



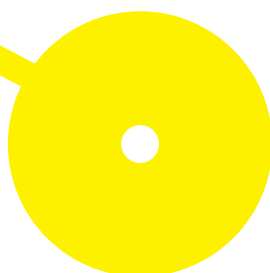
MESTRADO

TÉCNICAS LABORATORIAIS EM BIOPATOLOGIA

# Sequenciação de Nova Geração: Impacto de um Painel Multigénico para a Identificação de Indivíduos com Risco de Cancro da Mama e Ovário Hereditário

Julieta Conceição Mendes Borges Oliveira

09/2023





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



**Sequenciação de Nova Geração: Impacto de um Painel Multigénico para a Identificação de  
Indivíduos com Risco de Cancro da Mama e Ovário Hereditário**

**Autor**

Julieta Conceição Mendes Borges Oliveira

**Orientador(es)**

Mestre Natália Boaventura Salgueiro

Genética Molecular e Genómica

SYNLAB

Mestre Carla Alexandra Cavaco Pinto

Serviço de Genética e Centro de Investigação

Instituto Português de Oncologia do Porto

Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Professora Doutora Regina Augusta Alves Pereira da Silva

Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

**Relatório de Estágio apresentado para cumprimento dos  
requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Técnicas  
Laboratoriais em Biopatologia – Ramo de Patologia Molecular  
pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.**

## Resumo

O *BRCA1* e o *BRCA2* são os principais genes associados ao risco de cancro da mama e ovário hereditário, no entanto, muitos outros genes têm sido estudados e identificados como genes de suscetibilidade para estes cancros. A identificação de genes de suscetibilidade não-*BRCA1/2*, juntamente com a descoberta e aperfeiçoamento da Sequenciação de Nova Geração, permitiu oferecer aos pacientes o teste de painel multigénico, incluindo não apenas os genes *BRCA1/2*, mas todos os outros genes de suscetibilidade. O objetivo do presente trabalho foi investigar a presença de variantes germinativas em indivíduos com risco para cancro da mama e/ou ovário hereditário, utilizando um painel de genes de suscetibilidade para estes cancros. Verificámos que, se apenas os genes *BRCA1/2* fossem testados, variantes Patogénicas/Provavelmente Patogénicas em genes não-*BRCA1/2*, seriam perdidas em cerca de 4 % dos pacientes, que assim, não seriam submetidos a qualquer gestão de risco. Observamos também que, quando existe história familiar de cancro, parece haver uma maior probabilidade de variantes Patogénicas/Provavelmente Patogénicas serem detetadas e que estas são maioritariamente em genes não-*BRCA1/2*. Estas descobertas salientam a importância do uso de painéis multigénicos, que permitem analisar simultaneamente outros genes de suscetibilidade para cancro da mama e/ou ovário hereditário, além do *BRCA1/2*.

**Palavras-chave:** Cancro da mama e ovário hereditário; teste de painel multigénico; Sequenciação de Nova Geração

## Abstract

*BRCA1* and *BRCA2* are the principal genes associated to the risk of hereditary breast and ovarian cancer. However, several other genes have been studied and identified as susceptibility genes for these cancers. The identification of non-*BRCA1/2* susceptibility genes, together with the discovery and improvement of Next Generation Sequencing, has allowed the multigene panel testing to be offered to patients, including not only the *BRCA1/2* genes, but all the other susceptibility genes. The aim of the present study was to investigate the presence of germline variants in individuals at risk of hereditary breast and/or ovarian cancer, using a panel of susceptibility genes for these cancers. We found that, if only the *BRCA1/2* genes were tested, Pathogenic/Probably Pathogenic variants in non-*BRCA1/2* genes would be missed in about 4% of the patients, who therefore, wouldn't be subjected to any risk management. We also observed that, when there is family history of cancer, it appears that there is a greater probability of Pathogenic/Probably Pathogenic variants being detected and that these are mostly in non-*BRCA1/2* genes. These findings highlight the importance of using multigene panels, which allow the simultaneous analysis of other susceptibility genes for hereditary breast and/or ovarian cancer, in addition to *BRCA1/2*.

**Keywords:** Hereditary breast and ovarian cancer; multigene panel test; Next Generation Sequencing

## Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Cancro: uma doença genética, que pode ser hereditária.....	1
1.2. Cancro da mama.....	3
1.2.1. Epidemiologia.....	3
1.2.2. Fatores de Risco.....	3
1.2.3. Classificação.....	4
1.3. Cancro do ovário.....	5
1.3.1. Epidemiologia.....	5
1.3.2. Fatores de Risco.....	5
1.3.3. Classificação.....	5
1.4. Cancro da mama e cancro do ovário hereditários.....	6
1.4.1. Genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> e a síndrome hereditária do cancro da mama e ovário.....	6
1.4.2. Gene <i>TP53</i> e a síndrome de Li-Fraumeni.....	7
1.4.3. Gene <i>PTEN</i> e a síndrome de Cowden.....	8
1.4.4. Genes <i>mismatch repair</i> , <i>EPCAM</i> e a síndrome de Lynch.....	9
1.4.5. Gene <i>STK11</i> e a síndrome de Peutz-Jeghers.....	10
1.4.6. Gene <i>CDH1</i> e a síndrome de cancro gástrico difuso hereditário.....	11
1.4.7. Gene <i>NBN</i> .....	11
1.4.8. Gene <i>ATM</i> .....	12
1.4.9. Gene <i>CHEK2</i> .....	12
1.4.10. Gene <i>BRIP1</i> .....	13
1.4.11. Gene <i>PALB2</i> .....	14
1.4.12. Genes <i>RAD51C</i> e <i>RAD51D</i> .....	14
1.5. Teste de painel multigénico baseado em Sequenciação de Nova Geração.....	15
1.5.1. Inibidores da PARP.....	15
1.6. Objetivo.....	16
2. Métodos.....	17
2.1. Pacientes/Amostragem.....	17
2.2. Colheita e processamento das amostras de sangue periférico dos pacientes.....	17
2.3. Sequenciação de Nova Geração.....	17

2.3.1. Quantificação da concentração de DNA no fluorímetro .....	17
2.3.2. Preparação das bibliotecas genómicas.....	18
2.3.2.1. Obtenção de bibliotecas indexadas.....	18
2.3.2.1.1. Fragmentação enzimática do DNA, reparação das extremidades e adição de dA aos fragmentos de DNA.....	18
2.3.2.1.2. Ligação dos adaptadores e purificação .....	18
2.3.2.1.3. Introdução dos indexes por amplificação com os Twist Unique Dual Index Primers, purificação e controlo de qualidade .....	19
2.3.2.2. Obtenção de bibliotecas enriquecidas.....	19
2.3.2.2.1. Preparação das bibliotecas para a hibridação.....	19
2.3.2.2.2. Reação de hibridação das sondas de captura com as regiões alvo .....	20
2.3.2.2.3. Ligação dos alvos hibridados às esferas de streptavidina .....	20
2.3.2.2.4. PCR pós-captura, purificação e controlo de qualidade .....	20
2.3.3. Análise dos dados obtidos .....	21
3. Resultados.....	22
3.1. Análise da amostra total de 306 pacientes.....	22
3.1.1. Análise da presença/ausência de variantes germinativas nos 18 genes do painel utilizado, nos 306 pacientes .....	23
3.1.2. Variantes germinativas Patogénicas/Provavelmente Patogénicas detetadas nos 18 genes do painel utilizado, nos 306 pacientes.....	24
3.1.3. Variantes germinativas de Significado Clínico Incerto detetadas nos 18 genes do painel utilizado, nos 306 pacientes.....	27
3.1.4. Achados incidentais no gene <i>NTHL1</i> e no <i>BAP1</i> .....	29
3.2. Análise dos diferentes grupos de pacientes.....	29
3.2.1. Comparação dos 3 grupos quanto à percentagem de pacientes com variantes nos 18 genes do painel utilizado.....	30
3.2.2. Comparação dos 3 grupos quanto à percentagem de variantes Patogénicas/Provavelmente Patogénicas detetadas nos 18 genes do painel utilizado .....	31
3.2.3. Comparação dos 3 grupos quanto à percentagem de variantes de Significado Clínico Incerto detetadas nos 18 genes do painel utilizado .....	32
4. Discussão.....	34
4.1. Variantes Patogénicas/Provavelmente Patogénicas detetadas nos 18 genes do painel.....	35
4.2. Variantes Patogénicas/Provavelmente Patogénicas detetadas em genes fora do painel..	43

4.3. Variantes de Significado Clínico Incerto detetadas nos 18 genes do painel.....	45
4.4. Comparação dos 3 grupos.....	46
5. Conclusão.....	50
Referências Bibliográficas.....	51
Anexo 1. Extração automática de DNA com o Chemagic 360.....	57
Anexo 2. Extração automática de DNA com o Chemagic Prepito-D .....	58
Anexo 3. Quantificação da concentração de DNA no fluorímetro.....	59
Anexo 4. Diluição e desnaturação das bibliotecas genómicas para sequenciação no Illumina NextSeq 500 System.....	60
Anexo 5. Variantes de Significado Clínico Incerto detetadas nos 18 genes do painel utilizado, nos 306 pacientes.....	61

## 1. Introdução

### 1.1. Cancro: uma doença genética, que pode ser hereditária

Todos os cancros são considerados genéticos, uma vez que resultam de alterações na estrutura ou na expressão de genes, nomeadamente proto-oncogenes e supressores tumorais, que conferem vantagens proliferativas às células (1).

