma -> alterações dermatológicas e/ou macrocefalia -> leucemia; linfoma; cancer de intestino -> melanoma; cancer de próstata (gleason >7) -> carcinoma adrenocortical; cancer de rim -> pólipos harmatomoso trato gastrointestinal	

Fonte: Baseado no NCCN 2018.

Um dos aspectos mais cruciais dos testes de DNA é a interpretação acurada dos resultados. Estudos demonstram que profissionais de saúde não infreqüentemente têm dificuldades em interpretar um heredograma básico e resultados de testes genéticos, causando uma interpretação equivocada dos resultados. A interpretação dos resultados está ficando mais complexa a medida que mais testes com mais genes estão ficando disponíveis. Sequenciamento de exoma de famílias BRCA (aquelas com critérios clássicos para HBOC porém com testagem BRCA negativo) incluem o achado comum de mutações em outros genes não relacionados a câncer de mama. Na era de diagnóstico de precisão, interpretação da relevância de mutações de significado clínico desconhecido é um desafio. Além disso, estratégias éticas e sociais estão evoluindo quando utilizamos teste pré implantacionais de embriões para seleção desses sem mutações familiares patogênicas conhecidas. (GRAFFEO *et al.*, 2016)

## 2.6 RESULTADOS DOS TESTES GENÉTICOS

Os possíveis resultados para testes moleculares relacionados a câncer hereditários em relação a mutações encontradas são: patogênico, provavelmente patogênico, benigno, provavelmente benigno e variante de significado incerto. (RICHARDS *et al.*, 2015)

Um resultado negativo significa que não foi detectada nenhuma mutação deletéria através de determinado método no(s) gene(s) estudado. No entanto, não significa que o indivíduo testado não possua mutação patogênica em outro gene que possa aumentar seu risco para desenvolvimento de câncer. Há dois tipos de resultados negativos: o negativo não informativo e o resultado verdadeiro negativo.

Um resultado negativo deve ser interpretado no contexto da história familiar: se um paciente de uma família com mutação já determinada é negativo para aquela mutação, ele não herdou a mutação que existe na família e passa a ter um risco de câncer comparável ao da

população geral. Porém, se nenhuma mutação é encontrada em uma família de risco após análise dos genes, não se pode excluir aumento na predisposição hereditária ao câncer por mutação em outro gene de predisposição que não tenha sido estudado. Nesses casos, a estimativa de risco é empírica e se baseia na história familiar. (ASHTON-PROLLA e NETTO, 2015)

Um resultado negativo verdadeiro ocorre quando o indivíduo é testado para uma mutação patogênica que se sabe estar presente num membro próximo de sua família e o resultado do teste é negativo para essa mutação. Neste último caso, o indivíduo não é classificado como tendo um risco aumentado, sendo seu risco semelhante ao da população geral. (ASHTON-PROLLA e NETTO, 2015)

Um resultado positivo indica que foi detectada uma mutação deletéria num gene que confere um risco mais elevado de desenvolvimento de câncer de mama, independentemente de ter sido identificada ou não uma mutação na família. Num indivíduo assintomático, esse resultado implicará em medidas de rastreamento e condutas redutoras de risco de acordo com cada mutação.(NCCN, 2018) Um variante provavelmente patogênica deve ser manejada como se fosse uma variante patogênica.

Apesar do aconselhamento genético dever ser não diretivo, estimulando decisões livres e informadas por parte dos consultantes, os portadores de mutações patogênicas deverão ser ativamente estimulados a comunicar o resultado aos seus familiares mais próximos para alertar a eventualidade de um risco elevado de câncer e da possibilidade de evitar ou detectar precocemente. Trabalhos de custo efetividade demonstram benefício em redução de custo e aumento de sobrevida em pacientes acometidas por câncer e, principalmente, em importante redução de custo quando se identifica portadores assintomáticos.(ECCLESTON *et al.*, 2017; TUFFAHA *et al.*, 2018)

Além dos resultados positivos e negativos, um teste genético pode ainda ter como resultado uma variante de significado incerto (VUS). Neste caso, é detectada uma mutação no gene, desconhecendo se esta representa uma variante do normal, ou se altera significativamente a função do gene, podendo aumentar o risco de câncer. Nem sempre é possível definir rapidamente o significado destas variantes através de base de dados internacionais ou estudos em animais/ *in silico*. Nesses casos, a estimativa de risco também será feita com base na história familiar, podendo-se optar por testar outros familiares afetados e normais a fim de verificar a presença ou não de uma associação entre a alteração em questão e o surgimento do câncer.(ASHTON-PROLLA e NETTO, 2015)

Todos os clínicos que propõem testes genéticos devem comunicar os seus resultados e as opções de seguimento disponíveis para seus familiares. Durante o aconselhamento pós teste, são expostos, explicados e interpretados ao indivíduo, caso a caso, os resultados dos testes genéticos de uma forma cuidadosa, sempre considerando e abordando as preocupações do paciente. Depois do resultado, é importante assegurar-se de que o paciente entendeu os resultados e as recomendações. A boa prática sugere que seja entregue um laudo escrito com as informações de resultados e possibilidades de tratamento / seguimento.(STANISLAW *et al.*, 2016)

## 2.7 MULHERES BRASILEIRAS COM A SÍNDROME DO CÂNCER DE MAMA E O OVÁRIOS HEREDITÁRIOS

No Brasil são estimados 59.700 mil novos casos de câncer de mama em 2018, (INCA, 2018) e essa doença é a primeira causa de morte por câncer em mulheres de todas as idades, especialmente em mulheres abaixo de 50 anos. Em Porto Alegre, capital no Rio Grande do Sul

e capital com maior incidência de câncer de mama no Brasil, são calculados 114,25 novos casos por 100.000 habitantes.(INCA, 2018)

Como já citado anteriormente, em torno de 10% de todos os casos de câncer de mama são hereditários, causados por mutação germinativa em genes de alta penetrância. Desses, as mutações mais prevalentes são nos genes *BRCA*. Os dados publicados resultam em mais de 3000 mutações germinativas, polimorfismos e variantes descritos nesses genes. A maioria são mutações de ponto, pequenas inserções ou deleções. Alguns estudos no Brasil publicaram resultados de algumas mutações específicas ou alguns subgrupos, mas a prevalência estimada de mutações nos genes *BRCA* na população brasileira, segue desconhecida. (PALMERO *et al.*, 2016)

Inúmeras dificuldades para identificação e aconselhamento de indivíduos em risco têm sido identificadas no Brasil e incluem: poucos serviços de aconselhamento genético, número ainda pequeno de profissionais capacitados para realizar aconselhamento genético, indisponibilidade dos testes genéticos para pacientes do SUS, treinamento insuficiente de profissionais de saúde para identificar os pacientes em risco com desconhecimento destes profissionais sobre a relevância da identificação de casos com câncer de mama hereditário, desconhecimento da população sobre o assunto, dificuldade de acesso a centros especializados entre outros. (ASHTON-PROLLA *et al.*, 2009; PALMERO *et al.*, 2016) A rede nacional de câncer familiar no Brasil, coordenada pelo INCA, é composta por apenas 11 centros brasileiros distribuídos conforme figura abaixo. (INCA, 2018)





**Figura 4.** Centros da Rede Nacional de Câncer Familiar no Brasil. Segundo INCA (2014).

Em relação à prevalência de mutações em *BRCA* no Brasil, os dados ainda são limitados. Dependendo dos critérios de seleção utilizados e da metodologia empregada, as frequências relatadas nos estudos variam de 2,3 a 22%. Um estudo de prevalência sobre pacientes testadas geneticamente para câncer de mama hereditário no Brasil foi publicado em 2016. Baseados numa coorte de 9234 mulheres assintomáticas em unidade básica de saúde no ano de 2004 iniciada em Porto Alegre. Dessas 9234, 1247 (13,9%) preenchem critérios para serem referenciadas a um centro de aconselhamento genético. Novecentos e duas compareceram, efetivamente, e, apenas 214 mulheres de 183 famílias preenchem pelo menos um critério que indicasse testagem para alguma síndrome de câncer de mama hereditário (65 para síndrome HBOC). Dessas 214, 64 (29,9% correspondendo a 50 famílias) decidiram prosseguir com a investigação genética. Dezenove indivíduos de 18 famílias com critérios para testar os genes *BRCA1* e *BRCA2* realizaram seqüenciamento e MLPA. Foi encontrada uma mutação deletéria

em *BRCA2*, 2 variantes consistentes como VUS e nenhuma variante foi detectada por MLPA. (PALMERO *et al.*, 2016) A prevalência de mutações na população brasileira não foi estudada ainda em um grupo significativo de pacientes. Diversos estudos com amostragem pequena como a acima descrevem prevalência diversas, variando de acordo com o grupo e os critérios utilizados. Conforme discussão do próprio estudo, a pequena amostragem de pacientes que testou *BRCA* e aspectos culturais da população estudada e baixa escolaridade podem ser associados como uma limitação à compreensão dos benefícios e implicações da testagem. As pacientes recrutadas na coorte originaram de um centro primário de saúde, assintomáticas e, originalmente, não estavam preocupadas com risco de câncer genético ou motivadas a consultar sobre aconselhamento genético. (PALMERO *et al.*, 2016)

Quanto à análise de rearranjos em *BRCA1* e *BRCA2* detectadas por MLPA, recente estudo em 145 indivíduos detectou uma taxa de 3.44% de frequência na população estudada. Essa população era de pacientes não relacionados entre si das cidades de Porto Alegre, Rio de Janeiro e Salvador. (EWALD *et al.*, 2016)

O estudo com maior amostragem publicado sobre população brasileira em relação a testagem de *BRCA* envolveu 418 indivíduos não relacionados, a maioria de Porto Alegre (94,6%), sendo 79% de pacientes com câncer de mama e apenas 8% de pacientes com câncer de ovário, 13% eram indivíduos não afetados por câncer mas que preenchiam critérios segundo NCCN para testagem. Oitenta e três variantes patogênicas foram identificadas em 80 dos 418 probandos, representando uma prevalência de 19,1%. Entre pacientes afetadas com câncer de mama e ovário, a prevalência foi de 19,7% e 37,8%. Esse estudo não representa a população brasileira apesar de ser o de maior amostragem, uma vez que inclui apenas indivíduos de uma mesma região do país, ainda que seja a capital de maior incidência. (ALEMAR *et al.*, 2017)

Outro estudo publicado em 2016 envolveu uma população de 349 probandos de uma única instituição (Hospital do Câncer de Barretos), porém a amostragem era composta por

indivíduos de diversos estados brasileiros. A maioria dos indivíduos vieram da região Sudeste (71,6%), seguido da região Centro-Oeste (18,3%), Norte (7,2%), Nordeste e Sul do país com apenas 1,4% da amostragem. Nesse trabalho também foi realizado estudo de ancestralidade, demonstrado a grande variação genética da população brasileira que recebeu diversas imigrações no período de colonização. A proporção desse grupo foi: 70,6% de Europeus, 14,5% de Africanos, 8% de Nativos Americanos e 6,8% de Asiáticos do Leste. Dessa amostragem, 21,5% eram mutados BRCA1/2 e 39 das 44 mutações patogênicas identificadas não haviam sido previamente reportadas na população brasileira. (FERNANDES *et al.*, 2016) Previamente a esse estudo, apenas 2 artigos haviam sido publicados sobre a população brasileira envolvendo a análise de toda região codificadora dos genes *BRCA1* e *BRCA2*: o estudo publicado por Carraro e colaboradores que examinou 54 mulheres com câncer de mama abaixo dos 35 anos, o estudo publicado por Silva e colaboradores que examinou 120 mulheres, sendo o respectivo percentual de mutações patogênicas encontradas de 20,4% e 22,5%.(CARRARO *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2014)

Segundo pesquisa do Ministério da Saúde juntamente com IBGE, 71% da população brasileira depende do sistema público de saúde e, portanto, não têm acesso a testes genéticos. (IBGE, 2013). Assim, os perfis moleculares nacionais e regionais das famílias com o fenótipo HBOC permaneceram em grande parte desconhecidos. Embora vários estudos envolvendo sujeitos brasileiros tenham sido publicados, a maioria não incluiu o seqüenciamento de toda a região de codificação e o teste de rearranjo de *BRCA1* e *BRCA2*. (ALEMAR *et al.*, 2017)

### **3 JUSTIFICATIVA**

No Brasil, existem poucas publicações analisando os dados epidemiológicos das pacientes com câncer de mama, especialmente aquelas em risco para câncer hereditário. A identificação de pacientes neste grupo específico é fundamental uma vez que esses indivíduos e seus familiares podem se beneficiar de medidas de rastreamento intensivo, quimioprevenção e cirurgias profiláticas. Este conjunto de procedimentos possibilita o diagnóstico precoce do câncer e pode reduzir o risco de desenvolvimento de tumores modificando a história natural da doença.

A realização deste projeto de pesquisa se justifica pela necessidade de conhecer o perfil dos pacientes diagnosticados com câncer de mama e com necessidade de avaliação para síndromes hereditárias.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir para a caracterização molecular e clínica e para a identificação de pacientes com a Síndrome HBOC no Brasil.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- (I) Descrever a frequência de pacientes que necessitariam de análise molecular dos genes *BRCA1* e *BRCA2* em uma instituição específica arroladas no estudo multicêntrico AMAZONA III.;
- (II) Descrever a prevalência de mutações patogênicas e VUS em *BRCA 1* e *BRCA2* em uma série de casos de câncer de mama metastático do Rio Grande do Sul;
- (III) Descrever uma paciente com câncer de mama em idade muito jovem, portadora de mutações germinativas em *BRCA2* e *NFI*, avaliando a contribuição de perda de heterozigosidade no câncer de mama para um possível efeito de antecipação da idade ao diagnóstico.

## **5 RESULTADOS EM FORMATO DE ARTIGO**

### **5.1 ARTIGO 1: A SER SUBMETIDO NA REVISTA MASTOLOGY**

#### **PREVALÊNCIA DE PACIENTES COM INDICAÇÃO DE ANÁLISE MOLECULAR GENÉTICA PARA SÍNDROME DO CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO HEREDITÁRIOS NO ESTUDO AMAZONA III ATENDIDAS EM UM HOSPITAL DO SUL DO BRASIL, CONSIDERANDO APENAS 3 CRITÉRIOS DE INDICAÇÃO DE TESTAGEM.**

Alessandra Borba Anton de Souza<sup>1,2</sup>, Carlos Barrios<sup>3</sup>, Gustavo Werutsky<sup>3</sup>, Nathalia da Cunha Rossato<sup>4</sup>, Isabela Albuquerque Miranda<sup>4</sup>, Antonio Frasson<sup>1</sup>, Patrícia Ashton-Prolla<sup>2,5</sup>

<sup>1</sup> Centro de Mama do Hospital São Lucas da PUCRS

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

<sup>3</sup> Pesquisador Centro de Pesquisa em Oncologia do Hospital São Lucas da PUCRS

<sup>4</sup> Cursista de mastologia do Hospital São Lucas da PUCRS

<sup>5</sup> Departamento de Genética – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

## RESUMO

**Objetivo:** O câncer de mama é o mais incidente na população feminina mundial e brasileira, excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma. No Brasil, estima-se o número de 59 mil novos casos em 2018, dos quais cerca de 20 a 30% serão de origem familiar. No Brasil, existem poucas publicações analisando os dados epidemiológicos nacionais, especialmente aquelas em risco para câncer hereditário. O estudo Projeto Amazonas III tem como objetivo geral descrever a epidemiologia do câncer de mama numa amostra população brasileira incluindo 3.000 pacientes de 24 hospitais brasileiros. O objetivo do presente estudo é avaliar a prevalência de pacientes com câncer de mama arroladas para o estudo Amazona III em um centro específico que tenham indicação para avaliação genética considerando alguns critérios para a síndrome de câncer de mama e ovário hereditários (*hereditary breast and ovarian cancer syndrome* – HBOC).

**Métodos:** Esse é um estudo observacional, transversal, de prevalência. Todas as pacientes femininas com câncer de mama invasor com mais de 18 anos no Hospital São Lucas da PUCRS recrutadas de maio de 2016 até fevereiro de 2018 para o Projeto Amazona III foram consideradas elegíveis. Os critérios utilizados para selecionar as pacientes que deveriam ser encaminhadas para testagem genética foram extraídos da diretriz do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) 2018 e incluem: a idade do diagnóstico abaixo dos 45 anos, diagnóstico de câncer de mama triplo negativo abaixo de 60 anos e história familiar de até terceiro grau de câncer de ovário.

**Resultados:** Dos 112 participantes do estudo, 29 (25,8%) preenchem os critérios de encaminhamento para testagem genética; 31 (27%) apresentavam história familiar de câncer de mama e/ou ovário em familiares de até terceiro grau e outras 31 (27%) apresentavam história familiar de outro tipo de câncer que não mama e/ou ovário.