Alterações na sequência de DNA (variantes) em células somáticas são as principais responsáveis pela carcinogénese e podem ocorrer devido a erros durante a replicação e reparação do DNA (1), embora vários fatores ambientais externos, como vírus, produtos químicos agrícolas, fumar, ter uma dieta inadequada, consumir álcool, entre outros, sejam apontados como a principal causa (2). Segundo o *National Cancer Institute*, uma variante é definida como “qualquer alteração na sequência de DNA de uma célula”, podendo ser referida como mutação. Nem todas as variantes têm efeitos nocivos, algumas não têm efeito e outras podem ser benéficas (3). A localização da variante, bem como o tipo de variante é que vão definir o seu efeito, tendo em conta se esta tem ou não algum impacto no produto proteico e conseqüentemente na sua função (1).

Todas as células que constituem o corpo humano são somáticas, com exceção das células reprodutivas/germinativas. Variantes que ocorrem nas células somáticas podem ser transmitidas para a descendência da célula por mitose, mas não podem ser transmitidas de pais para filhos, uma vez que esta transmissão só é possível através do óvulo ou do espermatozoide. Variantes presentes no óvulo ou no espermatozoide são designadas germinativas. Um indivíduo que herde uma variante germinativa, apresentará essa variante em todas as células do corpo, pois todas são originadas a partir do zigoto (4).

Variantes em células somáticas estão na base dos cancros esporádicos (1), que correspondem a cerca de 80% de todos os cancros (5). Já variantes germinativas, altamente penetrantes, são a causa dos cancros hereditários, que constituem cerca de 5 a 10% de todos os cancros (5).

Knudson, em 1971, criou a teoria dos dois eventos, ao constatar que era necessário a ocorrência de duas variantes, uma em cada alelo do gene para o retinoblastoma, para que o retinoblastoma se desenvolvesse. No retinoblastoma hereditário, uma das variantes era germinativa e a outra somática, já no retinoblastoma esporádico, não hereditário, as duas variantes eram somáticas (6). Ou seja, indivíduos que não herdem variantes germinativas no gene para o retinoblastoma, necessitam de adquirir as duas variantes somáticas na mesma célula para ter retinoblastoma. Já indivíduos que herdem uma variante germinativa neste gene, estão em desvantagem, pois com

uma variante presente em todas as células, a aquisição de apenas uma variante somática neste gene é suficiente para o desenvolvimento de cancro, apresentando maior probabilidade de ter cancro, de ter cancro numa idade mais precoce e de ter múltiplos cancros, assim como de desenvolver outros cancros secundários primários (4).

Os proto-oncogenes são genes que promovem o crescimento, a divisão e a sobrevivência celular. Quando sofrem alguma alteração, por exemplo uma mutação, podem ficar permanentemente ativados, transformando-se em oncogenes, promovendo o crescimento e divisão celular descontrolados e conseqüentemente o cancro. Como as mutações nos oncogenes são dominantes, basta apenas um alelo estar alterado para que haja efeito. Alterações em oncogenes são observadas maioritariamente em células somáticas, mas há exceções (4). Por exemplo, o oncogene *RET* ativado pode ser herdado e causar cancro (4, 7).

Os supressores tumorais dividem-se em dois tipos: os *gatekeepers*, responsáveis pelo controlo da proliferação celular, através da inibição da divisão celular e promoção da apoptose e os *caretakers*, que são necessários para manter a estabilidade genómica (1). Entre os *gatekeepers* encontra-se por exemplo o *PTEN* e entre os *caretakers* os genes *mismatch repair*, e o *BRCA1*, que são genes envolvidos na reparação do DNA. Se por um lado os proto-oncogenes sofrem alterações que lhe conferem um ganho de função, o oposto é observado para os supressores tumorais, pois alterações, como mutações, levam à perda da sua função, promovendo instabilidade genómica (com subsequente aumento de mutações) e crescimento celular descontrolado. Além disso, no caso dos supressores tumorais, as mutações são recessivas e não dominantes, seguindo a teoria dos dois eventos de Knudson. Se apenas um alelo estiver alterado, os genes supressores tumorais conseguem exercer a sua função normal, mantendo a estabilidade genómica e o controlo do crescimento celular. É necessário ocorrer alteração dos dois alelos para haver perda de função (4). No entanto há exceções, alguns supressores tumorais apresentam haploinsuficiência, ou seja, embora apenas um alelo tenha sido alterado, o produto proteico do alelo preservado não é suficiente para manter a função normal do gene. O *PALB2* e o *CHEK2* são exemplos de supressores tumorais que podem levar ao cancro, quer devido à alteração dos dois alelos, quer por haploinsuficiência (7).

Variantes germinativas associadas à predisposição para o cancro, são observadas maioritariamente em supressores tumorais (1), sendo a causa de várias síndromes de cancro hereditário (7). Segundo o *Nacional Cancer Institute*, uma síndrome de cancro hereditário é um “distúrbio hereditário no qual há um risco maior do que o normal de certos tipos de cancro”,

caracterizando-se por determinados padrões familiares como “vários familiares próximos com o mesmo tipo de cancro, desenvolver cancro numa idade precoce ou ter dois ou mais tipos de cancro desenvolvidos na mesma pessoa” (8). Por norma, estas variantes germinativas são herdadas na família de acordo com a genética mendeliana (1). A herança autossómica dominante é a forma mais comum de transmissão dos cancros hereditários, no entanto, a herança autossómica recessiva também é observada em alguns casos (7).

Estima-se que variantes germinativas Patogénicas (Pat.), altamente penetrantes, estejam presentes em cerca de 2% dos indivíduos saudáveis, conferindo-lhe um risco bastante elevado de desenvolverem cancro (7).

## **1.2. Cancro da mama**

### **1.2.1. Epidemiologia**

Segundo estimativas do GLOBOCAN, em 2020, o cancro mais diagnosticado no mundo foi o cancro da mama feminino, com 2,3 milhões de novos casos. Além disso, foi a quinta causa de morte por cancro sendo responsável por 684 996 mortes. Entre as mulheres, além de ter sido o cancro mais incidente, foi também a principal causa de morte por cancro (9). Olhando apenas para Portugal, em 2020, o cancro da mama foi o segundo mais incidente, com 7 041 novos casos diagnosticados e também a quinta causa de morte por cancro, sendo responsável por 1 864 mortes (10). Entre as mulheres portuguesas, assim como se observou para as mulheres da maioria dos países, o cancro da mama foi também o mais incidente e a principal causa de morte por cancro (9). Prevê-se que até 2040, no mundo, tanto a incidência, como a mortalidade do cancro da mama aumentem, com o número de novos casos diagnosticados a chegar aproximadamente aos 3,2 milhões e o número de mortes a 1 milhão, nesse ano (11).