**Conclusão:** Um expressivo número (25,8%) de pacientes incluídas no Projeto Amazona III no Hospital São Lucas da PUCRS apresenta critérios para testagem da síndrome HBOC considerando apenas 3 critérios indicadores de testagem. Além disso, 27% das pacientes apresentavam história familiar de até terceiro grau de câncer de mama e/ou ovário hereditário. O aconselhamento genético é um processo essencial na identificação, teste genético e manejo de pacientes em risco hereditário de câncer. Um análise mais abrangente deve ser realizada para confirmar esses dados em outras regiões do país. Esforços devem ser realizados para facilitar o acesso dessa parcela importante de mulheres com câncer de mama ao cuidado especializado em genética.

**Palavras-chave:** Câncer de mama. Aconselhamento genético. Síndromes de câncer hereditário.

## INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o mais incidente na população feminina mundial e brasileira, excetuando-se os casos de câncer de pele não melanoma. No Brasil, estima-se o número de 59 mil novos casos em 2018<sup>1</sup>. Estima-se que 20 a 30% de todos os casos de câncer de mama sejam de origem familiar e os outros 70 a 80% sejam esporádicos, resultantes da exposição a múltiplos fatores de risco<sup>2</sup>. Mutações germinativas em genes de predisposição hereditária ao câncer são responsáveis por cerca de 10% de todos os casos diagnosticados de câncer de mama<sup>3</sup>.

A avaliação de um indivíduo com risco de câncer de mama hereditário é baseada na história familiar do paciente e, em caso de paciente com doença diagnosticada, também nas características da neoplasia (p. ex. subtipos histológicos, características imuno-histoquímicas, idade no diagnóstico). Os principais genes associados a predisposição hereditária para câncer de mama ou ovário são os genes *BRCA1* e *BRCA 2*<sup>4</sup>.

Estudos recentes sugerem que a prevalência estimada de mutações nos genes *BRCA* na população brasileira em indivíduos com câncer e critérios de testagem é de 20%. No entanto, esse dado segue desconhecido na população geral<sup>5,6,7</sup>.

Inúmeras dificuldades para identificação e aconselhamento de indivíduos em risco têm sido identificadas no Brasil e incluem: poucos serviços de aconselhamento genético, número ainda pequeno de profissionais capacitados para realizar aconselhamento genético, indisponibilidade dos testes genéticos para pacientes do SUS, treinamento insuficiente de profissionais de saúde para identificar os pacientes em risco com desconhecimento destes profissionais sobre a relevância da identificação de casos com câncer de mama hereditário, desconhecimento da população sobre o assunto, dificuldade de acesso a centros especializados entre outros<sup>5,8</sup>.



Dados específicos sobre a estatística de câncer de mama hereditário no Brasil ainda são poucos. Além de estudos envolvendo caracterização de mutações nos genes *BRCA*, foi identificada uma mutação no gene *TP53*, R337H (c.1010G\_A; p.Arg337His), que ocorre numa taxa de 1:300 indivíduos da população geral na região Sul e Sudeste do nosso país. Mutações em uma região mais central desse gene são causadoras da Síndrome de Li-Fraumeni (SLF), que ocorre em cerca de 1:5000 indivíduos e está associada com diversas neoplasias em idade precoce. A análise de padrão de tumores nas famílias com mutação p.Arg337His revela alguns dos achados comuns a SLF, porém com uma penetrância reduzida para câncer aos 30 anos e um risco inferior de desenvolver câncer ao longo da vida em comparação com os riscos de portadores de uma mutação clássica<sup>9,10</sup>. Informações como esta sobre mutações específicas em determinadas populações corroboram a importância de estimular regionalmente o aconselhamento e teste genético de pessoas de alto risco para câncer. Dessa forma, é possível identificar as principais mutações e prevalências nas nossas pacientes e será possível desenvolver programas de prevenção, rastreamento e tratamento adequados.

O Projeto Amazona III tem como objetivo geral descrever a epidemiologia do câncer de mama numa amostragem heterogênea da população brasileira. Para atender a tal objetivo, analisará dados a respeito de pacientes com câncer de mama invasor registradas até completar o n amostral de 3000 pacientes em instituições de saúde públicas e privadas que aceitaram participar do estudo. O objetivo do presente estudo é descrever as pacientes que participaram do projeto Amazona tendo sido recrutadas no Hospital São Lucas da PUCRS e que apresentavam critérios de testagem genética dos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Esse é um estudo observacional, transversal, de análise de prevalência. O Projeto Amazona III previa a inclusão de 3.000 pacientes com câncer de mama invasor e seu recrutamento foi encerrado em março de 2018. Todas as 112 pacientes do Hospital São Lucas da PUCRS incluídas no projeto até fevereiro de 2018 foram consideradas elegíveis. Incluem pacientes do sexo feminino, com idade maior ou igual a 18 anos, diagnosticadas com câncer de mama invasor (novo caso) durante o período de recrutamento do estudo (maio de 2016 até completar 3000 pacientes somando todos os centros de recrutamento). Os critérios utilizados para selecionar as pacientes que deveriam ser avaliadas geneticamente para mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foram extraídos do NCCN versão 1.2018 <sup>11</sup>. Foram analisados apenas três dos critérios do NCCN, a saber:

- Câncer de mama em pacientes com diagnóstico em idade menor ou igual a 45 anos
- Câncer de mama do tipo histológico triplo negativo em pacientes com idade menor ou igual a 60 anos (neste item, se a paciente já havia sido incluída no critério acima, não foi contabilizada 2 vezes).
- Câncer de mama em qualquer com idade com história familiar de câncer de ovário (familiares de até terceiro grau).

A análise de apenas 3 critérios é uma limitação do estudo e decorre da ausência de maior detalhamento (heredograma) sobre história familiar no Projeto Amazona. Foi optado por não sobrepor indicações e superestimar o número de pacientes. Por exemplo, foram selecionadas as pacientes com idade menor ou igual a 45 anos e depois foram selecionadas as pacientes com câncer triplo negativo abaixo de 60 anos que não haviam sido já incluídas no critério abaixo de 45 anos. Por esse motivo, não foram incluídas as pacientes com história familiar de câncer de

mama, pois não foi possível excluir quantas delas já haviam sido incluídas nos outros critérios e não foi possível analisar a idade dos familiares acometidos por câncer.

O projeto Amazona foi aprovado sob numero CAAE:48573015.5.2007.5336 e seu principal patrocinador é o grupo brasileiro de estudos do câncer de mama (GBECAM) que autorizou a análise parcial dos dados. No atual projeto foram analisadas todas as pacientes do banco de dados do Projeto Amazona III recrutadas no HSL. Foram obtidos dados referentes ao resultado do exame anátomo-patológico, resultado do exame imunohistoquímico e história clínica e familiar resumida (todos dados previstos no estudo). Foi utilizada estatística descritiva para avaliar dados demográficos, reprodutivos/hormonais, histológicos, e realizado cálculo de prevalência dos critérios de aconselhamento genético utilizados. Todas pacientes do projeto Amazona III assinaram TCLE .

## **RESULTADOS**

Das 112 pacientes com diagnóstico de câncer de mama invasor no Hospital São Lucas da PUCRS que foram incluídas no Projeto Amazona III durante o período de março de 2016 a fevereiro de 2018, o “n” válido de cada característica analisada variou de 110 a 62.

A amostra foi constituída majoritariamente por mulheres auto-declaradas brancas (82%) e usuárias do sistema público de saúde (90%). A média de idade ao diagnóstico de câncer de mama foi de 55,5 anos (variando de 31- 86 anos), sendo que 30,49% das pacientes foram diagnosticadas em idade inferior a 45 anos.

**Tabela 1.** Dados demográficos e tumorais das pacientes no estudo (N = 112)

<b>Característica</b>	<b>N (%)</b>
<b>Cor autodenominada – n válido = 112 (100,0%)</b>	
Branca	92 (82,14)
Negra	11 (9,82)
Parda	9 (8,04)
<b>Idade ao diagnóstico – n válido = 82 (73,21%)</b>	
≤ 45 anos	25 (30,49)
> 45 anos	57 (69,51)
Entre 46 e 60 anos	25 (30,49)
> 60 anos	32 (39,02)
Média (Desvio Padrão)	55,5 (13,7)
Mediana	54,5
Mínima – Máxima	31 – 86
<b>Tipo de convênio – n válido = 110 (98,2%)</b>	
Público	100 (90,91)
Privado	10 (9,09)
<b>Biópsia do tumor primário – n válido = 87 (77,67%)</b>	
Sim	83 (95,40)
Não	4 (4,60)
<b>Histologia do tumor primário - n válido = 71 (63,39%)</b>	
Ductal	61 (85,92)
Lobular	5 (7,04)
Outro	5 (7,04)
<b>Tamanho do Tumor em mm – n válido = 42 (37,50%)</b>	
Média (Desvio Padrão)	19,00
Mediana	16,00
Mínimo - Máximo	1 – 45
<b>HER-2 (Biópsia) - n válido = 75 (66,96,4%)</b>	
Equivocal	4 (5,33)
Positivo	31 (41,33)
Negativo	34 (45,33)
Não foi testado	6 (8,00)
<b>Receptor de Estrogênio (Biópsia) - n válido = 77 (68,75%)</b>	
Positivo	50 (64,94)
Negativo	21 (27,27)
Não foi testado	6 (7,79)
<b>Receptor de Progesterona (Biópsia) – n válido = 77 (68,5%)</b>	
Positivo	40 (51,95)
Negativo	31 (40,26)
Não foi testado	6 (7,79)

Foram identificadas nove pacientes com câncer de mama triplo negativo, sendo que apenas uma destas havia sido diagnosticada com câncer de mama entre 46 e 60 anos. Cinquenta pacientes apresentavam receptor de estrogênio positivo e 31 (27%) Her 2 amplificado. A média de tamanho tumoral foi de 19 mm.

Quanto a história familiar de câncer na família com o tipo de neoplasia descrita o n válido foi de 55%. Dessas, 31 pacientes referiam história de câncer de mama e/ou ovário em familiares de até terceiro grau e 31 referiam história familiar de outros tipos de câncer nos familiares. Considerando apenas história familiar de até terceiro grau de câncer de ovário o n é de 3 pacientes. E por fim, de um n válido de 86%, 9 pacientes já haviam sido diagnosticadas com outro câncer previamente, sendo que em 3 indivíduos esse câncer havia sido de mama (tabela 2).

**Tabela 2.** História pessoal e familiar de câncer.

<b>Características</b>	<b>N (%)</b>
<b>História pessoal de câncer - n válido = 97 (86,6%)</b>	
Sim	9 (9,28)
Não	88 (90,72)
<b>Tipo de câncer que teve no passado – n válido = 8 (88,88%)</b>	
Câncer de mama	3 (37,50)
Outro tipo de câncer	5 (62,50)
<b>História familiar de câncer – n válido = 91 (81,25%)</b>	
Sim	62 (68,13)
Não	29 (31,87)
<b>Tipos de câncer na família – n válido = 62 (68,13%)</b>	
Câncer de mama	22 (35,48)
Câncer de ovário	1 (1,61)
Outro tipo de câncer	31 (50,00)
Câncer de mama e de ovário	1 (1,61)
Câncer de mama e outro tipo de câncer	6 (9,68)
Câncer de ovário e outro tipo de câncer	1 (1,61)

## DISCUSSÃO

Em uma coorte de pacientes com câncer de mama invasor atendidas no Hospital São Lucas da PUCRS e incluídas no Projeto Amazona III, foi identificada uma proporção significativa de 29 (25,8%) pacientes com indicação de testagem dos genes *BRCA1* e *BRCA2* observando-se apenas 3 dos múltiplos critérios do NCCN. Desses critérios, 25 pacientes foram por idade igual ou inferior a 45 anos, 1 paciente por ter câncer de mama triplo negativo (e ainda não ter sido incluída pelo critério de idade) e 3 pacientes por apresentarem história familiar de câncer de ovário. Além disso, das 31 pacientes com história familiar de câncer de mama e ovário hereditários, certamente, algum percentual de pacientes também preencheriam critérios de testagem.

Estudo atual analisando 5080 pacientes com novo câncer de mama diagnosticado baseados nos dados de registro americano das cidades de Geórgia e Los Angeles, identificou 1711 (34%) pacientes com critérios formais para avaliação de risco genético de acordo com os critérios NCCN. Dessas pacientes, 74,6% receberam alguma forma de aconselhamento genético. Dessas 1711 pacientes, 47,4% não foram testadas geneticamente. Das 880 pacientes testadas, 14% das pacientes resultaram em VUS (variante de significado incerto) e 8,6% tinham mutação patogênica.<sup>13</sup>

Uma limitação importante do presente estudo é seu caráter retrospectivo que expõe deficiências de registro dos dados de caracterização demográfica e clínica das pacientes. Importante também a falta de detalhamento da história familiar de câncer e a dificuldade encontrada na confirmação destes casos com exames anatomopatológicos ou laudos médicos. Uma das explicações possíveis para tal deficiência é a característica dos atendimentos de recrutamento, que ocorriam em uma consulta de investigação, tratamento e seguimento com ambulatorios lotados, onde é dificultoso, pela pressão do tempo e de resolução de problemas

mais urgentes, realizar com precisão o devido detalhamento um registro da história familiar completa.

Em relação a dados brasileiros, não identificamos até a presente data algum estudo que identifique o percentual de pacientes que apresentam indicação de testagem genética. Quanto aos estudos de prevalência de mutação nos genes *BRCA* em indivíduos com câncer e critérios de testagem identifica-se uma prevalência média de 20% para mutação patogênica<sup>5,12</sup>. Em 2004, um grande estudo de coorte brasileiro avaliou 9234 mulheres no sistema público primário de saúde, sendo 1247 encaminhadas para avaliação com geneticista devido preencherem critérios de história familiar positiva para neoplasia. Dessas, 902 efetivamente foram no geneticista e 214 preenchiem critérios para testagem genética. Dessas 214 pacientes identificadas como alto risco, resultaram em 50 (20%) probandos que efetivamente testaram e 2 mutações patogênicas foram identificadas (4%). Num país o qual não oferece testagem genética no sistema público, uma oportunidade através de protocolo de pesquisa de identificação de pacientes mutadas com um número tão grande de pacientes que não participaram (80%), apesar de terem conversado com especialista em aconselhamento genético, fez o estudo concluir uma não aceitação ao teste genético na nossa população (talvez pelo baixo grau de instrução da população estudada)<sup>8</sup>.

Em outro estudo americano envolvendo 2.529 pacientes, 66% responderam que desejariam ter realizado teste genético e apenas 29% reportaram terem realizado teste genético. Um total de 773 (31%) pacientes apresentavam alta probabilidade de ter mutação (consideradas pacientes de alto risco) e deveriam ter sido encaminhadas para aconselhamento genético, segundo critérios NCCN. Dessas, 70,9% das pacientes referiram terem conversado sobre testagem genética com seu médico ou outro profissional de saúde e apenas 52,9% das pacientes realizaram o teste, sendo que 80,9% responderam o questionário manifestando desejo de ter realizado o teste. A conclusão do estudo foi que esses resultados sugerem um distanciamento entre a necessidade de aconselhamento e a realização do aconselhamento genético. Isso resulta

em apenas 52,9% das pacientes de alto risco obtendo testagem genética, num país sem dificuldades para realizar (a maioria da população tem seguro saúde que cobre o exame). Esse número representa a dimensão da oportunidade perdida de prevenir mortes por câncer de ovário e outras mortes por câncer em pacientes mutadas e suas famílias<sup>14</sup>.

## CONCLUSÃO

Este estudo revelou que um expressivo número (25,8%) de pacientes incluídas no Projeto Amazona III no Hospital São Lucas da PUCRS apresenta critérios para testagem de mutações em genes relacionados a síndrome HBOC considerando apenas 3 critérios indicadores de testagem, segundo o NCCN 2018. A frequência de pacientes com critérios para realizar o teste está subestimada, uma vez que há critérios adicionais para realizar o teste genético que não foram considerados, uma vez que não foi possível obter dados clínicos e de história familiar em todos os casos. Portanto, esse é um problema relevante e um aspecto a ser aprimorado no cuidado de pacientes com câncer de mama na Instituição. É provável que outros hospitais de referência na região tenham números similares, mas este dado deve ser confirmado com análises adicionais em outros centros. Facilitar o acesso ao aconselhamento genético e teste genético para estas mulheres é uma prioridade considerando que estratégias de redução de risco efetivas estão disponíveis para pacientes portadoras de mutação em genes de alta penetrância. A ampliação deste estudo para incluir todas as 3000 pacientes do Projeto Amazona III poderá trazer importantes informações não somente sobre a demanda de atendimentos de avaliação de risco genético no país como também sobre características específicas do perfil de risco genético em mulheres com câncer de mama em diferentes regiões.



**BIBLIOGRAFIA**

1. INCA. (2018. Available at: [www.inca.gov.br/](http://www.inca.gov.br/)). Portal- Instituto Nacional do Câncer – INCA.
2. Paluch-Schimon S, Cardoso F, et al. Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guideline for cancer prevention and screening. *Annals of Oncology*. 2016;27(5):v103-110
3. Apostolou P, Fostira F. Hereditary Breast Cancer: The Era of New Suscetibility Genes. *BioMed Research International*. 2013. 2013.ID 747318
4. Hartmann LC, Lindor NM. The Role of Risk-Reducing Surgery in Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2016;374:454-468
5. Alemar B, Gregório C, et al. BRCA1 and BRCA2 mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population? *PlosOne*. 2017;12(11):e0187630
6. Silva FC, Lisboa BC, et al. Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations copy number variantions in Brazilian patients. *BMC Med Genet*. 2014; 1555
7. Carraro DM, Koike Figueira MA, et al. Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. *Plos One*. 2013;83:e57581
8. Palmero EI, Alemar B, et al. Screening for germline BRCA1, BRCA2, TP53 and CHECK2 mutations in families at-risk for hereditary breast cancer in a population-based study from Southern Brazil. 2016;39(2):210-222.
9. Andrade KC, Santiago KM, et al. Early-onset breast cancer patients in the South and Southeast of Brazil should be tested for the TP53 p.R337H mutation. *Genetic Mol Biol*. 2016;39(2):199-202.
10. Giacomazzi J, Graudenz MS et al, Prevalence of the TP53 p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. *PLoS One*. 2014. 9(6).
11. NCCN Clinical practice guidelines in oncology guidelines: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. Version 1.2018 2018: MS-45- MS-46, [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/genetics\\_screening.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_screening.pdf) (1 March 2018, date last accessed).
12. Fernandes GC, Mchelli RAD, et al. Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. *Oncotarget*. 2016;7(49):80465-80481

13. Katz SJ, Ward KC et al. Gaps in Receipt of Clinically Indicated Genetic Counseling After Diagnosis of Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 2018; 36(12):1218-1224.
14. Kurian AW, Griffith KA et al. Genetic Testing and Counseling Among Patients Newly Diagnosed Breast Cancer. *JAMA*. 2017;317(5): 531- 534

## 5.2 ARTIGO 2: A SER SUBMETIDO PARA REVISTA JOURNAL OF BREAST CANCER

FREQUENCY OF GERMLINE *BRCA1* AND *BRCA2* MUTATIONS IN A SERIES OF CASES OF PATIENTS WITH METASTATIC BREAST CANCER IN THE SOUTH OF BRAZIL

Alessandra Borba Anton de Souza<sup>1,2</sup>, Carlos Henrique Barrios<sup>3</sup>, Marina Lemniesk Bianchi<sup>4</sup>, Fernanda Damian<sup>5</sup>, Alessandra Menezes Morelle<sup>6</sup>, Nicolas Silva Lazaretti,<sup>7</sup> Patrícia Santos Silva<sup>8</sup>, Cristina Netto<sup>9</sup>, Pedro Emanuel Rubini Liedke<sup>10</sup>, Patrícia Ashton-Prolla<sup>2,11</sup>

<sup>1</sup> Breast Cancer Department of Hospital São Lucas da PUCRS – RS, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

<sup>3</sup> Principal Investigator of Centro de Pesquisa em Oncologia do Hospital São Lucas da PUCRS

<sup>4</sup> Medical student of Faculdade de Medicina do Hospital São Lucas da PUCRS

<sup>5</sup> Medical oncology of Centro de Pesquisa em Oncologia do Hospital São Lucas da PUCRS

<sup>6</sup> Medical Oncology of Hospital Moinhos de Vento

<sup>7</sup> Medical Oncology of Hospital de Passo Fundo

<sup>8</sup> Nurse of Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>9</sup> Medical Geneticist of Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>10</sup> Medical Oncology of Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>11</sup> Professor of Genetic Department of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

**Palavras-chave:** Hereditary breast cancer. *BRCA1*. *BRCA2*. Genetic Counseling

Abstract:

**Introduction:** Genetic counseling and testing have been incorporated into oncological care to optimize management and treatment strategies. Counseling, prophylactic surgeries and early cancer detection strategies in individuals with *BRCA1/BRCA2* mutations have been quite extensively studied. For patients who meet criteria for genetic testing, expertise is required to ensure that the test will be adequately interpreted and the results will aid in diagnosis or influence management of the patient or family members at risk for hereditary cancer. For patients with HER2-negative metastatic breast cancer and a germline *BRCA* mutation, PARP inhibitor provided a significant benefit over standard therapy. In this age of target therapy, the benefit of the PARPi will probably lead to increased access to genetic testing in this group of patients.

**Methods:** We performed a retrospective analysis of data obtained from a clinical program of *BRCA1/BRCA2* molecular genotyping for women with metastatic breast cancer, offered in 4 hospital-based oncology centers in the State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. All patients recruited for this program in the year 2015 were included in the present study. *BRCA1* and *BRCA2* were analyzed by next generation sequencing and MLPA.

**Results:** Sixty-nine unrelated patients diagnosed with metastatic breast cancer were included regardless of age at cancer diagnosis and family history and among these, 11 (16%) were carriers of a pathogenic germline mutation. Among carriers, 6 had mutations in *BRCA1*, 4 in *BRCA 2* and 1 patient was heterozygous for one mutation in *BRCA1* and one mutation in *BRCA2*. Family history was not recorded in 42% of the sample and testing of the specific mutation in other relatives had only been done in 4 (30%) of carriers by the same laboratory after 2 years of testing, although the laboratory had made testing available for all first degree relatives.

**Conclusion:** Of 69 women with metastatic breast cancer, 16% (n= 11) were positive for *BRCA1/2* mutations and could be eligible to participate in studies with new target drugs (since the use of PARP inhibitor for breast cancer has not yet been approved in Brazil). Metastatic breast cancer patients do not benefit from risk-reducing surgeries. However, if we test their asymptomatic relatives, would be possible to perform breast cancer risk reduction and ovarian cancer mortality reduction. In order to do so, physicians must be able to recognize the importance of genetic counseling, obtaining a minimal family history, and understand the benefits of identifying asymptomatic mutation carriers as well as cancer affected carriers to prevent second primary tumors.

## Introduction

For metastatic breast cancer, single agent poly (ADP ribose) polymerase (PARP) inhibitors (PARPi) have been approved as the first targeted therapy available for patients with BRCA mutated HER2 negative<sup>1</sup>. In this age of target therapy, the benefit of the PARPi will probably lead to increased access to genetic testing in this group of patients.

Genetic cancer risk assessment (GCRA) is increasingly becoming an integral part of the management of women with newly diagnosed breast and ovarian cancer and of individuals at high risk for these diseases. Genetic counseling and testing have been incorporated into oncological care to optimize management and treatment strategies. The management of unaffected *BRCA1/2* mutation carriers included: recommend breast-screening options, discuss risk-reducing mastectomy, recommend risk-reducing salpingo-oophorectomy and discuss chemoprevention<sup>2, 5</sup>. For metastatic cancer patients more than identify if they could receive target therapy with PARPi, it is possible to found asymptomatic relatives with the familiar mutation and so prevent cancer and reducing ovarian mortality. In this context, participation in a research registry is strongly encouraged to try to understand the significance of variants and their associated cancer risk. Furthermore, participation in online registries can help research to more rapidly accumulate data on how mutations in these genes may affect health and cancer risks<sup>2</sup>. Genetic testing of the two main breast cancer-associated genes, *BRCA1* and *BRCA2*, has been available in EUA for 20 years, but new massively parallel sequencing technologies and less restrictive patent laws have made multiplex panel tests available at much lower costs<sup>3</sup>. In Brazil, these Technologies are not readily available to the majority of at-risk individuals since most depend on the Public Health Care System, and so far do not have access to genetic testing. Thus, the molecular profile of families with the HBOC phenotype remains largely unknown, especially in certain regions of the country<sup>4</sup>. The main goal of this study is to describe the

clinical and epidemiological features and *BRCA1* and *BRCA2* genotypes in a group of patients with metastatic breast cancer in Southern Brazil.

## **Materials and methods**

We performed a retrospective analysis of data obtained from a clinical program of *BRCA1/BRCA2* molecular genotyping for women with metastatic breast cancer, offered in 4 hospital-based oncology centers in the State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Hospital Moinhos de Vento, Hospital de Passo Fundo, Hospital São Lucas da PUCRS, all patients recruited for this program in the year 2015, were included in the present study.

The opportunity of this testing occurred in parallel with the existence of a trial for metastatic triple negative breast cancer with BRCA mutations. Criteria for testing BRCA mutation were independent of the trial and the only prerequisite was the patient had a previous diagnosis of metastatic breast cancer.

*BRCA1* and *BRCA2* were analyzed by next generation sequencing and MLPA in a commercial laboratory (Pathway Genomics, USA). All patients signed an informed consent for genetic testing and were offered pre- and post-test genetic counseling. For patients with an identified pathogenic mutation, testing was available for blood relatives

## **Results**

Sixty-nine unrelated patients diagnosed with metastatic breast cancer were included regardless of age at cancer diagnosis and family history and among these, 11 (16%) were carriers of a pathogenic germline mutation. Among carriers, 6 had mutations in *BRCA1*, 4 in *BRCA 2* and 1 patient was a compound heterozygote for one mutation in *BRCA1* and one mutation in *BRCA2*. The mean age at cancer diagnosis was 41 years in the entire sample and

39 years in the group of mutation carriers. Mutation data are summarized in table 1. In addition, three variants of unknown significance (VUS) were identified: *BRCA2* c.9101A>G; *BRCA2* c.9925G>A; *BRCA1* c.5242G>C.

Not all patients fulfilled at least one of the NCCN criteria<sup>5</sup> for molecular testing and in the majority breast cancer diagnosis under the age 45 years was the criterion for testing (often the single criteria identified). Family history was not recorded in 42% of the sample and testing of the specific mutation in at least one relative had only been done in 4 (30%) of carriers by the same laboratory after 2 years of testing.

**Table 1: Clinical and molecular data of mutation carriers**

Genotyping results	Variant classification	HGVS nomenclature Protein change	Age at diagnosis (ys)	Age at first metastatic event (ys)	Cancer family history	Breast cancer type
<i>BRCA2</i> c.7180A>T	P	p.Arg2394Ter	NA	NA	No	NA
<i>BRCA2</i> c.7987del G	P	p.Glu2663Lysfs	38	41	Yes	ER positive
<i>BRCA2</i> c.9004G>A	P	p.Glu3002Lys	43	51	Yes	Triple negative
<i>BRCA1</i> exon 4-6 deletion	P	-				
<i>BRCA2</i> c.1138delA	P	p.Ser380Valfs	39	40	Yes	ER positive
<i>BRCA2</i> c.6405_6409delCTTAA	P	p.Asn2135Lysfs	53	58	No	ER positive
<i>BRCA1</i> c.4736_4739delCTTC	P	p.Pro1579Leufs	25	43	No	Triple negative
<i>BRCA1</i> c.5266dupC	P	p.Gln1756Profs	44	48	No	ER positive
<i>BRCA2</i> c.9925G>A	VUS	p.Glu3309Lys				
<i>BRCA1</i> del exon 1-2	P	-	50	48	Yes	NA
<i>BRCA1</i> c4183 C>T	P	p.Gln1395Ter				Triple negative
<i>BRCA1</i> c.4941del C	P	p.Asn1647Lysfs	43	44	Yes	ER positive
<i>BRCA1</i> c.1687C>T	P	p.Gln563Ter	29	30	No	ER positive
<i>BRCA1</i> c.1687C>T	P	p.Gln563Ter	35	46	No	Triple Negative
<i>BRCA2</i> c.9101A>G	VUS	p.Gln3034Arg	47	52	NA	Triple Negative
<i>BRCA1</i> c.5242G>C	VUS	p.Gly1748Arg	31	38	Yes	Triple Negative

NA= Not Available HGVS= Human Genome Variation Society ER= Estrogen Receptor

## Discussion

Recently, two phase III trials of olaparib (OlympiaD) and talazoparib (EMBRACA) demonstrated 3-month progression-free survival improvement with PARPi compared to physician's choice single agent chemotherapy in metastatic *BRCA*-mutated breast cancer<sup>6</sup>. Thus, testing metastatic breast cancer patients for *BRCA* has become a therapeutic target for PARPi and interest in testing will probably increase.

In this small study of metastatic breast cancer patients unselected for age or family history of cancer we identified a pathogenic germline mutation in *BRCA1* and/or *BRCA2* in 16% of the probands. As expected, mutation carriers had a lower mean age at cancer diagnosis than noncarriers and most of the carriers with triple negative cancers had *BRCA1* mutations<sup>7</sup>. An American study described 195 patients with metastatic breast cancer selected from the total group of patients being referred for mutation testing to the MD Anderson. These group found 21% patients positive for *BRCA1/2* mutations<sup>8</sup>.

Surprisingly in our sample we found that in 42% of the cases that were tested for *BRCA* mutations, there was no information on cancer family history in the medical records. More strikingly, in 70% of carriers, none of their relatives had been tested after two years of follow-up. This is especially worrisome since the genotyping program offered genetic testing at no cost for relatives of all identified carriers, so there was no financial burden for reimbursement or out-of-pocket payment. The benefit of genetic information for family members not affected by cancer is, undoubtedly, very important. Noncarrier relatives can avoid unnecessary interventions, whereas carrier relatives can utilize surveillance and prevention measures, reducing morbidity and mortality<sup>9,10</sup>. The effect of risk-reducing salpingo-oophorectomy on mortality was found in a large multicenter prospective cohort study, which involved 2482 *BRCA* mutations carriers. The surgical group had lower all-cause mortality and lower ovarian cancer-specific mortality (HR, 0.21; 95% CI 0.06 to 0.80)<sup>11</sup>. Other studies confirm lower



mortality after risk-reducing salpingo-oophorectomy. Besides, studies showed a significant risk reduction of approximately 80% among BRCA mutation carriers for risk-reducing salpingo-oophorectomy for prevention of ovarian cancer<sup>6</sup>. The ultimate impact of genetic testing is to identify all individuals at high-risk for cancer before they are affected to maximize the opportunity for prevention and early detection.

A possible explanation for this finding is that physicians may still not adequately recognize the importance for genetic testing. In the United States, 3.8 million women have a history of breast or ovarian cancer and up to 15% are attributable to heritable mutations but most of these patients do not discuss testing with a health care provider. In a recent study, among U.S. breast cancer patients (using only four eligibility criteria for testing) and ovarian cancer patients (all with epithelial tumors should be tested), an estimated 1.2 to 1.3 million individuals failed to receive testing<sup>12</sup>.

Limitations of the study included the small sample and the retrospective analysis of data through medical records, missing important unrecorded information.

## **Conclusion**

Of 69 women with metastatic breast cancer, 16% (n= 11) were positive for *BRCA1/2* mutations and could be eligible to participate in studies with PARPi. The benefit of genetic information for family members not affected by cancer is, undoubtedly, very important. The ultimate impact of genetic testing is to identify all individuals at high-risk for cancer before they are affected to maximize the opportunity for prevention, early detection and reducing morbidity and mortality. In this small study, family history was not recorded in 42% of the sample and testing of the specific mutation in at least one relative had only been done in 4 (30%) of carriers by the same laboratory after 2 years of testing

In a country where molecular testing is not available through public healthcare system, it is imperative to take advantage of any research opportunity to prevent ovarian and other cancer deaths among mutation carriers. In order to do so, physicians must be able to recognize the importance of genetic counseling, obtaining a minimal family history, and understand the benefits of identifying asymptomatic mutation carriers. Priorities in this field include improving physician's communication skills, assessment of the hereditary cancer risk and desire for testing, thus optimizing triage to genetic counselors. Efforts are warranted to address this unmet need.

## References

1. Poggio F, Bruzzone M, et al. Single-agent PARP inhibitors for the treatment of patients with *BRCA*-mutated HER2-negative metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *ESMO Open*. 2018, 3(4):e000361.
2. Graffeo R, Livraghi L, Pagani O, Goldhirsch, Partridge A, Garber J. Time to incorporate germline multigene panel testing into breast and ovarian cancer patient care. *Breast Cancer Res Treat*. 2016. 160:393-410
3. Kurian AW, Griffith KA et al. Genetic Testing and Counseling Among Patients Newly Diagnosed Breast Cancer. *JAMA*. 2017;317(5): 531- 534
4. Alemar B, Gregório C, et al. *BRCA1* and *BRCA2* mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population? *PlosOne*. 2017;12(11):e0187630
5. NCCN Clinical practice guidelines in oncology guidelines: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. Version 1.2018 2018: MS-45- MS46, [HTTPS://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/genetics\\_screening.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_screening.pdf) (1 March 2018, date last accessed).
6. Hartmann LC, Lindor NM. The Role of Risk-Reducing Surgery in Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *N Engl J Med*. 2016;374:454-468
7. Zimmer AS, Gillard M, et al. Update on PARP Inhibitors in Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2018,19(5):21.
8. Bayraktar S, Gutierrez-Barrera AM, et al. Outcome of metastatic breast cancer in selected women with or without deleterious *BRCA* mutations. *Clin Exp Metastasis*. 2013;30(5).