### **1.2.2. Fatores de Risco**

Existem vários fatores de risco associados ao desenvolvimento de cancro da mama nas mulheres (12) e nos homens (13). Entre os fatores modificáveis encontram-se por exemplo: dieta inadequada, fumar (12), consumir álcool e obesidade (12, 13). Já ter idade mais avançada (>50 anos) (12, 13), síndrome de klinefelter (13), maior densidade do tecido mamário, história pessoal de cancro da mama ou de lesões benignas da mama, entre outros, fazem parte dos fatores não modificáveis, nos quais está incluído também ser do sexo feminino (12). Apenas 1% dos

diagnósticos de cancro da mama, são cancros da mama masculinos (13). Entre os fatores de risco não modificáveis, encontramos ainda variantes em determinados genes e história familiar de cancro da mama (12, 13). Na verdade, ter um familiar de primeiro grau diagnosticado com cancro da mama, aumenta o risco de desenvolvimento desta doença (13), e quanto maior o número de familiares de primeiro grau afetados, maior o risco. O risco pode ser ainda mais elevado quando os diagnósticos familiares ocorrem numa idade mais precoce (<50 anos) (12).

O *BRCA1* e *BRCA2* são os principais genes, nos quais a ocorrência de variantes, se encontra associada a um risco elevado de cancro da mama, no entanto, variantes noutros genes, como o *TP53*, *CDH1*, *PTEN*, *ATM*, *PALB2* e *CHEK2*, também se encontram associadas a um risco aumentado deste tipo de cancro (12).

### 1.2.3. Classificação

Existem dois tipos de classificação para cancro da mama: a classificação histopatológica e a classificação molecular.

Dentro da classificação histopatológica, podemos encontrar subtipos pré-cancerígenos e cancerígenos. Oitenta por cento dos subtipos pré-cancerígenos são carcinomas ductais *in situ* e 20% carcinomas lobulares *in situ*. Os carcinomas *in situ*, não são invasivos, no entanto, com o passar do tempo, podem transformar-se em cancros da mama invasivos. Entre os cancros da mama invasivos mais comuns, encontram-se os carcinomas ductais invasivos (70-80%) e os carcinomas lobulares invasivos (10%)(14).

Além da classificação histopatológica, os cancros da mama invasivos, também são classificados molecularmente. Entre os subtipos moleculares, encontram-se: o luminal A (50%), o luminal B (20-30%), o *HER2* positivo (15-20%) e o triplo negativo (15%). O luminal A é o subtipo com crescimento mais lento, melhor resposta à hormonoterapia e melhor prognóstico. Já o luminal B, comparativamente ao luminal A, não responde tão bem à hormonoterapia e tem pior prognóstico. O *HER2* positivo, é agressivo, apresentando recidivas frequentes. E o triplo negativo é o subtipo mais heterogéneo, é agressivo, não responde à hormonoterapia, nem à terapia anti-*HER2*, tendo um prognóstico bastante mau (14). Variantes germinativas nos genes *BRCA1/2*, observam-se em 11-16 % dos casos de cancro da mama triplo negativo (12).

### 1.3. Cancro do ovário

#### 1.3.1. Epidemiologia

Segundo estimativas do GLOBOCAN, em 2020, no mundo, ocorreram 313 959 novos casos de cancro do ovário e este foi responsável por 207 252 mortes. Entre as mulheres, é o oitavo cancro mais incidente e também a oitava causa de morte por cancro (9). Em Portugal, em 2020, observaram-se 561 novos casos e 408 mortes devido ao cancro do ovário. Entre as mulheres Portuguesas, foi o décimo terceiro cancro mais diagnosticado e a oitava causa de morte por cancro (10). Tal como previsto para o cancro da mama, também é esperado que a incidência e a mortalidade do cancro do ovário aumentem até 2040, no mundo, com o número de novos casos diagnosticados a chegar aproximadamente aos 445 700 e o número de mortes aos 313 600, nesse ano (11).

Comparativamente ao cancro da mama, o cancro do ovário é menos incidente e provoca menos mortes, ainda assim, como referido, é o oitavo cancro mais mortal entre as mulheres e não possui métodos de rastreio eficazes que permitam detetá-lo precocemente. Como consequência, e tendo em conta que os seus sintomas são inespecíficos, o diagnóstico ocorre em estágios mais avançados, apresentando uma baixa taxa de sobrevivência (49% aos 5 anos) (15).

#### 1.3.2. Fatores de Risco

Existem vários fatores que aumentam o risco de desenvolvimento de cancro do ovário, entre eles podemos encontrar por exemplo: ingestão de gorduras, obesidade, tabagismo, terapia hormonal, diabetes, endometriose e síndrome do ovário poliquístico (16). A história familiar de cancro do ovário também é um fator de risco. Na verdade, ter familiares de primeiro grau diagnosticados com cancro do ovário eleva o risco de desenvolver esta doença, principalmente quando há vários familiares diagnosticados e em idade precoce. Além disso, possuir variantes germinativas em determinados genes, por exemplo no *BRIP1*, *RAD51C* e *RAD51D*, mas principalmente no *BRCA1* e *BRCA2*, também aumenta o risco de cancro do ovário (17).

#### 1.3.3. Classificação

Os tumores do ovário dividem-se em três tipos diferentes, tendo em conta as células de origem: tumores epiteliais (90%), tumores das células germinativas (3%) e tumores dos cordões

sexuais/estroma (2%) (18). O local de origem destes tumores pode ser o ovário, a trompa de Falópio, o endométrio ou o peritoneu (19).

Dentro dos tumores do ovário epiteliais malignos, existem cinco tipos principais: o carcinoma seroso de alto grau (70%) e o de baixo grau (3%), o carcinoma endometrióide (10-15%), o carcinoma de células claras (10%) e o carcinoma mucinoso (3-4%). A maioria dos carcinomas do ovário, são carcinomas serosos de alto grau. Variantes germinativas no *BRCA1* e *BRCA2*, conferem um risco elevado para o desenvolvimento deste tipo de carcinoma, que é o cancro do ovário mais comum (18) e a principal causa das mortes por cancro do ovário (19). Em alguns casos de carcinoma endometrióide, observam-se variantes germinativas nos genes *mismatch repair*, assim como no carcinoma de células claras, embora neste tipo de carcinoma, estejam presentes em menos de 10% (18).

#### 1.4. Cancro da mama e cancro do ovário hereditários

Como já vem sendo referido, existem vários genes nos quais a ocorrência de variantes germinativas, nomeadamente Patogénicas/Provavelmente Patogénicas (Pat/P.Pat.), aumentam o risco de desenvolvimento de cancro da mama e/ou ovário. Estes genes são considerados genes de suscetibilidade para o cancro da mama e/ou ovário hereditário. Entre eles encontramos o *ATM*, o *BRCA1*, o *BRCA2*, o *BRIP1*, o *CDH1*, o *CHEK2*, os genes *mismatch repair*, o *EPCAM*, o *NBN*, o *PALB2*, o *PTEN*, o *RAD51C*, o *RAD51D*, o *STK11* e o *TP53*.

##### 1.4.1. Genes *BRCA1* e *BRCA2* e a síndrome hereditária do cancro da mama e ovário

A síndrome hereditária do cancro da mama e ovário é caracterizada por um risco aumentado de desenvolvimento de cancro da mama (principalmente com idade < 50 anos) e ovário, mas também de outros cancros como próstata e pâncreas. Determinadas variantes germinativas no *BRCA1* e *BRCA2*, são a principal causa desta síndrome (20), na qual estas variantes são herdadas de forma autossómica dominante (21).

O *BRCA1* e o *BRCA2* são dois genes importantes para a manutenção da estabilidade genómica. Eles são supressores tumorais *caretaker* que codificam proteínas envolvidas na reparação do DNA por recombinação homóloga (HRR) (20).

Estima-se que na população em geral, 1 em cada 400-500 indivíduos, possuem variantes Pat. no *BRCA1* e *BRCA2*. Determinadas variantes, designadas variantes fundadoras, apresentam frequências mais elevadas em determinados grupos, como é o caso das três variantes Pat.

fundadoras no *BRCA1* e *BRCA2* encontradas nos judeus Ashkenazi (20). Na população portuguesa, uma variante fundadora reconhecida é a c.156\_157insAlu no *BRCA2*. Além desta, existe a possibilidade das variantes c.2037delinsCC e c.3331\_3334del no *BRCA1*, também serem fundadoras, devido à partilha de um haplótipo comum entre as famílias portadoras (22).