9. Lieberman S, Lahad A, et al. Familial communication and cascade testing among relatives of BRCA population screening participants. *Genetics in Medicine*. 2018
10. Paluch-Schimin S, Cardoso F, et al. Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guideline for cancer prevention and screening. *Annals of Oncology*. 2016;27(5):v103-110.
11. Domcheck SM, Friebel TM, Singer CF et al. Association of risk-reducing surgery in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. *JAMA*.2010;304:967-75.
12. Childers C, Maggard-Gibbons M, Macinko J. National Estimates of Genetic Testing in Women With a History of Breast or Ovarian Cancer. *J Clin Oncol*. 2017;35 (34)

## 5.3 ARTIGO 3: A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA BREAST CANCER RES TREAT

**Early-onset breast cancer in a patient with Neurofibromatosis Type 1 and Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome: does the double mutant status contribute to cancer anticipation?**

Alessandra Borba Anton de Souza<sup>1,2</sup>, Gabriel de Souza Macedo<sup>3</sup>, Clevia Rosset<sup>4</sup>, Cristina Netto<sup>5</sup>, Patricia Santos Silva<sup>6</sup>, Felipe Zerwes<sup>1</sup>, Emily Ferreira Salles Pilar<sup>3</sup>, Vinicius Duval da Silva<sup>7</sup>, Patricia Ashton-Prolla<sup>2,8</sup>

<sup>1</sup> Breast Cancer Department of Hospital São Lucas da PUCRS – RS, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

<sup>3</sup> Research of Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>4</sup> Research of Universidade Federal do Rio Grande do Sul

<sup>5</sup> Medical Genetic Department of Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>6</sup> Nurse of Hospital de Clínicas de Porto Alegre

<sup>7</sup> Medical Pathologist of Hospital Mãe de Deus

<sup>8</sup> Professor of Genetic Department of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Keywords: *NF1*. *BRCA 2*. Early-onset breast cancer. Hereditary breast cancer

**Abstract**

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is a common autosomal dominant disorder caused by mutations in the *NF1* gene. Epidemiological studies have reported that patients with NF1 have a 2.7 to 5 times higher risk for cancer compared with the general population. More recently, an increased risk of breast cancer in women younger than 50 has also been reported. Mutations of the suppressor gene *BRCA2* are associated with hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC). The numbers of breast cancer diagnoses, the ages of patients at diagnosis and the occurrence of ovarian cancer syndrome in addition to breast cancer vary among families with HBOC. We describe a family with HBOC and one female affected both *NF1* and *BRCA2* germinative mutations and with early onset breast cancer. Mutations analyses identified the familial mutation in *BRCA2* and *de novo* mutation in *NF1* gene in this female. We also analyses

tumor`s mutations for trying to understand if the double mutation can be responsible for the extremely early onset breast cancer in this female.

## **Introduction**

Neurofibromatosis type 1 is an autosomal dominant disorder with an approximate incidence ranging from 1/2,500 to 1/3,000 and is caused by germinative *NF1* gene mutations (1, 2, 3). *NF1* is a tumor suppressor gene localized to chromosome 17q11.2, comprises 60 exons and 350kb of genomic DNA. The extremely large size of the gene is consistent with its high spontaneous mutation rate ( ~ 50%). *NF1* codes for the neurofibromin protein, involved in the down regulation of the RAS-mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway (4). *NF1* is a multisystem disease with varying combinations of benign and malignant tumors, development and osseous abnormalities, and functional deficits, including cognitive impairment (1). From the diagnostic criteria, it is clear that *NF1* may involve almost every organ system in the body, with considerable inter-familial and intra-familial variation in expressivity (2). Although some genotype-phenotype correlations have been proposed, prediction of the phenotype and prognosis from the genotype is still difficult in most cases. For these reasons, genetic counseling in *NF1*, with regard to its malignant and non-malignant manifestations, is a challenge. In addition, the broad spectrum of malignancies potentially associated with the disease causes great concern to the families (2). The most common malignancies associated with *NF1* are intracranial gliomas and malignant peripheral nerve sheath tumors. Previous population-based studies have demonstrated that women under 50 years of age with *NF1* have an increased risk of breast cancer (3). Walkers et al reported a breast cancer standardized incidence ratio (SIR) of 4.0 (p=0.037; 95% confidence interval [CI], 1.1 – 10.3) in women with *NF1* by age 50 years (2,3).

Mutations of the suppressor genes *BRCA1* and *BRCA2* are associated with different patterns of hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *BRCA 1* (chromosome 17q21) and *BRCA 2* (chromosome 13q12.3) genes encode proteins that are essential in homologous recombination, the most important repair mechanism of double strand DNA breaks. The overall cumulative risk of female breast cancer in *BRCA 2* mutation carriers has been estimated at 28% by age 50 years and 84% by age 70 years (5). Thus, breast cancer caused by *BRCA2* mutations is often associated with female breast cancer at a later age in comparison to the risk observed in *BRCA1* mutation carriers (6). While the risk of breast cancer in *NF1* gene mutation carriers has been estimated in some publications, few cases have been reported with a combined diagnosis of *NF1* and carriage of mutations in other breast cancer predisposition genes. Here, we describe a family with hereditary breast cancer, in which the proband has the clinical diagnosis of early-onset breast cancer with a positive family history of breast and ovarian cancer and also has the clinical diagnosis of neurofibromatosis type 1. Genotyping identified pathogenic germinative mutations in both the *BRCA 2* and *NF1* genes. To the best of our knowledge, this report is the first to describe an individual clinically affected by *NF1* and hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome with *BRCA2* mutation.

## Case Report

In the family described there (figure 1) were 12 females affected by breast cancer and 1 female by ovarian cancer. Ten women had the diagnosis of postmenopausal cancer and 3 premenopausal cancer and none of them, except the proband, diagnosed before the age of 30. The proband is a 35-year-old woman diagnosed with *NF1* in her childhood due to presence of *café au lait* spots and posterior development of cutaneous neurofibromas. No other family members is affected by *NF1*. The proband had also been diagnosed with multifocal high-grade intraductal breast carcinoma (comedo type with microcalcifications, estrogen and progesterone

receptor positive) at 24 years of age. Due to a positive margin after a breast conserving surgery (performed for the diagnosis of microcalcifications) and considering the positive family history, the breast surgeon performed a skin-sparing mastectomy on left breast and nipple sparing mastectomy on right breast with sentinel node biopsy on the left. The tumor was classified as stage Tis(m)N0M0 according to the TNM Staging System for Breast Cancer adopted by the American Joint Committee on Cancer (AJCC). Then, she used Tamoxifen for 2 years and suspended due to transient stroke. After discontinuation of Tamoxifen, the patient noticed a palpable nodule in the axillary region on the left side. Then, it was performed the nodule resection and axillary dissection, with 1 metastatic axillary node and 1 axillary node suspicious during her surgery and definitive diagnose as neurofibroma. At this time, was a 0,5 cm invasive carcinoma, estrogen and progesterone receptor positive, ki67 19% and C-erb-2 negative. Chemotherapy was started and to achieve local control, radiotherapy was also performed. Adjuvant ovarion suppression was started with GnRH analog associated with aromatase inhibitor and still is continuos until today. Due to the presence of others members affected by gene *BRCA2* mutation c.7618-2A>G (IVS15-2A>G, splice acceptor variant described at Clinvar as pathogenic/likely pathogenic) and clinical neurofibromatosis on the proband, we analyzed the DNA. Mutation analysis was carried out by direct cDNA sequencing for the *NF1* and direct mutation for the *BRCA 2* gene.

In this study, we also sequenced the direct mutations in *BRCA2* and *NF1* in the tissues from the proband, so-called normal breast at 24 y, normal breast at 26 y, in situ breast cancer at 24 y, neurfibroma at 26 y, limph node with invasive cancer at 26 y and normal limph node at 26 y.

## Methods

### Sample

The patient was recruited at the Oncogenetics Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. She was evaluated by a clinical geneticist and had DNA collected with written informed consent.

### DNA samples

Genomic DNA was extracted from tumor, normal and lymph nodes tissues from FFPE blocks using a commercial DNA extraction kit (ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System, Promega, USA).

### Mutation screening

Germline mutations in NF1 (c.6855C>G) and BRCA2 (c.7618-2A>G) genes were previously identified in peripheral blood DNA by Next-Generation Sequencing (NGS) using customized panels, designed by the AmpliSeq Designer software (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). NF1 and BRCA panels target the coding sequence, 50 bp exon-intron junctions and 5' and 3' untranslated regions of the genes.

Sanger sequencing was performed to investigate both variants, as well as the presence of LOH, in tissue samples. Specific primers for exon 46 (NF1) and exon 15 (BRCA2) were designed using Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) and the same reference sequences were used for direct capillary sequencing (LRG\_293 and LRG\_214 for BRCA2 and NF1, respectively). Forward and reverse primers (available upon request) were used to sequence the purified PCR products, using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit on an ABI 3500 instrument (Thermo Fisher Scientific, CA, USA). Sequences were aligned to the reference sequences using CodonCode Aligner software implemented in MEGA 5.04.



In order to identify the presence of LOH, the gene region containing the mutations of both genes were manually inspected by comparing the relative intensities of the peaks of normal/mutant alleles and between normal, lymph node and tumor tissues. High depth next-generation sequencing for a tumor sample (BRCA1 and BRCA2 panel) was performed to investigate the contamination with normal cell and infer our ability to detect LOH by Sanger sequencing.

### **Nomenclature and databases**

We used for nomenclature the sequence from the NCBI RefSeq database (BRCA2: NM\_000059.3:c.7618-2A>G, NF1 NM\_001042492.2:c.6855C>A). The nomenclature follows the recommendations from Human Genome Variation Society (HGVS).

### **Genotyping**

The analysis by DNA sequencing BRCA2 gene revealed a substitution at position 2 in intron 15, c.7618-2A>G, pathogenic. And the analysis of the NF1 gene mutation identified c.6855C>G in exon 46 (p.Tyr2285Ter). This mutation has previously been associated with the development of malignant tumors of the peripheral nerve sheath.

### **Results**

The analysis by DNA sequencing BRCA2 gene revealed a substitution at position 2 in intron 15, c.7618-2A>G, pathogenic. And the analysis of the NF1 gene mutation identified c.6855C>G in exon 46 (p.Tyr2285Ter), also pathogenic.

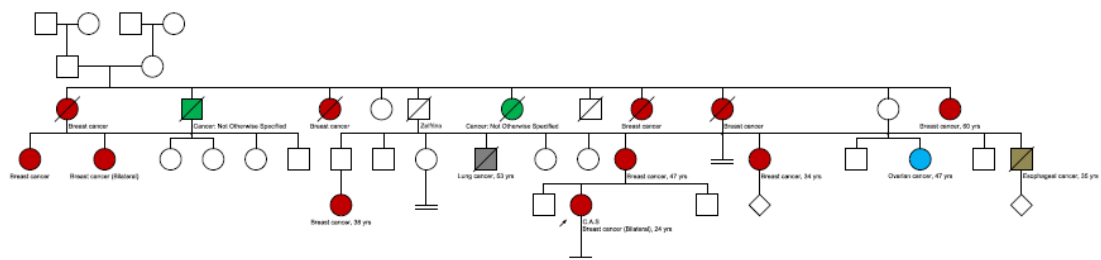
The analysis tissue's tumor for *BRCA2* pontual germinative patient's mutation with sanger method was identified loss of heterozygosity in lymph node with invasive cancer at 26 y – the second tumor on left breast (LFNT) and the patient's mutation into one allele of the

following samples: neurofibroma (NF), and normal lymph node at 26 y (LFN) (figure 2). The others samples was not possible identify the results due to low amount of DNA in our first analysis.

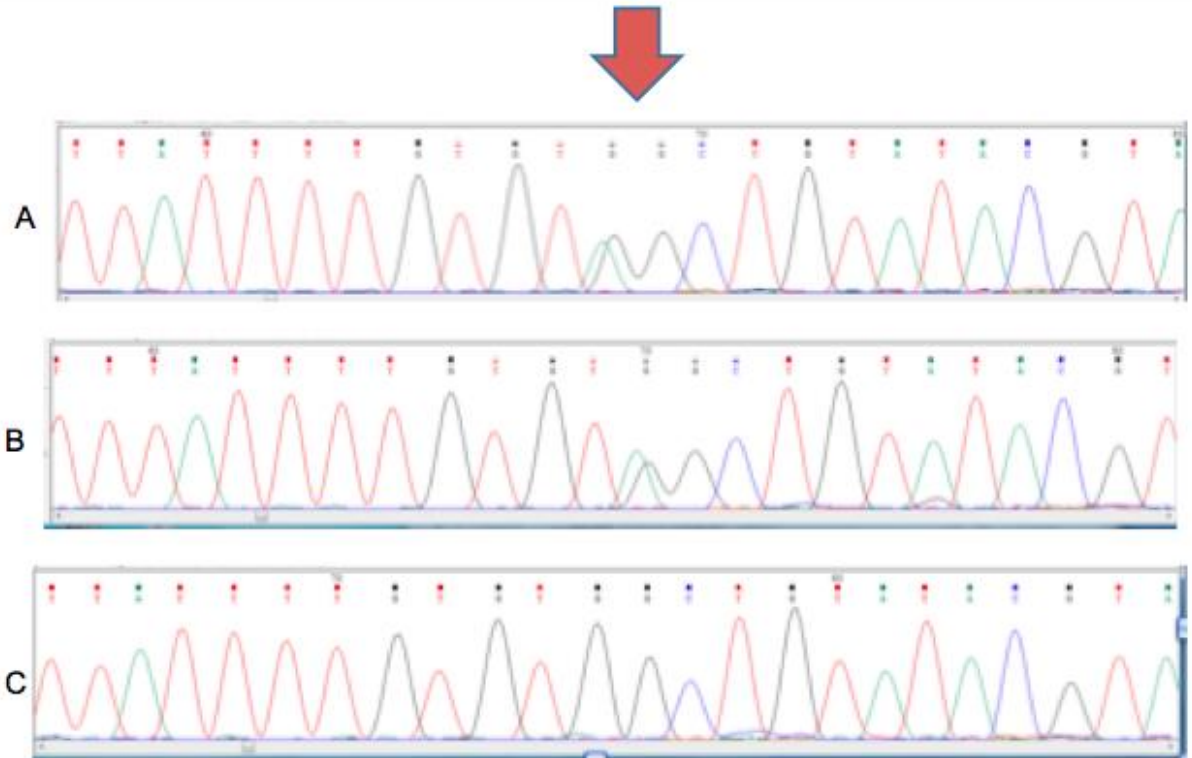
The analysis tissue`s tumor for *BRCA2* pontual germinative patient`s mutation with next generation method in *in situ* breast cancer (T1 and T2 sample – first cancer ) identified regarding the germ mutation of *BRCA2* (c.7618-2A> G), the G represents 74% of the readings, which means that we have loss of heterozygosity, at least in most cells.

The analysis tissue`s tumor for *NF1* pontual germinative patient`s mutation identified the *NF1* mutation`s proband into one allele in all samples, except the following sample: *in situ* breast cancer (T1 and T2 sample – first cancer). In this sample the reading of the two alleles at the mutation locus did not identify any mutation (figure 4).

**Figure 1:** Family pedigree showing index case (arrow).



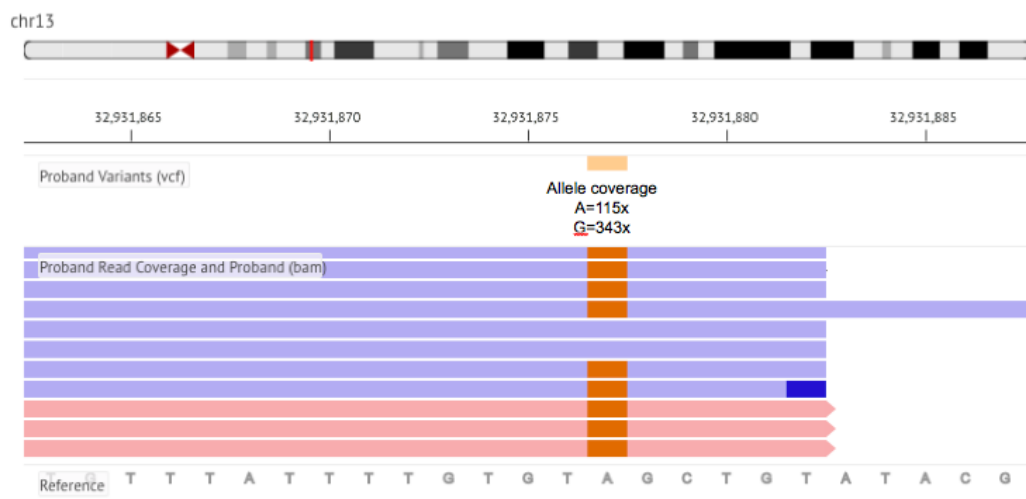
**Figure 2:** BRCA2 mutation on tumor / breast tissue – sanger method

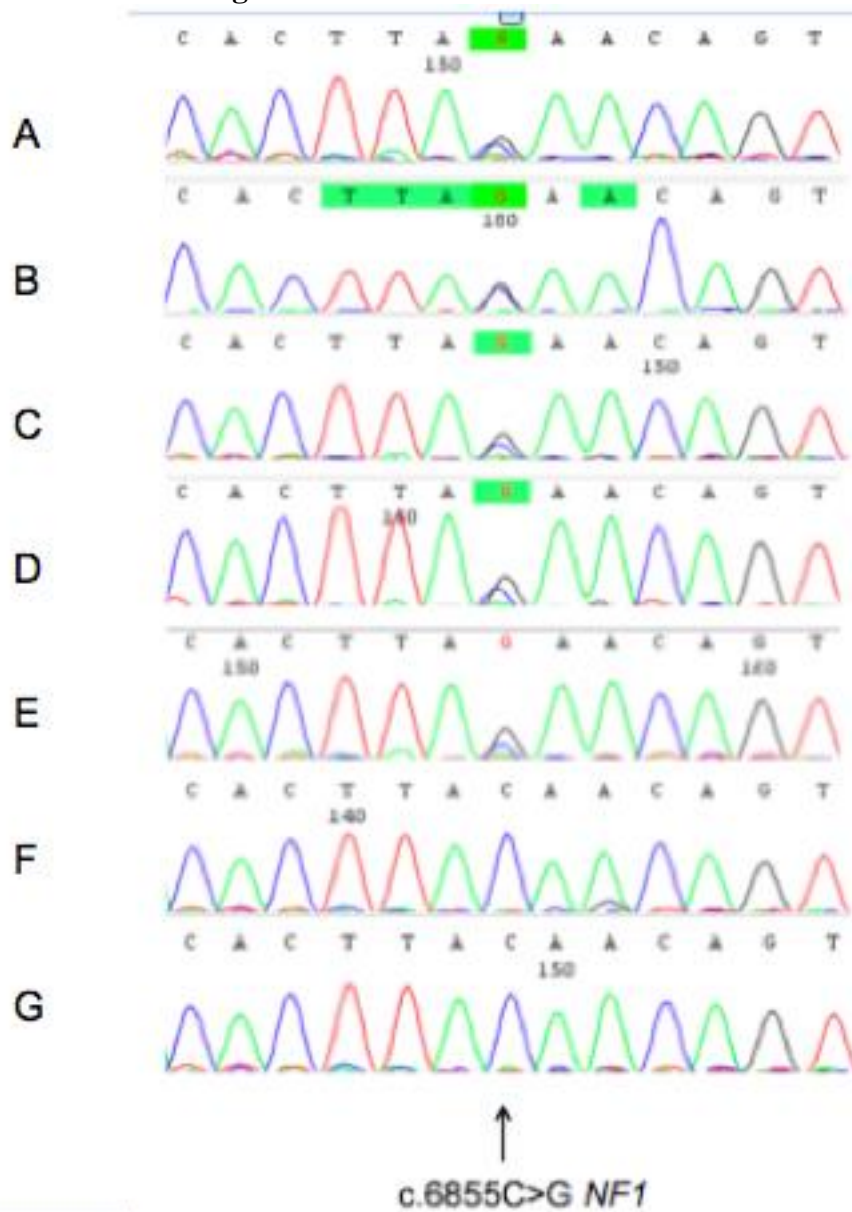


Note: A= neurofibroma B= normal lymph node C= tumor at lymph node

Observe the loss of heterozygosity in lymph node with invasive cancer (C) - the second tumor on left and the patient's mutation into one allele of the following samples: neurofibroma (A) and normal lymph node (B)

**Figure 3:** BRCA2 mutation on in situ tumor (first tumor) in breast tissue –NGS method.



**Figure 4:** NF1 mutation on tumor in breast tissue.

Note: A= normal breast tissue 1 B= normal breast tissue 2 C= neurofibroma D= normal lymph node E= invasive tumor in lymph node F= in situ breast tumor 1 G= in situ breast tumor 2

Observe *NF1* mutation's proband into one allele in all samples, except the following sample: *in situ* breast cancer (T1 and T2 sample – first cancer). In this sample the reading of the two alleles at the mutation locus did not identify any mutation.

## Discussion

A moderately elevated risk for breast cancer, especially under age 50 and poor survival have been reported for women with NF1. There are a numerous case reports on NF1 and breast

cancer. Only some reports and populations based registers containing data that allow generalization of the results (7). Germinative genomic analysis may better define the risk so screening and prevention can be applied to the individuals who benefit the most. Survey conducted in several neurofibromatosis clinics in the United States has demonstrated a 17,2% lifetime risk of breast cancer in women affected with NF1. Cumulated risk to age 50 is estimated to be 9.27% (8).

Various authors have suggested different mechanisms supporting the association between *NF1* and breast cancer. Neurofibromin, the protein product of *NF1*, functions as a negative regulator of the Ras/MAPK pathway. It interacts with Ras and converts active Ras pathway in inactive form Ras-GDP. Ras is a part of signal transduction pathway involved in cell differentiation and proliferation, an important step in tumorigenesis. It has also been suggested that there may be genes that could interact with *NF1* gene, particularly *BRCA1*, since both are on human chromosome 17q [19], although other breast cancer genes may also be implicated (4). Somatic *NF1* mutations are found in 2-3% of the sporadic breast cancer as putative driver mutations (The Cancer Genome Atlas Network 2012, The Cancer Genome Atlas TCGA data bank). These data suggest that neurofibromin, the protein encoded by the *NF1* gene, plays a role in the development of breast cancer (8, 9, 10).

Some articles have reported a total 6 isolated cases of breast cancer carrying germline *NF1* and *BRCA1* gene mutations (3, 4, 11, 12).

Recent article published a whole exon sequencing (WES) in 14 women affected with breast cancer was performed to elucidate the relationship between NF1 and breast cancer. Deleterious NF1 pathogenic variants were identified in each woman. Frameshift mutations due to deletion/duplication/complex rearrangement were found in 50% (7/14) of the cases, nonsense mutations in 21% (3/14), in-frame splice mutations in 21% (3/14) and one case of missense mutation (7%, 1/14). No deleterious mutation was found in the following high/moderate

penetrance breast cancer genes: *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BARD1*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHECK2*, *FANCC*, *MRE11A*, *NBN*, *NF1*, *PALB2*, *PTEN*, *RAD50*, *RAD51C*, *TP53* and *STK11*. Twenty five rare or common variants in cancer related genes were discovered and may have contributed to the breast cancer in those individuals. According to the authors, it suggests that besides *NF1* gene, low penetrance alleles of various genes, rare or common may also contribute to the breast cancer collectively. They did not recruit *NF1* women without breast cancer as control group (10). The last written article and our case report do not support possible relation between *NF1* and *BRCA1* mutation because they are on the same chromosome. One possible hypothesis is that the presence of two mutations could cause genomic instability and favor the second hit in the normal allele causing cancer.

In the first tumor of our proband (*carcinoma in situ* at age 24), loss of heterozygosity is suggested in the *BRCA2* gene and absence of the germinative mutation of the patient in the *NF1* gene were found in the tumor sample. Another possibility for 74% of G readings in *BRCA2* gene, which for us means that we have loss of heterozygosity, could be contamination with normal cells. This result suggests that a second hit occurred in the *BRCA2* gene that we see as loss of heterozygosity and in the *NF1* gene we assume that some event occurred other than the locus of the germinative mutation. One possible hypothesis would be deletions elsewhere in the *NF1* gene. These two events must have contributed to the early age that the proband diagnosed breast cancer: a very anticipated age relative to her family with HBOC syndrome and to the average age of breast cancer in patients with mutation in the *BRCA2* gene.

In the second tumor of the proband (invasive tumor at age 26) our analysis identified loss of heterozygosity in the *BRCA2* gene in the tumor sample, but did not identify any changes related to the *NF1* gene when the germinative mutation locus was analyzed. Perhaps the main cause of the invasive tumor in our case may have been tumor recurrence due to the characteristic

of breast cancer in patients with HBOC syndrome (second primary within the first 5 years of the cancer diagnosis estimated 8 to 12%).

Campos B (2013) concluded that awareness of the possibility of the simultaneous existence of two cancer predisposing conditions is important to identify the genetic origin of tumors, in order to achieve early detection of cancers, improve prognosis, and potentially offer a specific treatment to the patients (4). The National Comprehensive Cancer Network (NCCN version 1.2018) recommended annual breast screening with mammography begin at 30 years of age for NF1 patients, given the increased risk for early-onset breast cancer in these mutation carriers. And screening with breast MRI (magnetic resonance imaging) could also be considered. These screening recommendations apply only to individuals with clinical diagnosis of NF1. The presence of neurofibromas in the breast may lead to false-positive MRI results, but more data are needed. These special screening with MRI should be discontinued at 50 years of age, since the studies at age 50 breast cancer risk in women with NF1 is similar from that of women in the general population. There are no data regarding the benefit of risk-reducing mastectomy for this group of patients. Therefore, this surgery is not recommended, but this procedure may be considered based on family history (13).

To the best of our knowledge, this is the first case report of breast cancer in a patient with mutation in the *BRCA2* and *NF1* gene. We hope with this publication to contribute with knowledge about breast cancer in these special situations. The complexity of the pathogenesis of tumors and hereditary cancer remains to be elucidated.

In conclusion, analyzing tumor samples and population studies- group of patients with breast cancer in situations of hereditary breast cancer will help to establish the best management to improve screening and prevention in these cases.

## References

1. Uusitalo E, Rantanen M, Kallionpaa RA, Poyhonen M, Leppavirta J, Yla-Outinen H, Riccardi VM, Pukkala E, Pitkaniemi J, Peltonen S, Peltonen J (2016) Distinctive Cancer Associations in Patients With Neurofibromatosis type 1. *Journal of Clinical Oncology*. 34(17): 1978- 1986
2. Walker L, Thompson D, Easton D, Ponder B, Frayling I, Baralle D (2006) A prospective study of neurofibromatosis type I cancer incidence in the UK. *British Journal Cancer*. 95: 233- 238
3. Jeon YW, Kim MR, Lim ST, Choi HJ, Suh YJ (2015) Early-Onset Breast Cancer in a Family with Neurofibromatosis Type 1 Associated with a Germline Mutation in BRCA1. *J Breast Cancer* 18(1):97-100
4. Campos B, Balmaña J, Gardenyes J, Valenzuela I, Abad O, Fabregas P, Volpini V, Diez O (2013) Germline mutations in NF1 and BRCA1 in a family with neurofibromatosis type 1 and early-onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 139:597-602
5. Al-Mulla F, Bland JM, Serrat D, Miller J, Chu C, Taylor GT (2009) Age-dependent penetrance of different germline mutations in the BRCA1 gene. *J Clin Pathol*. 62(4): 350-356
6. Hartmann LC, Lindor NM (2016) The Role of Risk-Reducing Surgery in Hereditary Breast and Ovarian Cancer. *N England J Med* 374-375
7. Uusitalo E, Kallionpaa RA, Kurki S, Rantanen M, Pitkaniemi J, Kronqvist P, Harkonen P, Houvinen R, Carpen O, Poyhonen M, Peltonen S, Peltonen J (2016) Breast Cancer in neurofibromatosis type 1: overrepresentation of unfavourable prognostic factors. *British Journal Cancer* 1-7
8. Wang X, Teer J, Tousignant R, Levin AM, Boulware D, Chitale DA, Shaw BM, Chen Z, Zhang Y, Blakeley J, Acosta MT, Messiaen LM, Korf BR, Tainsky MA (2018) Breast cancer risk and germline genomic profiling of women with neurofibromatosis type 1 who developed breast cancer. *Genes Chromosomes & Cancer*. 57(1):19-27. doi: 10.1002/gcc.22503
9. Forbes SA, Beare D, Boutselakis H, Bamford S, Bindal N, Tate J, Cole CG, Dawson E, Ponting L, Stefancsik R, Harsha B, Kok CY, Jia M, Jubb H, Sondka Z, Thompson S, De T, Campbell PJ (2017) COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution. *Nucleic Acids Res*. 45(Database issue):D777-783
10. Philpott C, Tovell H, Frayling IM, Upadhyaya DN (2017) The NF1 somatic mutational landscape in sporadic human cancers. *Human Genomics* 11:13
11. Khalil J, Afif M, Elkacemi H, Benoulaid M, Kebdani T, Benjaafar N (2015) Breast cancer associated with neurofibromatosis type 1: a case series and review of the literature. *Journal of Medical Case Reports* 9:61
12. Ceccaroni M, Genuardi M, Legge F, Lucci-Cordisco E, Carrara S, D'amico F, Greggi S, Scambia G (2002) BRCA1-related malignancies in a family presenting with von Recklinghausen's disease. *Gynecol Oncol* 86(3):375-378



13.NCCN guidelines version 1.2018 Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian 2018: MS-45- MS-46, assessed on March 5 2018.

## 6 CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo geral deste trabalho é contribuir com a caracterização molecular e clínica e com a identificação de pacientes com a Síndrome HBOC na população brasileira. Para isso foi realizado uma revisão de artigos publicados até a presente data, com a identificação de alguns trabalhos que relatam a presença de 18-20% de mutações *BRCA* em pacientes afetados por câncer e com critérios de testagem. Ainda segue desconhecida na população brasileira a prevalência na população geral.

O primeiro objetivo específico é de descrever a frequência de pacientes que necessitariam de análise molecular nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em uma instituição específica arroladas no estudo multicêntrico AMAZONA III. Para esse objetivo foram analisadas as 112 pacientes com câncer de mama incluídas no Projeto Amazona III do Hospital São Lucas da PUCRS e foram identificadas 25,8% das pacientes com critérios de testagem molecular para síndrome HBOC. Neste estudo foram analisados apenas 3 critérios de testagem segundo o NCCN, os quais estavam disponíveis para serem analisados, independentemente, no banco de dados do estudo (idade no diagnóstico menor que 45 anos, câncer de mama triplo negativo abaixo dos 60 anos e história familiar de câncer de ovário). Esses dados estão subestimados, considerando que há critérios adicionais e que os dados clínicos e dados de história familiar obtidos não estavam completos. A ampliação deste estudo para incluir todas as 3000 pacientes do Projeto Amazona III poderá trazer importantes informações não somente sobre a demanda de atendimentos de avaliação de risco genético no país, como também sobre características específicas do perfil de risco genético em mulheres com câncer de mama em diferentes regiões.

O segundo objetivo específico é de descrever a prevalência de mutações patogênicas e VUS em *BRCA1* e *BRCA2* em uma série de casos de câncer de mama metastático do Rio Grande do Sul. Foram analisadas 69 pacientes e foram identificadas 16% de pacientes com mutação

patogênica em BRCA ½. Entre as portadoras de mutação, seis apresentavam mutação no gene *BRCA1*, quatro no gene *BRCA2* e uma paciente apresentava mutação patogênica em ambos os genes. A história familiar oncológica não foi registrada em 42% das pacientes e apenas em quatro probandos foram testados familiares, apesar do laboratório oferecer o teste da mutação familiar aos familiares também. Identificar familiares assintomáticos resulta em possibilidade de rastreamento precoce de câncer de mama e possibilidade de cirurgia redutora de risco de câncer de ovário (patologia não rastreável de forma precoce).

E o terceiro objetivo específico de descrever uma paciente com câncer de mama em idade muito jovem, portadora de mutações germinativas em *BRCA2* e *NF1*, avaliando a contribuição de perda de heterozigidade no câncer de mama para um possível efeito de antecipação da idade ao diagnóstico. Para esse objetivo foi realizada análise tumoral de uma paciente com câncer de mama aos 24 anos e com mutação patogênica em 2 genes diversos associados a câncer de mama: *NF1* e *BRCA2*. Uma vez que o câncer de mama em *BRCA2* usualmente ocorre em pacientes não tão jovens, surgiu a hipótese de associação da mutação dos 2 tumores terem causado uma antecipação na idade de acometimento do câncer na paciente, quando comparado com seus familiares. Como resultado, foi identificado perda de heterozigidade no gene *BRCA2* no câncer de mama invasor da paciente (recidiva de câncer da paciente). Foi identificado também, mutação pontual no locus da mutação germinativa no gene *NF1* da paciente no câncer de mama *in situ* (primeiro câncer da paciente aos 24 anos). E por fim, foi identificado mutação em 74% das leituras do G na mutação germinativa do gene *BRCA2* (c.7618-2A>G) da paciente no câncer de mama *in situ* (primeiro câncer da paciente), sugerindo perda de heterozigidade na maioria dos alelos. Esses achados sugerem como hipótese que no primeiro tumor da paciente aos 24 anos (*in situ*) a perda de heterozigidade em ambos os genes pode ter contribuído para a carcinogênese. Já na recidiva tumoral (invasora), a contribuição poder ter sido apenas do gene *BRCA2*. A realização de um painel no

tumor contemplando diversos genes associados a carcinogênese poderia contribuir para as hipóteses deste trabalho.