Um grande estudo de coorte prospetivo, avaliou o risco de cancro da mama (n=3886), cancro da mama contralateral (n=2213) e cancro do ovário (n=5066), em mulheres portadoras de variantes Pat. no *BRCA1* e *BRCA2*. Os resultados demonstraram que o risco cumulativo para cancro da mama, aos 80 anos, é de 72% e 69% respetivamente para variantes no *BRCA1* e *BRCA2*, e que 20 anos após o primeiro diagnóstico de cancro da mama, o risco cumulativo para cancro da mama contralateral é de 40% e 26% para variantes no *BRCA1* e *BRCA2* respetivamente. No que diz respeito ao cancro do ovário, observou-se um risco cumulativo, aos 80 anos, de 44% e 17% para variantes no *BRCA1* e *BRCA2* respetivamente (23). Uma meta-análise mais recente, estimou um risco maior para cancro do ovário aos 80 anos, nomeadamente de 54,4% e 30,5% para variantes *BRCA1* e *BRCA2* respetivamente (24).

O risco de cancro da mama masculino, foi avaliado num estudo envolvendo 1939 famílias, que observou um risco cumulativo, para portadores de variantes no *BRCA1* e *BRCA2*, aos 80 anos, de 1,8% e 8,3% respetivamente, enquanto o risco para não portadores foi apenas 0,12% (25).

Um outro estudo, de coorte prospetivo, que acompanhou 823 homens portadores de variantes Pat. no *BRCA1* e *BRCA2*, demonstrou que aos 85 anos, o risco cumulativo para cancro da próstata é de 29% e 60% respetivamente (26).

Relativamente ao cancro do pâncreas, uma investigação recente, concluiu que o risco ao longo da vida, para portadores de variantes Pat. no *BRCA1* e *BRCA2*, se encontra entre 1-4% e entre 3-5% respetivamente (27).

#### 1.4.2. Gene *TP53* e a síndrome de Li-Fraumeni

A síndrome de Li-Fraumeni, é uma síndrome de cancro hereditário, autossómica dominante, caracterizada por um risco muito elevado de desenvolvimento de múltiplos cancros e em idade precoce. A maioria dos casos de síndrome de Li-Fraumeni clássica, encontram-se associados a variantes germinativas no gene *TP53* (28).

O *TP53*, é um gene supressor tumoral *gatekeeper*, que codifica a proteína p53, envolvida em várias funções celulares, como reparação do DNA, controlo do ciclo celular, apoptose, entre outras (29). Variantes no *TP53* podem levar à inativação da p53 por perda de função ou efeito

dominante negativo, sendo este último considerado um dos principais mecanismos envolvidos na inativação da p53. Em alguns casos também se observa um ganho de função desta proteína, com efeito dominante positivo. Sendo assim, apesar do *TP53* ser um gene supressor tumoral, não segue exclusivamente a teoria dos dois eventos, elaborada por Knudson (30).

Apesar da prevalência não se encontrar bem estabelecida, estima-se, que na população em geral, 1 em 3555-5476 indivíduos, são portadores de variantes germinativas Pat. no *TP53*. Estas variantes são maioritariamente herdadas, mas também podem ocorrer *de novo* (em 7-20% dos indivíduos) (31).

Num estudo envolvendo 286 indivíduos com variantes germinativas Pat. no *TP53*, provenientes de 107 famílias, observou-se um risco cumulativo, em ambos os sexos, para desenvolvimento de cancro, aos 70 anos, de aproximadamente 100% e um risco cumulativo para segundo cancro, 10 anos após o primeiro diagnóstico, de 50%. O cancro da mama foi o cancro mais diagnosticado, mas nenhum diagnóstico ocorreu em homens. No entanto, nas mulheres foi o primeiro diagnóstico de cancro mais frequente e apresentou um risco cumulativo aos 70 anos de 54% (32). Na verdade, o cancro da mama, é um dos cancros mais frequentemente associados à síndrome de Li-Fraumeni, encontrando-se no topo dos cancros mais detetados (28). Um outro estudo realizado em mulheres com cancro da mama <30 anos, e com teste *BRCA1* e *BRCA2* negativo, demonstrou que 21,4% possuíam variantes germinativas Pat. no *TP53* e além disso, estimou que 5-8% das mulheres com cancro da mama precoce e com história familiar negativa podem ser portadoras de variantes no *TP53* (33).

Além do risco elevado para cancro da mama, a síndrome de Li-Fraumeni também se encontra associada a um maior risco de cancro do ovário, pâncreas e próstata, que embora não façam parte dos cancros mais comuns, também são detetados em famílias diagnosticadas com esta síndrome ou com uma variante Pat. no *TP53* (31).

#### **1.4.3. Gene *PTEN* e a síndrome de Cowden**

O *PTEN*, é um gene supressor tumoral *gatekeeper*, que codifica uma proteína fosfatase envolvida em várias funções, nomeadamente no controlo do ciclo celular e da apoptose (34).

A síndrome de Cowden, é uma síndrome de cancro hereditário rara, cuja herança é autossómica dominante. Estima-se que 1 em 200000 indivíduos sejam afetados por esta condição. Faz parte das síndromes *PTEN Hamartoma Tumor*, estando associada a variantes germinativas no *PTEN*,

detetadas em cerca de 80% dos pacientes. Estas variantes são maioritariamente herdadas, mas também podem ocorrer *de novo* (em até 45% dos casos) (35).

A síndrome de Cowden confere um risco elevado para o desenvolvimento de diferentes tipos de cancro e encontra-se também associada a diversas patologias benignas. O cancro mais detetado nesta síndrome, é o cancro da mama, mas raramente é encontrado em homens(35).

Num estudo realizado em indivíduos portadores de variantes germinativas Pat. no *PTEN*, verificou-se, que aos 70 anos, o risco cumulativo para desenvolvimento de cancro foi de 85% e para desenvolvimento de cancro da mama feminino, especificamente, foi de 77% (36). Noutra investigação, observou-se um risco ao longo da vida, para cancro da mama feminino, devido a variantes germinativas Pat. no *PTEN*, de 85% (37) e uma outra análise, verificou que 22 % dos indivíduos portadores de variantes Pat. no *PTEN*, com cancro da mama primário, desenvolveram, posteriormente, um novo cancro da mama primário e estimou um risco cumulativo, para segundo cancro da mama, 10 anos após o primeiro diagnóstico, de 29% (38).

#### **1.4.4. Genes *mismatch repair*, *EPCAM* e a síndrome de Lynch**

A síndrome de Lynch, é uma síndrome de cancro hereditário, autossómica dominante, que afeta até 1 em cada 125 indivíduos na população em geral e que se caracteriza por um risco aumentado de desenvolvimento de vários tipos de cancro. Variantes germinativas Pat. num dos genes *mismatch repair*, nomeadamente no *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*, ou a deleção germinativa da extremidade 3' do *EPCAM*, são a causa desta síndrome. Estima-se que 60-70% dos casos de síndrome de Lynch ocorram devido a variantes germinativas Pat. no *MLH1* e *MSH2*, 20-25% no *MSH6*, menos de 15% no *PMS2* e apenas 1-3% no *EPCAM*(39).

Os *mismatch repair* são genes supressores tumorais *caretaker*, que codificam proteínas muito importantes para manter a estabilidade genómica. Quando algum nucleótido é incorporado incorretamente na sequência de DNA, eles atuam e reparam o DNA. Quando ocorre inativação bialélica destes genes, a *mismatch repair* fica comprometida, provocando acumulação de mutações e instabilidade de microssatélites. O *EPCAM* não é um gene *mismatch repair*, no entanto, a deleção da sua extremidade 3' provoca um silenciamento epigenético do *MSH2*, contribuindo desta forma para a disfunção da *mismatch repair*(39).