Análises de tumores, de casos clínicos e estudos populacionais de pacientes com câncer de mama hereditário é a melhor forma de melhorar e individualizar cada vez mais o tratamento e rastreamento nesses casos. Além disso, no Brasil, precisamos facilitar o acesso ao aconselhamento genético e testagem genética, uma vez que já existem evidências robustas de redução de incidência de câncer quando essas pacientes são identificadas assintomáticas e, também, de redução de mortalidade.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALEMAR, B. et al. BRCA1 and BRCA2 mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population? **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0187630, 2017. ISSN 1932-6203.

AMENDOLA, L. C. B.; VIEIRA, R. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Rev Bras Cancerol**, v. 51, n. 4, p. 325-30, 2005.

ANDRADE, K. C. et al. Early-onset breast cancer patients in the South and Southeast of Brazil should be tested for the TP53 p. R337H mutation. **Genetics and molecular biology**, v. 39, n. 2, p. 199-202, 2016. ISSN 1415-4757.

ANTONIOU, A.; EASTON, D. Models of genetic susceptibility to breast cancer. **Oncogene**, v. 25, n. 43, p. 5898, 2006. ISSN 1476-5594.

ANTONIOU, A. 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. ISSN 0002-9297.

APOSTOLOU, P.; FOSTIRA, F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. **BioMed research international**, v. 2013, 2013. ISSN 2314-6133.

ASHTON-PROLLA, P. et al. Development and validation of a simple questionnaire for the identification of hereditary breast cancer in primary care. **BMC cancer**, v. 9, n. 1, p. 283, 2009. ISSN 1471-2407.

ASHTON-PROLLA, P.; NETTO, C. B. D. O. Câncer de mama hereditário. In: BOFF R A e ET AL (Ed.). **Compendio de Mastologia: Abordagem Multidisciplina**: LEMAR, 2015. cap. 3, ISBN 9788599089880.

ASHTON-PROLLA, P.; SEUANEZ, H. N. The Brazilian Hereditary Cancer Network: historical aspects and challenges for clinical cancer genetics in the public health care system in Brazil. **Genetics and molecular biology**, v. 39, n. 2, p. 163-165, 2016. ISSN 1415-4757.

ASHWORTH, A.; et al. Inherited genetic factors and breast cancer In: JAY R. HARRIS, M. E. L. (Ed.). **Diseases of the Breast** Wolters Kluwer: Philadelphia, USA, 2014. cap. 16,

ATAOLLAHI, M. et al. Breast cancer and associated factors: a review. **Journal of medicine and life**, v. 8, n. Spec Iss 4, p. 6, 2015.

BALLINGER, M. L. et al. Baseline surveillance in Li-Fraumeni syndrome using whole-body magnetic resonance imaging: a meta-analysis. **JAMA oncology**, v. 3, n. 12, p. 1634-1639, 2017. ISSN 2374-2437.

BONADIES, D. C.; MOYER, A.; MATLOFF, E. T. What I wish I'd known before surgery: BRCA carriers' perspectives after bilateral salpingo-oophorectomy. **Familial cancer**, v. 10, n. 1, p. 79-85, 2011. ISSN 1389-9600.

BUYS, S. S. et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. **Cancer**, v. 123, n. 10, p. 1721-1730, 2017. ISSN 1097-0142.

CARRARO, D. M. 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. ISSN 1932-6203.

ECCLESTON, A. et al. A cost-effectiveness evaluation of germline BRCA1 and BRCA2 testing in UK women with ovarian cancer. **Value in Health**, v. 20, n. 4, p. 567-576, 2017. ISSN 1098-3015.

EUHUS, D. Genetic testing today. **Annals of surgical oncology**, v. 21, n. 10, p. 3209-3215, 2014. ISSN 1068-9265.

EWALD, I. P. et al. BRCA1 and BRCA2 rearrangements in Brazilian individuals with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. **Genetics and molecular biology**, v. 39, n. 2, p. 223-231, 2016. ISSN 1415-4757.

FERNANDES, G. C. et al. Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. **Oncotarget**, v. 7, n. 49, p. 80465, 2016.

GABAI-KAPARA, E. et al. Population-based screening for breast and ovarian cancer risk due to BRCA1 and BRCA2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 39, p. 14205-14210, 2014. ISSN 0027-8424.

GARICOCHEA, B. In: FRASSON, A.;NOVITA, G., *et al* (Ed.). **Guia de Bolso de Doenças da Mama 2ª** 2017. p.650 ISBN 9788538807858

GRAFFEO, R. et al. Time to incorporate germline multigene panel testing into breast and ovarian cancer patient care. **Breast cancer research and treatment**, v. 160, n. 3, p. 393-410, 2016. ISSN 0167-6806.

HARTMANN, L. C.; LINDOR, N. M. The role of risk-reducing surgery in hereditary breast and ovarian cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 5, p. 454-468, 2016. ISSN 0028-4793.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Pesquisa nacional de saúde**. 2013. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94074.pdf>>.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. 2018. Disponível em: <[www.inca.gov.br/](http://www.inca.gov.br/)>.

KORF, B. R.; MIKHAIL, F. M. Overview of genetic diagnosis in cancer. **Current protocols in human genetics**, v. 93, n. 1, p. 10.1. 1-10.1. 9, 2017. ISSN 1934-8266.

KURIAN, A. W. et al. Genetic testing and counseling among patients with newly diagnosed breast cancer. **Jama**, v. 317, n. 5, p. 531-534, 2017. ISSN 0098-7484.

MACEDO, G. S. et al. Rare germline variant (rs78378222) in the TP53 3'UTR: Evidence for a new mechanism of cancer predisposition in Li-Fraumeni syndrome. **Cancer genetics**, v. 209, n. 3, p. 97-106, 2016. ISSN 2210-7762.

MAKDISSI, F. B. A. BRCA1 e BRCA2: revisão. **GBETH News letter** v. 2, n. 31, p. 1-3, 2004.

MOYER, V. A. Risk assessment, genetic counseling, and genetic testing for BRCA-related cancer in women: US Preventive Services Task Force recommendation statement. **Annals of internal medicine**, v. 160, n. 4, p. 271-281, 2014. ISSN 0003-4819.

NCCN. National Comprehensive Cancer Network. Clinical practice guidelines in oncology (NCCN guidelines) Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. Version 1: MS-45- MS-46., 01 Mar 2018 2018. Disponível em: <[https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/genetics\\_screening.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_screening.pdf)>.

PALMERO, E. I. et al. Screening for germline BRCA1, BRCA2, TP53 and CHEK2 mutations in families at-risk for hereditary breast cancer identified in a population-based study from Southern Brazil. **Genetics and molecular biology**, v. 39, n. 2, p. 210-222, 2016. ISSN 1415-4757.

PALUCH-SHIMON, S. et al. Prevention and screening in BRCA mutation carriers and other breast/ovarian hereditary cancer syndromes: ESMO Clinical Practice Guidelines for cancer prevention and screening. **Annals of Oncology**, v. 27, n. suppl\_5, p. v103-v110, 2016. ISSN 1569-8041.

RICHARDS, S. 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. ISSN 1530-0366.

SILVA, F. C. et al. Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. **BMC medical genetics**, v. 15, n. 1, p. 55, 2014. ISSN 1471-2350.

STANISLAW, C.; XUE, Y.; WILCOX, W. 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.

TAKAOKA, M.; MIKI, Y. BRCA1 gene: function and deficiency. **International journal of clinical oncology**, v. 23, n. 1, p. 36-44, 2018. ISSN 1341-9625.

TUFFAHA, H. W. et al. Cost-effectiveness analysis of germ-line BRCA testing in women with breast cancer and cascade testing in family members of mutation carriers. **Genetics in Medicine**, 2018. ISSN 1530-0366.

## ANEXOS

## ANEXOS

## ANEXO I - CRITÉRIOS NCCN 2018

Printed by Alessandra Souza on 3/5/2018 1:39:53 AM. For personal use only. Not approved for distribution. Copyright © 2018 National Comprehensive Cancer Network, Inc., All Rights Reserved.



**NCCN Guidelines Version 1.2018**  
**Breast and/or Ovarian Cancer Genetic Assessment**

[NCCN Guidelines Index](#)  
[Table of Contents](#)  
[Discussion](#)

**CRITERIA FOR FURTHER GENETIC RISK EVALUATION<sup>a</sup>**

- An individual with an ovarian<sup>b</sup> cancer
- An individual with a breast cancer diagnosis meeting any of the following:
  - ▶ A known mutation in a cancer susceptibility gene within the family
  - ▶ Breast cancer diagnosed age ≤50 y
  - ▶ Triple negative (ER-, PR-, HER2-) breast cancer diagnosed ≤60 y
  - ▶ Two breast cancer primaries<sup>c</sup> in a single individual
  - ▶ Breast cancer at any age, and
    - ◊ ≥1 close blood relative<sup>d</sup> with breast cancer ≤50 y, or
    - ◊ ≥1 close blood relative<sup>d</sup> with invasive ovarian<sup>b</sup> cancer at any age, or
    - ◊ ≥2 close blood relatives<sup>d</sup> with breast cancer, prostate cancer (Gleason score ≥7 or metastatic), and/or pancreatic cancer at any age, or
    - ◊ Personal history of pancreatic cancer at any age, or
    - ◊ From a population at increased risk<sup>e</sup>
  - ▶ Male breast cancer
- An individual with metastatic prostate cancer (radiographic evidence of or biopsy-proven disease)
- An individual of Ashkenazi Jewish descent with breast, ovarian, or pancreatic cancer at any age
- An individual with a personal and/or family history of three or more of the following (especially if diagnosed age ≤50 y and can include multiple primary cancers in same individual): breast cancer, pancreatic cancer, prostate cancer (Gleason score ≥7 or metastatic), melanoma, sarcoma, adrenocortical carcinoma, brain tumors, leukemia, diffuse gastric cancer, colon cancer, endometrial cancer, thyroid cancer, kidney cancer, dermatologic manifestations<sup>g,h</sup> and/or macrocephaly, or hamartomatous polyps of gastrointestinal (GI) tract<sup>h</sup>
- An individual with no personal history of cancer but with
  - ▶ A close relative with any of the following:<sup>d,f</sup>
    - ◊ A known mutation in a cancer susceptibility gene within the family
    - ◊ ≥2 breast cancer primaries in a single individual
    - ◊ ≥2 individuals with breast cancer primaries on the same side of family with at least one diagnosed ≤50 y
    - ◊ Ovarian<sup>b</sup> cancer
    - ◊ Male breast cancer
  - ▶ First- or second-degree relative with breast cancer ≤45 y
  - ▶ Family history of three or more of the following (especially if diagnosed age ≤50 y and can include multiple primary cancers in same individual): breast cancer, pancreatic cancer, prostate cancer (Gleason score ≥7 or metastatic), melanoma, sarcoma, adrenocortical carcinoma, brain tumors, leukemia, diffuse gastric cancer, colon cancer, endometrial cancer, thyroid cancer, kidney cancer, dermatologic manifestations<sup>g,h</sup> and/or macrocephaly, or hamartomatous polyps of GI tract<sup>h</sup>

Consider referral to cancer genetics professional<sup>f</sup>

See Assessment (BR/OV-2)

<sup>a</sup>The criteria for further risk evaluation and genetic testing are not identical. For the purposes of these guidelines, invasive and ductal carcinoma in situ breast cancers should be included. The maternal and paternal sides of the family should be considered independently for familial patterns of cancer.

<sup>b</sup>Includes fallopian tube and primary peritoneal cancers. *BRCA*-related ovarian cancers are associated with epithelial, non-mucinous histology. Lynch syndrome can be associated with both non-mucinous and mucinous epithelial tumors. Be attentive for clinical evidence of Lynch syndrome (See [NCCN Guidelines for Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal](#)). Specific types of non-epithelial ovarian cancers and tumors can also be associated with other rare syndromes. Examples include an association between sex-cord tumors with annular tubules and Peutz-Jeghers syndrome or Sertoli-Leydig tumors and DICER1-related disorders

<sup>c</sup>Two breast cancer primaries includes bilateral (contralateral) disease or two or more clearly separate ipsilateral primary tumors either diagnosed synchronously or asynchronously.

<sup>d</sup>Close blood relatives include first-, second-, and third-degree relatives. (See [BR/OV-B](#))

<sup>e</sup>For populations at increased risk due to founder mutations, requirements for inclusion may be modified.

<sup>f</sup>For lobular breast cancer with a family history of diffuse gastric cancer, *CDH1* gene testing should be considered.<sup>i</sup>

<sup>g</sup>For dermatologic manifestations, see [COWD-1](#).

<sup>h</sup>For hamartomatous colon polyps in conjunction with breast cancer and hyperpigmented macules of the lips and oral mucosa, *STK11* testing should be considered. See [NCCN Guidelines for Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal](#)—Peutz-Jeghers syndrome. Melanoma has been reported in some *BRCA*-related families.

<sup>i</sup>For further details regarding the nuances of genetic counseling and testing, see [BR/OV-A](#).

**Note:** All recommendations are category 2A unless otherwise indicated.

**Clinical Trials:** NCCN believes that the best management of any patient with cancer is in a clinical trial. Participation in clinical trials is especially encouraged.

Version 1.2018, 10/03/17 © National Comprehensive Cancer Network, Inc., 2017. All rights reserved. The NCCN Guidelines® and this illustration may not be reproduced in any form without the express written permission of NCCN®.

BR/OV-1



## ANEXO II - TERMO DE CONSENTIMENTO

### ESTUDO AMAZONA III -TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Versão final de 27 de outubro de 2015.**

**Protocolo: AVALIAÇÃO PROSPECTIVA DA CASUÍSTICA DE CÂNCER DE MAMA EM INSTITUIÇÕES DE SAÚDE BRASILEIRAS  
ESTUDO AMAZONA III**

Patrocinador: Grupo Brasileiro de Estudos do Câncer de Mama (GBECAM)

#### **Introdução**

Você está sendo convidada a participar de um estudo clínico. Médicos de diferentes centros de pesquisa do Grupo Brasileiro de Estudos do Câncer de Mama (GBECAM) estudam a natureza dos tumores de mama e procuram desenvolver melhores métodos para diagnóstico e tratamento dessa doença. Isso é chamado Pesquisa Clínica. Com o objetivo de decidir se você concorda ou não em fazer parte dessa pesquisa, você deverá entender o suficiente sobre os seus riscos e benefícios, para que possa fazer um julgamento adequado. Esse processo é conhecido como consentimento livre e esclarecido.

Este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) fornece informações detalhadas sobre o estudo clínico, as quais serão discutidas com você pelo seu médico. Uma vez que você tiver compreendido a natureza do estudo, se você desejar participar, deverá assinar este documento, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Você ficará com uma via desse documento que deverá ser guardada.

O estudo clínico que está sendo proposto para você é:

**Avaliação prospectiva da casuística de câncer de mama em instituições de saúde brasileiras - ESTUDO AMAZONA III.**

Rubricas: Participante da pesquisa/ Representante legal: \_\_\_\_\_ Testemunha: \_\_\_\_\_  
Pesquisador: \_\_\_\_\_

Termo de consentimento livre e esclarecido \_ESTUDO AMAZONA III \_versão 3.0 final datada de 27 de outubro de 2015.

#### **Nome da Instituição**

União Brasileira de Educação e Assistência (Núcleo de Pesquisa em Oncologia)/Hospital São Lucas da PUCRS

#### **Nome completo da paciente**

#### **Número do prontuário da paciente**

ESTUDO AMAZONA III

#### **Informações sobre o estudo**

Você está sendo convidada para participar desse estudo por ter sido diagnosticada com câncer de mama. Este estudo tem por objetivo aumentar o conhecimento do câncer de mama no Brasil, por exemplo: como é diagnosticado e tratado, se existem diferenças no tratamento entre as diferentes regiões do país e quais são os pontos do diagnóstico e do tratamento que necessitam de melhoria. Os médicos do GBECAM esperam contribuir com a melhoria das políticas públicas e assim, aumentar a sobrevivência do câncer de mama no país e a qualidade de vida das pacientes que enfrentam esta doença.