O cancro do ovário, é um dos cancros para os quais esta síndrome confere risco aumentado. Apesar de observado em indivíduos com esta condição, não há evidências suficientes que demonstrem que há um risco aumentado também para cancro da mama (40). Num estudo,

relativamente recente, realizado com dados prospetivos de 6350 portadores de variantes Pat. nos genes *mismatch repair*, observou-se um risco cumulativo aos 75 anos para desenvolvimento de qualquer cancro, respetivamente para mulheres e homens de 81% e 71,4% para variantes no *MLH1*, 84,3% e 75,2% para o *MSH2* e 61,8% e 41,7% para o *MSH6*, enquanto no *PMS2* o risco foi de 34,1% para ambos os sexos. Relativamente ao cancro da mama, especificamente, a estimativa de risco cumulativo para variantes nos 4 genes, variou entre 12,3–15,2% aos 75 anos, demonstrando apenas um subtil aumento comparativamente aos riscos na população em geral. Já no que diz respeito ao cancro do ovário, verificou-se um risco cumulativo, aos 75 anos, de 11% para o *MLH1*, 17,4% para o *MSH2*, 10,8% para o *MSH6* e apenas 3% para o *PMS2* (41). Dados de estudos anteriores, demonstram um risco cumulativo, ao longo da vida, de 6–12% para desenvolver cancro do ovário em mulheres com síndrome de Lynch, comparativamente a um risco de cancro do ovário esporádico de apenas 1,6%. No contexto desta síndrome pode observar-se a ocorrência de cancro do ovário bilateral e em alguns pacientes com cancro do ovário (cerca de 9–55%) são detetados cancros síncronos e/ou metacrónicos extraovarianos, geralmente secundários ao cancro do ovário (42).

Além de cancro do ovário, o cancro da próstata e do pâncreas também estão incluídos nos cancros para os quais a síndrome de Lynch confere risco aumentado (40). Verificou-se que variantes Pat. nos genes *mismatch repair*, conferem um risco cumulativo, aos 75 anos, para desenvolvimento de cancro da próstata nos homens, de 13,8% para o *MLH1*, 23,8% para o *MSH2*, 8,9% para o *MSH6* e 4,6% para o *PMS2*, enquanto para o cancro do pâncreas, em mulheres e homens respetivamente, foi de 11% e 21,8% para o *MLH1*, 12,8% e 19,5% para o *MSH2*, 4,2% e 7,9% para o *MSH6* e no *PMS2* para ambos os sexos foi de 3,6% (41).

#### 1.4.5. Gene *STK11* e a síndrome de Peutz-Jeghers

A síndrome de Peutz-Jeghers, é uma síndrome de cancro hereditário rara, com incidência de 1 em 50000–200000. É herdada de forma autossómica dominante e aumenta o risco de desenvolvimento de diferentes tipos de cancro, incluindo cancro da mama, ovário e pâncreas (43). Embora, por norma, as variantes germinativas Pat. sejam herdadas, existem vários pacientes que são casos isolados na família, não se sabendo a percentagem exata de pacientes nos quais as variantes ocorreram *de novo* (44). As únicas causas conhecidas desta síndrome, são variantes germinativas Pat. no *STK11*, detetadas em cerca de 80–94% dos pacientes (45). O *STK11* é um gene supressor tumoral, que codifica uma serina/treonina cinase capaz de fosforilar

e ativar a proteína AMPK, que por sua vez, se encontra envolvida no controlo do ciclo celular, apoptose, diferenciação celular, reparação do DNA, entre outras funções (45).

Numa investigação, envolvendo 419 indivíduos com síndrome de Peutz-Jeghers, observou-se um risco para desenvolvimento de qualquer tipo de cancro, aos 70 anos, de 85%. Especificamente, para o cancro da mama feminino, cancros ginecológicos (incluindo cancro do ovário) e cancro do pâncreas, o risco cumulativo, aos 70 anos, foi de 45%, 18% e 11%, respetivamente (46). Uma meta-análise, envolvendo também pacientes diagnosticados com síndrome de Peutz-Jeghers, demonstrou riscos cumulativos superiores, aos 64 anos, para cancro (qualquer tipo), cancro da mama feminino, cancro do ovário e cancro do pâncreas, nomeadamente 93%, 54%, 21% e 36%, respetivamente (47).

#### **1.4.6. Gene *CDH1* e a síndrome de cancro gástrico difuso hereditário**

A síndrome de cancro gástrico difuso hereditário, apresenta uma incidência estimada de 5-10 por cada 100000 nascimentos. É herdada de forma autossómica dominante e apresenta elevado risco para desenvolvimento de cancro gástrico difuso e também de cancro da mama lobular. Variantes germinativas Pat. no *CDH1* são a principal causa desta síndrome (48).

O *CDH1* é um supressor tumoral, que codifica a E-caderina, uma proteína envolvida na adesão celular. Esta proteína encontra-se nas junções aderentes das células epiteliais e promove a adesão entre células adjacentes. Além da adesão celular, a E-caderina também é importante para a polaridade celular, orientação do fuso mitótico, deteção de tensão, entre outras funções (48).

Vários estudos investigaram o risco de desenvolvimento de cancro da mama feminino, em portadoras de variantes Pat. no *CDH1*. Um estudo realizado em 2001, observou um risco cumulativo, aos 80 anos, de 39% (49), enquanto estudos subsequentes demonstraram riscos cumulativos superiores, aos 80 anos, nomeadamente de 42% (50) e 55% (51).

Na síndrome de cancro gástrico difuso hereditário, decorrente de variantes germinativas Pat. no *CDH1*, é comum observar-se cancro da mama lobular invasivo bilateral e/ou multifocal (48).

#### **1.4.7. Gene *NBN***

O gene *NBN*, também designado por *NBS1*, é um supressor tumoral, que tal como os genes *BRCA1* e *BRCA2*, se encontra envolvido na HRR. Este gene codifica a proteína NBN, que faz parte do complexo MRN (MRE11-RAD50-NBN). Este complexo deteta a quebra dupla da cadeia de DNA e inicia vários processos. A proteína NBN é responsável por recrutar e ativar a proteína ATM. (52).

Um estudo, envolvendo uma grande coorte feminina, demonstrou que variantes germinativas Pat. no *NBN*, conferem um risco significativamente aumentado, de aproximadamente 2x, para cancro do ovário, mas não conferem risco para cancro da mama (53). O mesmo foi observado, numa meta-análise abrangente, mais recente (54). Além disso, um estudo de 2021 envolvendo um grande número de casos de cancro da mama (n=32247) e controlos (n=32544), observou que variantes germinativas Pat. no *NBN*, não aumentaram o risco de cancro da mama, incluindo variantes anteriormente associadas a um risco aumentado, nomeadamente a c.657\_661del (55).

#### 1.4.8. Gene *ATM*

O *ATM*, é um gene supressor tumoral *caretaker*, que codifica a serina/treonina quinase ATM que também faz parte da via HRR. Quando ocorre a dupla quebra da cadeia de DNA, a ATM é recrutada para o local e promove a ativação do *checkpoint* G1/S e juntamente com outra serina/treonina quinase, a ATR, fosforila diferentes alvos a jusante, entre eles a CHK2, a p53 e a BRCA1 (52).

Duas meta-análises, estimaram o risco para cancro da mama, em portadores de variantes germinativas Pat. no *ATM*. Uma delas estimou um risco cumulativo, aos 80 anos, de aproximadamente 33% (56) e a outra meta-análise conclui que o risco ao longo da vida, é de 38% (57). Além disso, uma outra investigação, descobriu que em portadores da variante c.7271T>G no *ATM*, o risco cumulativo é superior, podendo chegar aos 69%, aos 70 anos (58).

Dois estudos diferentes, envolvendo grandes coortes, demonstraram que, em portadoras de variantes Pat. no *ATM*, há também um risco significativamente aumentado, de aproximadamente 2x, para desenvolvimento de cancro do ovário (53, 59).

O risco de cancro do pâncreas e da próstata também parecem aumentar em portadores de variantes Pat. no *ATM*. Um estudo de coorte multicêntrico, observou um risco cumulativo, aos 80 anos, para desenvolvimento de cancro do pâncreas de 9,5%, enquanto para não portadores o risco observado foi apenas 1,5% (60). Outro estudo estimou um risco, aproximadamente 4x superior, para cancro da próstata (61).

#### 1.4.9. Gene *CHEK2*

O *CHEK2*, também é um gene supressor tumoral, envolvido na HRR. Este gene codifica uma serina/treonina cinase a CHK2 que é fosforilada e consequentemente ativada pela ATM e depois fosforila a BRCA1, sendo este um passo importante para as funções do complexo efetor BRCA1-

PALB2-BRCA2. Além disso, encontra-se envolvida noutras funções importantes, como controlo do ciclo celular e morte celular (52).