Para isso, é preciso que os médicos colem e analisem as informações do tratamento de pacientes desde quando foram diagnosticadas. Estas informações serão anotadas em um formulário eletrônico e depois serão analisadas para gerar um relatório.

Portanto, se você decidir participar deste estudo, não haverá nenhuma diferença na sua rotina de atendimento para pacientes com câncer de mama. Os médicos apenas vão anotar as características do seu tumor e o tratamento que você vai receber.

Este estudo será realizado somente no Brasil, em aproximadamente 25 centros de pesquisa e tratamento do câncer, e os médicos vão anotar os dados de mais ou menos 3 mil mulheres brasileiras diagnosticadas com câncer de mama durante a realização do estudo.

Se você decidir participar desse estudo, você terá que fazer o seguinte:

1. Você deve assinar o TCLE (este documento que você está lendo agora). Este documento explica os objetivos e tudo o que será feito no estudo, seus direitos e suas responsabilidades. Ele é exigido para todas as pesquisas envolvendo seres humanos.
2. Você comparecerá nas consultas médicas de rotina do seu tratamento que será definida pelo seu médico. Não haverá alteração desta rotina por causa deste estudo.
3. Seu médico vai anotar algumas informações suas como: data de nascimento, história familiar (se há casos de câncer na família), alguns hábitos; algumas informações sobre o exame físico que ele vai realizar em você (altura, peso, tamanho do tumor); todos os seus exames e todos os detalhes do seu tratamento em um formulário específico durante todo o período de tratamento.

Você nunca será identificada em qualquer relato dos resultados do estudo.

Rubricas: Participante da pesquisa/ Representante legal: \_\_\_\_\_ Testemunha: \_\_\_\_\_ Pesquisador: \_\_\_\_\_

Termo de consentimento livre e esclarecido \_ESTUDO AMAZONA III \_versão 3.0 final datada de 27 de outubro de 2015.

ESTUDO AMAZONA III

### **Sua participação no estudo é voluntária!**

A escolha de participar desse estudo depende da sua vontade. Qualquer que seja a sua decisão, ela não irá de forma alguma afetar a qualidade de seu tratamento. Se você não quiser participar desta pesquisa, não haverá nenhum problema para seu tratamento e nem para relação com seu médico (ele não vai ficar bravo).

E se você decidir participar dessa pesquisa, mas depois se arrepender, você poderá deixar a pesquisa a qualquer momento, bastando informar seu médico. O médico do estudo pode também interromper sua participação sem a sua permissão se ele achar que isto é o melhor para você, ou se existirem motivos administrativos. Neste caso, o seu médico irá explicar porque a interrupção foi necessária.

### **Procedimentos realizados neste estudo**

O seu médico irá tratá-la de acordo com a sua prática habitual de tratamento para sua doença. Você não terá consultas com seu médico além do que o previsto para seu tratamento e nem terá que fazer exames além daqueles que terá que fazer para acompanhar sua doença.

Apenas serão anotadas informações sobre você e sobre sua doença, como:

- sua idade, quando começou a menstruar, se está ou não na menopausa, se tem alguém na sua família que teve câncer de mama ou de ovário; - tipo de câncer de mama que você tem, tipos de tratamento que você vai fazer e por quanto tempo.

Estas informações serão anotadas em um formulário eletrônico (isto é, este formulário estará na internet). Só algumas pessoas poderão acessar estas informações, como seu médico e a equipe dele.

Você nunca será identificada em qualquer uma destas anotações. As pacientes receberão um código de números e é através deste código e pelas iniciais de seus nomes que as pacientes serão identificadas no formulário eletrônico.

### **Possíveis Riscos e Benefícios**

Neste estudo serão coletados dados sobre a sua doença que serão muito importantes para o benefício de outros pacientes que possuem a mesma doença que a sua. Mas isso não quer dizer que haverá um benefício direto para você, além da assistência médica habitual.

Rubricas: Participante da pesquisa/ Representante legal: \_\_\_\_\_ Testemunha: \_\_\_\_\_ Pesquisador: \_\_\_\_\_

Termo de consentimento livre e esclarecido \_ESTUDO AMAZONA III \_versão 3.0 final datada de 27 de outubro de 2015.

ESTUDO AMAZONA III

Da mesma forma, os riscos serão os que você terá com seu tratamento e seu médico conversará sobre isso com você. Há também um risco de quebra de confidencialidade e a abertura acidental dos seus dados biológicos e clínicos pseudo-anônimos (codificados).

### **Confidencialidade**

Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos sob sigilo e confidencialidade. Você será identificada somente pelas suas iniciais e pelo seu número no estudo. Você não será identificado em nenhum relatório ou publicação resultante deste estudo.

Todas as legislações, resoluções e códigos de ética brasileiros serão cumpridos no decorrer deste estudo.

**Novas Informações**

Você será comunicada sobre quaisquer novas informações importantes a respeito deste estudo que possam afetar sua vontade de continuar participando. Será solicitado que você assine um novo documento explicando que foi informada sobre tais novidades.

**Custos da participação**

Você não terá despesas pessoais em qualquer fase do estudo e também não haverá pagamento relacionado à sua participação.

**Compensação por lesão ou doença**

Como este estudo não envolve pesquisa de remédios nem nada que possa comprometer sua saúde, o GBECAM não se responsabilizará pelas despesas médicas decorrentes de sua participação neste estudo, nem pela indenização referente à reparação de qualquer dano durante seu tratamento.

A Instituição onde você está sendo tratada e seu médico serão responsáveis pelas despesas que forem, de alguma forma, atribuídas à negligência ou má-conduta de pessoas empregadas ou agindo em nome desta Instituição.

**Obtendo Informações Adicionais**

Você pode fazer as perguntas que quiser sobre o estudo, a qualquer momento. Se você tiver qualquer problema ou perguntas adicionais sobre o estudo ou sobre os seus direitos, ligue para Dr. Carlos Henrique Escosteguy Barrios no telefone (51)98400425. Telefone 24 horas: (51)99892254 (neste número, se necessário é possível ligar à cobrar, acrescentando o prefixo 9090+ número do celular).

Rubricas: Participante da pesquisa/ Representante legal: \_\_\_\_\_ Testemunha: \_\_\_\_\_ Pesquisador: \_\_\_\_\_

Termo de consentimento livre e esclarecido \_ESTUDO AMAZONA III \_versão 3.0 final datada de 27 de outubro de 2015.

**ESTUDO AMAZONA III**

Você também pode ligar para o Comitê de Ética em Pesquisa desta instituição que aprovou a realização deste estudo nesta instituição, no endereço Avenida Ipiranga, 6681/prédio 50 sala 703, CEP:90619-900, bairro: Jardim Botânico, Porto Alegre-RS ou no telefone (51)33203345.

Este termo de consentimento será preenchido em duas vias, ambas identificadas com o seu nome e do seu representante legal, se houver, datadas e assinadas, sendo que uma será retida por você, ou por seu representante legal, e outra arquivada pelo pesquisador.

**Declaração de consentimento**

Li e compreendi as informações que descrevem este estudo, apresentadas neste termo de consentimento livre e esclarecido. O médico do estudo esclareceu essas informações e respondeu todas as minhas dúvidas. Concordo de forma espontânea em participar deste estudo. Autorizo a liberação de meus registros médicos relacionados a este estudo, inclusive do termo de consentimento assinado, ao patrocinador e seus representantes e para as agências governamentais do país, se for exigida.

Ao assinar este termo, não renuncio a nenhum de meus direitos legais como participante de um estudo. Recebi uma via assinada e datada deste termo de consentimento para guardar comigo.

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Nome e Assinatura do investigador Principal ou pessoa por ele delegada

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Nome e Assinatura do paciente ou representante legal (se aplicável)

\_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Nome e Assinatura da Testemunha (se aplicável)

Rubricas: Participante da pesquisa/ Representante legal: \_\_\_\_\_ Testemunha: \_\_\_\_\_ Pesquisador: \_\_\_\_\_

Termo de consentimento livre e esclarecido \_ESTUDO AMAZONA III \_versão 3.0 final datada de 27 de outubro de 2015.

## ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO DE COLETA DE SANGUE PARA BRCA PELO LABORATORIO PATHWAY GENOMIC



### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente para Exame Genético de Câncer de Mama ("BRCA") - Brasil

Data de vigência — 16 de abril de 2015

**IMPORTANTE — INSTRUÇÕES PARA O PROFISSIONAL DE SAÚDE:** O laboratório de exames nos EUA somente aceitará amostras e requisições de exames que obedecem a seguinte técnica de anonimato para proteger a identidade do paciente e que estejam em conformidade com determinadas regras de transferência internacional.

- O profissional de saúde requisitante deve, obrigatoriamente: (a) dar anonimato a todas as amostras e requisições de exames usando um IDENTIFICADOR ALFANUMÉRICO PARA O PACIENTE antes da transferência para o laboratório de exames nos EUA ("lab"); (b) manter uma cópia assinada deste Termo de Consentimento e NÃO fornecer uma cópia para o laboratório nos EUA e (c) NÃO usar o nome, endereço, e-mail ou outras informações de contato do paciente nas comunicações com o laboratório. Kits de coleta de amostras que não cumpram estas instruções serão rejeitados e destruídos pelo laboratório no prazo de 60 (sessenta) dias a partir da data da coleta.

**IMPORTANTE — USUÁRIOS NÃO NORTE-AMERICANOS**

**Autorização para a Transferência Internacional de Dados:** Declaro estar ciente de que os presentes exames para BRCA exigem de mim a seguinte autorização voluntária. Tenho a alternativa de optar por não participar dos exames.

Quando um profissional de saúde requisita exames genéticos, EU AUTORIZO E DOU MEU CONSENTIMENTO PARA QUE A AMOSTRA E DADOS PESSOAIS LIMITADOS SEJAM ENVIADOS A UM LABORATÓRIO LOCALIZADO NOS ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA ("EUA"), a Pathway Genomics Corporation ("Pathway"), PARA EXAMES, TESTES E ANÁLISES VISANDO A EXAMES E ANÁLISES PARA CUIDADOS DE SAÚDE.

- Eu compreendo que devo verificar se meu profissional de saúde usa um identificador de pacientes anônimos tanto na amostra quanto na requisição de exames antes da transferência para o laboratório da Pathway nos EUA. Também compreendo que os kits de coleta de amostras que não estejam em conformidade com as INSTRUÇÕES PARA O PROFISSIONAL DE SAÚDE acima, no prazo de 60 (sessenta) dias a partir da data da coleta, serão rejeitados e destruídos pelo laboratório, o qual notificará meu profissional de saúde para que envie outra amostra. Esta técnica de anonimato é usada para proteger os dados pessoais coletados, de modo a estar em conformidade com os regulamentos de transferência internacional de dados.
- Estou ciente de que posso pedir para ver minha requisição de exames a fim de revisar os dados pessoais limitados, associados a um identificador de paciente anônimo, necessários para a realização dos exames de BRCA com precisão ou em obediência a regulamentos do laboratório. Embora a Pathway esteja sujeita a controles rígidos de segurança e confidencialidade, eu compreendo que o profissional de saúde solicitante não será responsável pelas informações após sua transferência. Estou ciente de que o presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido terá vigência pelo prazo determinado de um ano.

Assinatura do paciente ou representante legal \_\_\_\_\_

Data \_\_\_\_\_

A precisão dos métodos de exame genético e relatórios foram determinados e verificados para que atendam aos padrões de desempenho regulamentares exigidos pela Pathway Genomics Corporation ("Pathway Genomics"), laboratório licenciado, certificado pelo CAP (College of American Pathologists — Colégio Americano de Patologistas) e reconhecido pelo CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) do governo dos EUA.

**Eu compreendo as seguintes informações sobre o objetivo geral dos exames.**

- Estou ciente de que, dependendo dos exames genéticos específicos solicitados pelo profissional de saúde no formulário de requisição da Pathway Genomics, minha amostra será analisada relativamente à minha composição genética relacionada exclusivamente ao meu grau de risco genético para câncer de mama hereditário relacionado ao BRCA. Muitos tipos de câncer não são hereditários, ocorrendo durante a vida de uma pessoa, sendo por isso que as atividades de prevenção contínuas e regulares são importantes. Entendo e concordo que aquilo que a Pathway venha a incluir nos seus relatórios é determinado a critério único e exclusivo da Pathway.

**Eu compreendo que os resultados dos exames genéticos para câncer hereditário podem ajudar um profissional de saúde qualificado e a mim a saber mais sobre minha suscetibilidade a certos tipos de câncer e como eu poderia reduzir meu risco de câncer por meio de triagem e tratamento médico.** Entendo que há vários tipos de resultados que podem ser gerados, inclusive:

- Variante/mutação patogênica detectada — uma variante ou mutação patogênica pode ser identificada na minha composição genética associada ao aumento do risco de câncer hereditário. Ter esta informação pode ajudar a mim e ao meu profissional de saúde a fazer escolhas mais informadas sobre a minha saúde, inclusive o rastreamento e tratamento médico com base no que se sabe sobre o(s) gene(s) em que foi encontrada uma variante/mutação e o câncer a ela associado.
- Possível variante/mutação patogênica detectada — uma possível variante/mutação patogênica pode ser identificada na minha composição genética, associada ao aumento do risco de câncer hereditário. Ter esta informação pode ajudar a mim e ao meu profissional de saúde a fazer escolhas mais informadas sobre a minha saúde, inclusive o rastreamento e tratamento médico com base no que se sabe sobre o(s) gene(s) em que foi encontrada uma variante/mutação e o câncer a ela associado.
- Nenhuma variante/mutação patogênica detectada — nenhuma variante/mutação significativa foi identificada na minha composição genética. Se ninguém na minha família, inclusive eu, teve câncer, ainda tenho, pelo menos, o mesmo risco de câncer de uma pessoa na população em geral. Posso ainda ter um risco de câncer hereditário acima da média devido a uma predisposição genética que não pode ser detectada por este exame, quer no(s) gene(s) para os quais estou sendo examinado(a) ou em outro gene ligado ao câncer hereditário.
- Variante/mutação de patogenicidade incerta detectada — uma variante/mutação de patogenicidade incerta pode ser detectada. Esse tipo de mudança pode ou não estar associado a um risco aumentado de câncer. Estou ciente e compreendo que posso ter o mesmo risco de câncer da população em geral e que posso ainda ter risco superior à média devido a uma predisposição genética que não pode ser detectada por este exame. Entendo também que, à medida que as informações clínicas e científicas evoluem, eu posso vir a receber informações atualizadas sobre a interpretação dos meus resultados.

**Estou ciente e compreendo os riscos gerais e as limitações dos exames genéticos, inclusive o seguinte:**

- Nos exames são usadas amostras de saliva ou sangue. Os efeitos colaterais da coleta de sangue são raros, mas podem abranger tontura, desmaio, dor, sangramento, hematomas e, raramente, infecção.
- Os exames genéticos não devem ser usados como substitutos seja para o diagnóstico e tratamento de doenças seja para a prestação adequada de serviços de saúde por um médico ou outro profissional de saúde qualificado.

Este documento contém informações confidenciais, com direitos protegidos, destinado ao uso da Pathway Genomics. É proibida a cópia ou reprodução sem autorização por escrito da Pathway Genomics. Feito com o Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente para Exames Genéticos de Câncer de Mama — Brasil T-0428-001

Page 1 of 2



- A presença de uma variante/mutação patogênica ou de outra forma significativa não significa que eu vá desenvolver câncer. A ausência de variante(s)/mutação(ões) não significa que eu não venha a desenvolver câncer. As causas genéticas de alguns tipos de câncer não foram determinadas. A gravidade dos sintomas pode variar de pessoa para pessoa.
- Os genes são um dos vários fatores que podem contribuir para o desenvolvimento de câncer. Outros fatores, tais como a exposição a substâncias causadoras de câncer, a alimentação, o histórico médico pessoal e familiar e as escolhas de comportamento e estilo de vida também contribuem para o risco de desenvolvimento de câncer.
- O câncer pode parecer "acompanhar a família", mesmo que possa não ser causado por uma variante/mutação patogênica detectável por este exame. Tal situação poderia, por exemplo, ser causada por um ambiente ou estilo de vida compartilhado como, por exemplo, o hábito de fumar.
- Exames de acompanhamento familiar: entendo que, caso eu tenha uma variante/mutação genética associada a um risco aumentado de câncer, meus familiares podem ser examinados para verificar se herdaram a mesma variante/mutação que eu. A Pathway oferece esses exames.
- Mesmo que uma variante/mutação esteja presente em uma família, isso não significa que todos na família tenham herdado esta variante/mutação. O padrão de herança pode ser explicado por um especialista em genética ou profissional de saúde qualificado. Entender isso pode ajudar a mim e meus familiares a nos prepararmos para situações diversas e complexas. Entendo que um especialista em genética ou outro profissional de saúde qualificado pode me ajudar a avaliar os prós e contras de conversar primeiro com os membros da família, antes de me submeter aos exames, para saber se eles vão querer saber meus resultados. Estou ciente de que, por vezes, segredos de família ligados a paternidade, adoção ou outras questões delicadas podem surgir.
- Este exame pode não fornecer resultados relevantes por outras razões, tais como: (1) fatores não genéticos; (2) variações genéticas individuais; (3) informações científicas insuficientes sobre a relação entre informações genéticas e a saúde real; (4) diversas questões técnicas, laboratoriais e não laboratoriais e (5) informações incompletas da sequência genética.
- Outros riscos que podem ocorrer como resultado deste exame abrangem: preocupação injustificada e/ou falsa confiança, que podem desestimular as ações preventivas, questões emocionais relacionadas, impacto sobre as decisões de mudança de vida, potencial de discriminação genética (por exemplo, nas áreas de emprego e de seguros) e quebra da confidencialidade. Os resultados dos exames e as informações podem tornar-se parte do meu histórico médico permanente e podem estar disponíveis para indivíduos e organizações com acesso legal a esses registros.

**Estou ciente e compreendo que é extremamente recomendável que eu tenha orientação/conselho antes e após o exame por alguém com formação profissional na área da genética do câncer para avaliar a finalidade, o significado, os riscos, benefícios e limitações, bem como as alternativas para os exames genéticos na minha situação específica, inclusive meu histórico médico pessoal e familiar.** O aconselhamento pode ser dado por um especialista em genética, médico ou outro profissional de saúde qualificado. O aconselhamento/orientação antes do exame pode ajudar a me preparar melhor para receber os resultados e permitir a avaliação prévia de opções médicas e o impacto que os resultados do exame podem ter sobre mim e meus familiares. O aconselhamento/orientação após o exame dá uma oportunidade valiosa para, entre outras, a compreensão das interpretações médicas de variantes/mutações detectadas, dos riscos psicológicos e dos benefícios trazidos pelo conhecimento dos resultados dos meus exames genéticos, de como as famílias herdam cânceres e o risco de passar uma variante/mutação hereditária aos meus filhos, das opções para exames independentes adicionais bem como a importância de continuar as atividades regulares de vigilância e prevenção do câncer.

**Estou ciente de que, se os resultados dos exames não forem conclusivos, pode me ser solicitada a coleta de amostra(s) adicional(is).** Todos os termos do presente Termo de Consentimento se estendem a dita(s) amostra(s) adicional(is).

**Declaro ainda que estou ciente e compreendo as seguintes informações relativas à confidencialidade e à divulgação das minhas informações pessoais:**

- Minhas informações pessoais limitadas e os resultados dos exames são confidenciais. Embora não possa haver garantia integral de confidencialidade, a Pathway Genomics estabeleceu salvaguardas razoáveis para protegê-la. Essas informações e os resultados dos exames serão entregues ao profissional de saúde solicitante.
- Essas informações e os resultados também podem ser divulgados quando exigido por lei, por exemplo, em obediência a uma intimação judicial.
- Compreendo que, se eu compartilhar essas informações ou os resultados dos exames com outras pessoas, sou responsável por qualquer comprometimento à confidencialidade que possa resultar de tal divulgação.
- A(s) amostra(s) original(is) será(ão) armazenada(s) de forma segura por pelo menos 60(sessenta) dias a partir da data da coleta e qualquer DNA isolado restante poderá ser armazenado de forma segura, em conformidade com as leis, regulamentos e procedimentos operacionais padrão do laboratório.

**Estou ciente de que posso cancelar o meu consentimento para os exames antes dos exames serem executados mediante notificação formal, por escrito, ao profissional de saúde solicitante, o qual disso dará ciência à Pathway.**

**Perguntas:** Caso eu venha a ter outras dúvidas sobre o exame, compreendo que posso entrar em contato com o profissional de saúde solicitante.

#### **Manifestação de Consentimento Livre e Esclarecido**

**Eu compreendo que este exame é voluntário e dou meu livre consentimento à sua execução.** Minha assinatura abaixo reconhece que:

- Eu entendo a língua portuguesa escrita o suficiente e que eu li e entendi todo o presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Todas as minhas perguntas foram respondidas à minha satisfação e eu concordo com a realização dos exames. Estou ciente de que posso receber uma cópia do presente.
- Tenho idade igual ou superior a 18 anos.

Assinatura do paciente ou representante legal

Data

Este documento contém informações confidenciais, com direitos protegidos, destinado ao uso da Pathway Genomics. É proibida a cópia ou reprodução sem autorização por escrito da Pathway Genomics. Feito com o Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente para Exames Genéticos de Câncer de Mama — Brasil T-0428-001 Page 2 of 2

Scanned by CamScanner



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente

## ANEXO IV - ROLL DE PROCEDIMENTOS E EVENTOS EM SAUDE 2018

### DIRETRIZES DE UTILIZACAO PARA COBERTURA DE PROCEDIMENTOS NA SAUDE SUPLEMENTAR

PAGINAS 95 -100

#### ITEM 110.7: CANCER DE MAMA E OVARIO HEREDITARIOS – GENES BRCA1 E BRCA2

1. Cobertura obrigatória para mulheres com diagnóstico atual ou prévio de câncer de mama quando preenchido pelo menos um dos seguintes critérios:

a. b.

Diagnóstico de câncer de mama em idade  $\leq 35$  anos; Diagnóstico de câncer de mama em idade  $\leq 50$  anos e mais um dos seguintes critérios:

um segundo tumor primário da mama (\*);  $\geq 1$  familiar de 1o, 2o e 3o graus com câncer de mama e/ou ovário; Diagnóstico de câncer de mama em idade  $\leq 60$  anos se câncer de mama triplo

I. II. c. negativo (Receptor de estrogênio (RE), Receptor de progesterona (RP) e Receptor HER2 negativos);

d. Diagnóstico de câncer de mama em qualquer idade e mais um dos seguintes:

I. anos; II.  $\geq 1$  familiar de 1o, 2o e 3o graus com câncer de mama masculino em qualquer idade; III.

$\geq 1$  familiar de 1o, 2o e 3o graus com câncer de ovário em qualquer idade; IV.  $\geq 2$

familiares de 1o, 2o e 3o graus do mesmo lado da família com câncer de mama em qualquer idade; V.

$\geq 2$  familiares de 1o, 2o e 3o graus do mesmo lado da família com câncer de pâncreas ou próstata

(score de Gleason  $> 7$ ) em qualquer idade. (\*) (\*) No caso de câncer de mama bilateral ou duas neoplasias primárias na mesma mama (comprovado por laudos anatomo-patológicos), cada um dos tumores deve ser considerado independentemente.

2. Cobertura obrigatória para mulheres com diagnóstico atual ou prévio de câncer de ovário (tumor epitelial) em qualquer idade e independente da história familiar.

3. Cobertura obrigatória para homens com diagnóstico atual ou prévio de câncer de mama em qualquer idade e independente da história familiar.

4. Cobertura obrigatória para pacientes com câncer de pâncreas e  $\geq 2$  familiares de 1o, 2o e 3o graus do mesmo lado da família com câncer de mama e/ou ovário e/ou pâncreas ou próstata (score de Gleason  $\geq 7$ ) em qualquer idade.

5. Cobertura obrigatória para pacientes com câncer de próstata (score de Gleason  $\geq 7$ ) e  $\geq 2$  familiares de 1o, 2o e 3o graus do mesmo lado da família com câncer de mama e/ou ovário e/ou pâncreas ou próstata (score de Gleason  $\geq 7$ ) em qualquer idade.

6. Cobertura obrigatória para teste das 3 mutações fundadoras Ashkenazi nos genes BRCA1 e BRCA2 em pacientes de origem judaica Ashkenazi quando preenchido pelo menos um dos seguintes critérios:

a. câncer de mama em qualquer idade e independente da história familiar;

b. câncer de ovário em qualquer idade e independente da história familiar; c. câncer de pâncreas em qualquer idade com  $\geq 1$  familiar de 1o, 2o e 3o. graus com

câncer de mama, ovário, pâncreas ou próstata (score Gleason  $\geq 7$ ).

7. Cobertura obrigatória para pacientes maiores de 18 anos, diagnosticados ou não com câncer, independente do sexo, quando houver mutação deletéria em BRCA1 ou BRCA2 em familiar de 1o, 2o e 3o graus.

8. Cobertura obrigatória para indivíduos com câncer de mama isolado, que tenham estrutura familiar limitada. Estrutura familiar limitada é a ausência, em pelo menos um dos ramos (materno ou paterno) da família, de pelo menos 2 mulheres familiares de 1o, 2o ou 3o graus que tenha vivido além dos 45 anos de idade no momento da avaliação. Incluem-se nesta descrição indivíduos que desconhecem dados de sua família biológica.

8. Cobertura obrigatória para indivíduos com câncer de mama, mas com estrutura familiar limitada (ausência de 2 familiares de 1o, 2o ou 3o graus do sexo feminino em uma das linhagens – materna ou

paterna - que tenha vivido além dos 45 anos de idade). Método de análise utilizado de forma escalonada:

1. Nos casos em que a mutação genética já foi identificada na família, realizar apenas a pesquisa da mutação específica. Para pacientes de origem judaica Ashkenazi nos quais a mutação familiar for uma mutação fundadora, está justificada a realização da análise das 3 mutações fundadoras Ashkenazi ao invés da análise somente da mutação familiar pela possibilidade da ocorrência de mais de uma mutação em genes BRCA em famílias Ashkenazi. Se a família for de origem judaica Ashkenazi e a mutação familiar não for uma das 3 mutações fundadoras, ainda assim justifica-se a realização do teste destas 3 mutações além da mutação que sabidamente segrega na família.
2. Nos casos de pacientes elencados nos itens 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 realizar o exame Sequenciamento de Nova Geração de toda região codificadora de BRCA1 e BRCA2 e MLPA de BRCA1 e BRCA2;
3. Nos casos de pacientes enquadrados no item 6, realizar teste das 3 mutações fundadoras Ashkenazi nos genes BRCA1 e BRCA2, a saber: BRCA1 185delAG (c.66\_67delAG, p.Glu23fs), BRCA1 5382insC (c.5263insC, p.Gln1756fs), e BRCA2

6174delT (c.5946delT, p.Ser1982fs). Se nenhuma destas mutações for identificada e outros critérios de elegibilidade forem contemplados conforme descrito nos itens 1, 2, 3, 4, 5, 7 e 8, deve ser realizada a análise seguindo os critérios de análise escalona descrito para cada item.

OBS 1: Pacientes enquadradas nesta diretriz e com sequenciamento e MLPA para BRCA1 e BRCA2 negativos, devem ser referenciadas para Diretriz de Painel de câncer de mama e/ou ovário.

OBS 2: Pacientes enquadradas nesta diretriz e que simultaneamente preencham os critérios da Diretriz de Painel de câncer de mama e/ou ovário podem ser referenciadas diretamente para a Diretriz de Painel de câncer de mama e/ou ovário.

OBS 3: Nos pacientes em que forem encontradas mutações patogênicas ou provavelmente patogênicas nos genes BRCA1 ou BRCA2, mesmo que assintomáticos, a mastectomia e a salpingo-ooforectomia redutoras de risco, bem como a reconstrução das mamas são de cobertura obrigatória da mesma forma que a cobertura prevista para pacientes com diagnóstico de câncer, quando indicado pelo médico assistente. Caso a beneficiária não deseje realizar mastectomia a ressonância magnética das mamas anual é de cobertura obrigatória.

OBS 4: Quando da realização de salpingo-ooforectomia redutora de risco em portadoras de mutação de BRCA1 e/ou BRCA2, a análise patológica dos anexos excisados deve ser realizada minuciosamente seguindo protocolo específico.

OBS 5: Para fins desta DUT, tumores invasivos e *in situ* da mama serão considerados igualmente na definição “câncer de mama”. Para fins desta DUT, serão incluídos na definição “câncer de ovário” os tumores epiteliais de ovário, trompas de falópio e tumores primários de peritônio.

Referências Bibliográficas: 1. Carraro DM, Koike Folgueira MA, Garcia Lisboa BC, Ribeiro Olivieri EH, Vitorino Krepschi AC, de Carvalho AF, de Carvalho Mota LD, Puga RD, do Socorro Maciel M, Michelli RA, de Lyra EC, Grosso SH, Soares FA, Achatz MI, Brentani H, Moreira-Filho CA, Brentani MM. Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. PLoS One. 2013;8(3):e57581. doi: 10.1371/journal.pone.0057581. Epub 2013 Mar 1. 2. Couch FJ, Hart SN, Sharma P, Toland AE, Wang X, Miron P, Olson JE, Godwin AK, Pankratz VS, Olswold C, Slettedahl S, Hallberg E, Guidugli L, Davila JI, Beckmann MW,

Janni W, Rack B, Ekici AB, Slamon DJ, Konstantopoulou I, Fostira F, Vratimos A, Fountzilias G, Pelttari LM, Tapper WJ, Durcan L, Cross SS, Pilarski R, Shapiro CL, Klemp J, Yao S, Garber J, Cox A, Brauch H, Ambrosone C, Nevanlinna H, Yannoukakos D, Slager SL, Vachon CM, Eccles DM, Fasching PA. Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer. J Clin Oncol. 2015; 33(4):304-11. doi: 10.1200/JCO.2014.57.1414. Epub 2014 Dec 1.

3. Euhus DM, Robinson L. Genetic predisposition syndromes and their management. Surg Clin North Am. 2013; 93(2):341-62. doi: 10.1016/j.suc.2013.01.005. Epub 2013 Feb 11. 4. Gadzicki D, Evans DG, Harris H, Julian-Reynier C, Nippert I, Schmidtke J, Tibbn A, van Asperen CJ, Schlegelberger B. Genetic testing for familial/hereditary breast cancer – comparison of guidelines and recommendations from the UK, France, the Netherlands and Germany. J Community Genet 2011; 2:53-69. Doi:10.1007/s12687-011-0042-4.

5. Greenup R, Buchanan A, Lorzio W, et al. Prevalence of BRCA mutations among women with triple-negative breast cancer (TNBC) in a genetic counseling cohort. *Ann Surg Oncol* 2013;20:3254–3258.
6. Leegte B, van der Hout AH, Deffenbaugh AM, Bakker MK, Mulder IM, ten Berge A, Leenders EP, Wesseling J, de Hullu J, Hoogerbrugge N, Ligtenberg MJ, Arden-Jones A, Bancroft E, Salmon A, Barwell J, Eeles R, Oosterwijk JC. Phenotypic expression of double heterozygosity for BRCA1 and BRCA2 germline mutations. *J Med Genet*. 2005 42(3):e20.
7. Liede A, Karlan BY, Narod SA. Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. *J Clin Oncol* 2004;22:735–742.
8. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Genetic/Familial High Risk Assessment: Breast and Ovarian. Version 2.2014. Disponível em URL: [www.nccn.org](http://www.nccn.org)
9. Acessado em: 15 de fevereiro de 2015.
10. NICE. National Institute for Health and Care Excellence. Familial breast cancer: Classification and care of people at risk of familial breast cancer and management of breast cancer and related risks in people with a family history of breast cancer. NICE Guideline CG 164. June 2013. Disponível em URL: <http://www.nice.org.uk/guidance/cg164>. Acessado em 14 de fevereiro de 2015.
11. Peixoto A, Santos C, Pinto P, Pinheiro M, Rocha P, Pinto C, Bizarro S, Veiga I, Principe AS, Maia S, Castro F, Couto R, Gouveia A, Teixeira MR. The role of targeted

99

- BRCA1/BRCA2 mutation analysis in hereditary breast/ovarian cancer families of Portuguese ancestry. *Clin Genet*. 2014 Jun 10. doi: 10.1111/cge.12441. [Epub ahead of print].
12. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, et al. Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 2001;68:700–710.
  13. Walsh T, Casadei S, Lee MK, et al. Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:18032–18037.
  14. Weitzel JN, Lagos VI, Cullinane CA, Gambol PJ, Culver JO, Blazer KR, Palomares MR, Lowstuter KJ, MacDonald DJ. Limited family structure and BRCA gene mutation status in single cases of breast cancer. *JAMA*. 2007;297:2587-95.
  15. Powell CB, Chen LM, McLennan J, Crawford B, Zaloudek C, Rabban JT, Moore DH, Ziegler J. Risk-reducing salpingo-oophorectomy (RRSO) in BRCA mutation carriers: experience with a consecutive series of 111 patients using a standardized surgical- pathological protocol. *Int J Gynecol Cancer*. 2011 Jul;21(5):846-51.



**ANEXO V - AUTORIZAÇÃO DO GEBECAM****Declaração**

Declaro que temos conhecimento e autorizamos a realização do projeto de Pesquisa intitulado " Prevalência de Pacientes do Hospital São Lucas da PUCRS com Indicação de Avaliação Genética no Estudo Amazona III" proposto pela pesquisadora Alessandra Borba Anton de Souza.

GBCAM

*GOSINO*