Dois estudos, investigaram o risco cumulativo para cancro da mama feminino, em portadoras de variantes germinativas Pat. truncantes no *CHEK2*. Um deles era uma meta-análise e estimou um risco cumulativo, para cancro da mama, de 37%, aos 70 anos, em mulheres que tinham história familiar de cancro da mama. Já em mulheres sem familiares afetados o risco era de 21% (62). No outro estudo, o risco cumulativo, ao longo da vida, variava entre 20-44%, tendo em conta também a história familiar de cancro da mama. Era de 20% se nenhum familiar fosse afetado e de 44% se existisse um familiar de primeiro e de segundo grau afetados (63).

Uma investigação mais recente, envolvendo 32247 mulheres com cancro da mama, observou que variantes germinativas Pat. no *CHEK2* estão associadas a um risco aumentado de cancro da mama e que o risco cumulativo, aos 80 anos, é de aproximadamente 25%. Além disso, variantes Pat. *missense* frequentes no *CHEK2*, nomeadamente a p.Ile157Thr e a p.Ser428Phe, demonstraram ter pouca importância clínica (*odds ratio* < 1,5) (55).

#### 1.4.10. Gene *BRIP1*

O *BRIP1*, é um gene supressor tumoral, que codifica uma DNA helicase, que também participa na HRR, auxiliando a BRCA1. Depois de fosforilada pela ATM ou ATR e pela CHK2, a BRCA1 é acumulada perto do DNA danificado e com o auxílio da helicase BRIP1 e de outra proteína, a BARD1, constitui uma estrutura que organiza e agrupa outras proteínas necessárias para a reparação do DNA (52).

Ramus *et al*, detetaram variantes germinativas Pat. truncantes no gene *BRIP1*, em pacientes com cancro do ovário epitelial e observaram um risco relativo de 11,22 para cancro do ovário epitelial invasivo e de 14,09 para o subtipo seroso de alto grau. O risco cumulativo estimado, para cancro do ovário epitelial, aos 80 anos, nas portadoras destas variantes, foi de 5,8% (64). Uma publicação mais recente, estimou um risco ao longo da vida, para cancro do ovário, a variar entre 5-12%, em portadoras de variantes germinativas Pat. no *BRIP1*, e observou que o risco para cancro da mama, não se encontra significativamente associado à presença destas variantes (65). No entanto, um estudo posterior, envolvendo uma grande coorte feminina com cancro da mama invasivo (n=54555), demonstrou uma associação significativa entre variantes germinativas Pat. no *BRIP1* e um risco aumentado do subtipo de cancro da mama triplo negativo (*odds ratio*=2,09) (66).

#### 1.4.11. Gene *PALB2*

O gene *PALB2*, o parceiro e localizador do *BRCA2*, é um supressor tumoral que codifica a proteína *PALB2*, cuja principal função é mediar a ligação entre a *BRCA1* e a *BRCA2* na HRR, dando origem ao complexo efetor *BRCA1-PALB2-BRCA2*. Além disso, também recruta a *BRCA2* para perto da quebra dupla do DNA (52).

Yang *et al.*, num estudo relativamente recente, envolvendo dados de 524 famílias de diferentes países, verificaram que variantes germinativas Pat. no *PALB2*, se encontram significativamente associadas a um aumento de risco de cancro da mama, tanto feminino, como masculino, cancro do ovário e cancro do pâncreas. Os riscos cumulativos estimados, aos 80 anos, foram: 53% e 1% respetivamente para cancro da mama feminino e masculino, 5% para cancro do ovário e 2-3% para cancro do pâncreas. Além disso, também observaram, para o cancro da mama feminino e do ovário, que o risco cumulativo, aos 80 anos, era maior se houvesse história familiar de cancro. O risco variava de 52% para 76% no caso do cancro da mama e de 5% para 16% no caso do cancro do ovário, de uma portadora sem familiares de primeiro e segundo grau afetados com cancro, para uma portadora com dois familiares de primeiro grau afetados (67).

#### 1.4.12. Genes *RAD51C* e *RAD51D*

Os genes *RAD51C* e *RAD51D*, são dois supressores tumorais, que são parálogos do gene *RAD51*. Fazem também parte do processo de HRR e codificam as proteínas *RAD51C* e *RAD51D*. Reguladas pelo complexo *BRCA1-PALB2-BRCA2*, a *RAD51C* e a *RAD51D* colaboram no recrutamento da *RAD51* para o local da quebra dupla do DNA e além disso, podem estar envolvidas na formação dos filamentos de nucleoproteína (52).

Yang *et al.* investigaram os riscos, de carcinoma tubo-ovárico e de cancro da mama, associados a variantes germinativas Pat. no *RAD51C* e *RAD51D* e para isso usaram dados de mais de 6000 famílias. Para carcinoma tubo-ovárico, o risco cumulativo, aos 80 anos, em portadoras de variantes Pat. no *RAD51C* e *RAD51D* foi de 11% e 13% respetivamente e para o cancro da mama foi de 21% e 20% respetivamente. Quando a história familiar de cancro foi avaliada, os riscos variaram. Observou-se assim, que o risco cumulativo, aos 80 anos, para carcinoma tubo-ovárico, pode chegar aos 32% e 36%, para portadoras de variantes Pat. no *RAD51C* e *RAD51D* respetivamente, se estas tiverem dois familiares de primeiro grau com carcinoma tubo-ovárico. Já para o cancro da mama, o risco cumulativo, aos 80 anos, pode chegar aos 46% e 44% para

portadoras de variantes Pat. no *RAD51C* e *RAD51D* respetivamente, se estas tiverem dois familiares de primeiro grau afetados por cancro da mama (68).

Um estudo caso-controlo, um pouco mais antigo, envolvendo 3429 casos de cancro do ovário epitelial invasivo, observou um risco cumulativo, em portadoras de variantes Pat. no *RAD51C* e *RAD51D*, aos 70 anos, de 5,2% e 12% respetivamente. (69).

### **1.5. Teste de painel multigénico baseado em Sequenciação de Nova Geração**

Através da análise simultânea de vários genes, utilizando diferentes painéis multigénicos, a Sequenciação de Nova Geração, permitiu uma grande redução nos custos e tempo gasto com testes genéticos. Além disso, o teste de painel multigénico é benéfico em várias situações, nomeadamente quando as manifestações clínicas e/ou história familiar do paciente podem ser explicadas por variantes Pat. em mais que um gene (70), ou também quando há mais que um gene afetado por variantes germinativas Pat. num determinado paciente. Com o uso do teste de painel multigénico, existe também uma maior probabilidade de se detetarem variantes Pat. clinicamente relevantes (71).

A deteção de uma variante germinativa Pat. no paciente pode levar à implementação de várias estratégias de vigilância (iniciar numa idade mais jovem e/ou fazer vigilância mais intensiva), prevenção (realizar cirurgias profiláticas) e/ou tratamento (uso de terapias direcionadas). Além disso, também permite que familiares em risco sejam testados e caso sejam portadores, tomem as medidas necessárias de vigilância e prevenção. Já foi demonstrado que um aumento da vigilância e implementação de medidas profiláticas, podem levar à deteção precoce e diminuir tanto a morbilidade como a mortalidade, no caso da síndrome hereditária do cancro da mama e ovário. Além disso, pacientes com variantes germinativas Pat. em determinados genes, podem beneficiar do tratamento, por exemplo, com os inibidores da PARP (70).

#### **1.5.1. Inibidores da PARP**

Os inibidores da PARP, são utilizados para o tratamento de cancros associados a variantes germinativas Pat. no *BRCA1* e *BRCA2* (72).

A PARP constitui uma família de proteínas, da qual fazem parte a PARP1 e a PARP2, que são enzimas envolvidas na via de reparação do DNA por excisão de bases, uma das vias de reparação de danos de cadeia simples do DNA. Especificamente, a PARP1 deteta e liga-se às regiões

danificadas do DNA, utilizando o seu domínio de ligação ao DNA e depois promove a síntese da poli (ADP) ribose, iniciando vários mecanismos de reparação. (73).

Os inibidores da PARP parecem exercer a sua função de duas formas: inibindo a atividade enzimática da PARP1 e levando à sua acumulação/captura no local onde ocorreu o dano do DNA. Quando a PARP é inibida, a reparação do DNA não ocorre, o que promove quebras simples da cadeia de DNA, que não sendo reparadas, originam quebras duplas da cadeia, durante o processo de replicação do DNA. Quando a via HRR se encontra comprometida, a via de reparação não homóloga (NHEJ) ou a via de microhomologia (MMEJ) são ativadas para efetuar a reparação do DNA. Como estas vias são propensas a erros, ocorre instabilidade genómica e consequente apoptose das células. Ou seja, os inibidores da PARP atuam induzindo letalidade sintética nas células cuja via HRR se encontra comprometida (72).

Existem já vários inibidores da PARP aprovados para tratamento de cancro da mama, ovário, próstata e pâncreas, nomeadamente, o Olaparib, o Rucaparib, o Talazoparib e o Niraparib (72).

## 1.6. Objetivo

De acordo com o aqui exposto, existem vários genes nos quais a ocorrência de variantes germinativas, nomeadamente Pat./P.Pat., aumentam o risco de desenvolvimento de cancro da mama e/ou ovário. A sua identificação pode auxiliar na gestão de risco dos pacientes e familiares, e em alguns casos, direcioná-los para o tratamento com os inibidores da PARP.

Sendo assim, o objetivo do presente relatório foi investigar, variantes germinativas, em pacientes com risco para cancro da mama e/ou ovário hereditário, utilizando um painel de 18 genes de suscetibilidade para estes cancros, nomeadamente incluindo o *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *NBN*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11* e *TP53*.

## **2. Métodos**

### **2.1. Pacientes/Amostragem**

No presente estudo, foram incluídos pacientes que cumprissem um dos seguintes critérios: ter diagnóstico de cancro da mama e/ou ovário e/ou história familiar de cancro da mama e/ou ovário. Estes pacientes foram depois distribuídos por 3 grupos:

Grupo (i) ter diagnóstico de cancro da mama e/ou ovário;

Grupo (ii) ser saudável com história familiar de cancro da mama e/ou ovário;

Grupo (iii) ter diagnóstico de cancro da mama e/ou ovário e/ou pâncreas e/ou próstata com história familiar de cancro.

No total, a amostra utilizada consistiu em 306 pacientes. A idade média dos pacientes foi de 53 anos, sendo a idade mínima 29 anos e a idade máxima 89 anos. Destes 306 pacientes, 299 eram do sexo feminino (97,7%) e 7 do sexo masculino (2,3%).

### **2.2 Colheita e processamento das amostras de sangue periférico dos pacientes**

As amostras de sangue periférico dos pacientes foram colhidas para tubos com anticoagulante EDTA. Depois de entregues no laboratório, efetuou-se extração automática do DNA, utilizando o Chemagic 360 (PerkinElmer) ou o Chemagic Prepito-D (PerkinElmer). Os protocolos detalhados, encontram-se em anexo (anexo 1 e 2). Após o procedimento de extração estar concluído, a concentração de DNA foi determinada em cada amostra.

### **2.3. Sequenciação de Nova Geração**

#### **2.3.1. Quantificação da concentração de DNA no fluorímetro**

A concentração de DNA (ng/ $\mu$ L) presente em cada amostra foi determinada no fluorímetro (Quantus Fluorometer, Promega), utilizando o QuantiFluor® One dsDNA System (Promega). Esta quantificação apresenta uma maior sensibilidade em comparação à leitura da absorvância a 260nm no espectrofotómetro. Os detalhes do protocolo, encontram-se em anexo (anexo 3).

## 2.3.2. Preparação das bibliotecas genómicas

### 2.3.2.1. Obtenção de bibliotecas indexadas

As bibliotecas indexadas foram obtidas seguindo o protocolo da Twist Bioscience: "Library Preparation EF 2.0 with Enzymatic Fragmentation and Twist Universal Adapter System". As amostras de DNA, previamente quantificadas no fluorímetro, foram diluídas em água numa placa de PCR de 96 poços. Para cada amostra, colocou-se 100 ng de DNA num volume final de 40 µL (concentração final = 2,5 ng/µL).

#### 2.3.2.1.1. Fragmentação enzimática do DNA, reparação das extremidades e adição de dA aos fragmentos de DNA

Este passo foi realizado em gelo. Preparou-se a seguinte mistura de fragmentação enzimática: 4 µL de Frag/AT Buffer+ 6 µL de Frag/AT Enzymes, por reação. Adicionaram-se 10 µL a cada 40 µL de amostra de DNA e depois colocou-se a placa de 96 poços no termociclador previamente refrigerado a 4 °C (passo 1) e iniciaram-se os passos 2 a 4 do programa:

- Passo 1: 4 °C – HOLD
- Passo 2: 37 °C – (\*)
- Passo 3: 65 °C – 30 minutos
- Passo 4: 4 °C – HOLD

A fragmentação ocorreu a 37 °C e o tempo utilizado variou entre 7 – 12 minutos (\*).

#### 2.3.2.1.2. Ligação dos adaptadores e purificação

Para a ligação dos adaptadores aos fragmentos de DNA obtidos, adicionaram-se a cada amostra 5 µL de Twist Universal Adapters + 20 µL de Ligation Master Mix, no gelo, e incubou-se a 20 °C durante 15 minutos no termociclador (previamente programado para estar a 20 °C). De seguida, iniciou-se um passo de purificação, utilizando as DNA Purification Beads a 0,8 x. O *pellet* de esferas magnéticas + DNA foi lavado com etanol a 80% (preparado de fresco) e depois o DNA foi eluído em 17 µL de água. Desses 17µL, transferiram-se 15 µL para uma placa de 96 poços.

### 2.3.2.1.3. Introdução dos indexes por amplificação com os Twist Unique Dual Index Primers, purificação e controlo de qualidade

A cada biblioteca purificada, com os adaptadores ligados do passo anterior (15  $\mu$ L), adicionaram-se 10  $\mu$ L de Twist Unique Dual Index Primer + 25  $\mu$ L de Equinox Library Amp Mix (2x) e amplificou-se no termociclador, com o seguinte programa:

- Passo 1: 98°C – 45 segundos – 1x
- Passo 2: 98°C – 15 segundos  
60°C – 30 segundos  
72°C – 30 segundos } 5x
- Passo 3: 72°C – 1 minuto – 1x
- Passo 4: 4°C – HOLD

De seguida iniciou-se um passo de purificação utilizando as DNA Purification Beads a 1x. O *pellet* de esferas magnéticas + DNA foi lavado com etanol a 80% (preparado de fresco) e depois o DNA foi eluído em 22  $\mu$ L de água. Desses, transferiram-se 20  $\mu$ L para uma placa de 96 poços. As bibliotecas indexadas e amplificadas obtidas foram quantificadas (ng/ $\mu$ L) no fluorímetro (Quantus Fluorometer, Promega), utilizando o QuantiFluor® One dsDNA System (Promega), como descrito em anexo (anexo 3). O ideal é ter uma concentração entre 50 – 120 ng/ $\mu$ L.

### 2.3.2.2. Obtenção de bibliotecas enriquecidas

O enriquecimento das bibliotecas realizou-se seguindo o protocolo da Twist Bioscience: “Twist Target Enrichment Protocol” e iniciou-se com a preparação das bibliotecas indexadas e amplificadas (do passo anterior) para a hibridação.

#### 2.3.2.2.1. Preparação das bibliotecas para a hibridação

Na preparação das bibliotecas para a hibridação, colocaram-se 8 amostras/bibliotecas indexadas por *pool*. Sendo assim, para cada *pool*, colocou-se, num tubo de 1,5 mL, o volume correspondente a 187,5 ng de cada uma das 8 amostras/bibliotecas indexadas. O volume foi calculado a partir da concentração (ng/ $\mu$ L) determinada, anteriormente no fluorímetro, para cada biblioteca indexada. Depois, os tubos contendo as diferentes *pools* foram colocados num concentrador de vácuo até secarem.

#### **2.3.2.2.2. Reação de hibridação das sondas de captura com as regiões alvo**

A reação de hibridação foi efetuada seguindo o “Appendix X: Single-pot Hybridization Reaction Protocol” em vez do passo 2: “Hybridize Capture Probes with Pools” do protocolo “Twist Target Enrichment Protocol”.

Sendo assim, de seguida, ressuspendeu-se cada *pool* em: 5  $\mu$ L de Blocker Solution, 7  $\mu$ L de Universal Blockers, 20  $\mu$ L de Hybridization Mix, 4  $\mu$ L de painel e 4  $\mu$ L de água, perfazendo um volume total de 40  $\mu$ L. Transferiu-se cada *pool* (40  $\mu$ L) para um tubo de 0,2 mL e adicionaram-se 30  $\mu$ L de Hybridization Enhancer.

Para ocorrer a reação de hibridação, colocaram-se os tubos no termociclador (previamente programado para estar a 95 °C) e iniciou-se o seguinte programa:

- **Passo 1:** 95 °C – 5 minutos – 1x
- **Passo 2:** 70 °C – HOLD (16 horas)

#### **2.3.2.2.3. Ligação dos alvos hibridados às esferas de streptavidina**

Antes da reação de hibridação terminar, colocaram-se 100  $\mu$ L de Streptavidin Binding Beads, num tubo de 1,5 mL e lavaram-se com Binding Buffer. Preparou-se um tubo de 1,5 mL para cada reação de hibridação. Após as lavagens, ficou em cada tubo de 1,5 mL as Streptavidin Binding Beads + 200  $\mu$ L de Binding Buffer. Quando a hibridação terminou, transferiu-se diretamente do termociclador, para o tubo de 1,5 mL correspondente (com as Streptavidin Binding Beads + Binding Buffer), o volume de cada reação de hibridação e homogeneizou-se durante 30 minutos a 900 rpm. Após lavagens com o Wash Buffer 1 e o Wash Buffer 2, descartou-se o sobrenadante e adicionaram-se 45  $\mu$ L de água, no gelo, a cada tubo contendo os alvos hibridados e capturados nas esferas de streptavidina.

#### **2.3.2.2.4. PCR pós-captura, purificação e controlo de qualidade**

Ainda em gelo, transferiram-se 22,5  $\mu$ L, para um tubo de 0,2 mL e adicionaram-se 2,5  $\mu$ L de Amplification Primers, ILMN + 25  $\mu$ L de Equinox Library Amp Mix (2x), perfazendo um volume total de 50  $\mu$ L, por reação, estes foram colocados no termociclador e iniciou-se a amplificação, com o seguinte programa:

- **Passo 1:** 98°C – 45 segundos – 1x
- **Passo 2:** 98°C – 15 segundos  
60°C – 30 segundos  
72°C – 30 segundos } 12x
- **Passo 3:** 72°C – 1 minuto – 1x
- **Passo 4:** 4°C – HOLD

De seguida, efetuou-se um passo de purificação utilizando as DNA Purification Beads a 1 x. O *pellet* de esferas magnéticas e DNA foi lavado com etanol a 80% (preparado de fresco) e depois o DNA foi eluído em 32 µL de água. Desses 32 µL, transferiram-se 30 µL para uma placa de PCR de 96 poços. As bibliotecas enriquecidas obtidas foram quantificadas no fluorímetro. O tamanho dos fragmentos foi determinado no TapeStation 4200 (Agilent) com o High Sensitivity D1000 ScreenTape Assay for TapeStation Systems (Agilent). O tamanho final ideal para os fragmentos é entre 400–500 bp. Com estes valores (tamanho e concentração), calcula-se o necessário para colocar 1,8 pM de bibliotecas num volume final de 1,3 mL (os detalhes do protocolo encontram-se no anexo 4) no sequenciador (Illumina NextSeq 500 System).

### 2.3.3. Análise dos dados obtidos

A análise das diferentes amostras foi realizada por painel multigénico, incluindo os seguintes genes: *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *EPCAM*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *NBN*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RAD51C*, *RAD51D*, *STK11* e *TP53*. Todos os exões e transições intrão-exão dos genes foram analisados, sendo a cobertura mínima de 20x. Nas regiões em que a cobertura mínima foi inferior a 20x realizou-se Sequenciação de Sanger. As sequências foram alinhadas com o genoma de referência UCSC hg19 e as variantes genéticas foram identificadas utilizando um *pipeline* bioinformático da Synlab, que permite detetar SNVs/indels e também CNVs, e classificadas segundo os critérios do “American College of Medical Genetics and Genomics” (ACMG). As SNVs/indels Pat./P.Pat. identificadas foram confirmadas por Sequenciação de Sanger e os CNVs por MLPA. No presente estudo, foram incluídas apenas as variantes Pat./P.Pat. e as variantes de Significado Clínico Incerto (VUS) detetadas.

Devido à dificuldade em detetar a variante c.156\_157insAlu no exão 3 do gene *BRCA2* por Sequenciação de Nova Geração, a sua presença foi investigada por PCR, seguido de eletroforese em gel de agarose.

### 3. Resultados

#### 3.1. Análise da amostra total de 306 pacientes

Em primeiro lugar, a presença/ausência de variantes germinativas foi investigada na amostra total de 306 pacientes, dos quais, como referido anteriormente 299 (97,7%) eram do sexo feminino e 7 (2,3%) do sexo masculino. A idade média dos 306 pacientes foi de 53 anos.

Quanto à presença/ausência de história familiar de cancro, verificou-se que dos 306 pacientes, 149 (48,7%) tinham história familiar de cancro e 157 (51,3%) não tinham.

Relativamente ao diagnóstico, dos 306 pacientes, 270 (88,2%) tinham cancro da mama, 16 (5,2%) tinham cancro da mama e outros cancros (endométrio, útero, gástrico, colorretal, cólon, reto, tireide, linfoma não Hodgkin, linfoma de Hodgkin, pele, bexiga e intestino delgado), 7 (2,3%) tinham cancro do ovário, 4 (1,3%) eram saudáveis, 2 (0,7%) tinham cancro do pâncreas, 2 (0,7%) tinham cancro da mama e do pâncreas, 2 (0,7%) tinham cancro da próstata, 1 (0,3%) tinha cancro da próstata e outros cancros (colorretal), 1 (0,3%) tinha cancro do ovário e outros cancros (peritoneu) e 1 (0,3%) tinha cancro da mama e do ovário (tabela 1).

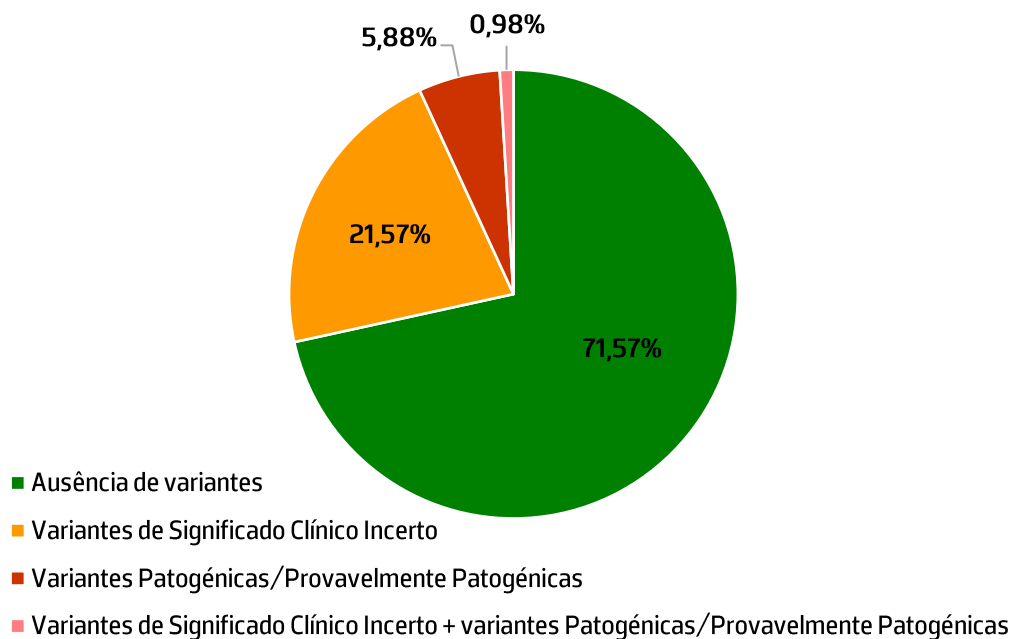
Tabela 1. Análise dos 306 pacientes quanto ao diagnóstico.

Diagnóstico	Sexo feminino (n=299)	Sexo masculino (n=7)	Ambos os sexos (n=306)
Cancro da mama	267	3	270 (88,2%)
Cancro da mama e outros (*)	16	-	16 (5,2%)
Cancro do ovário	7	-	7 (2,3%)
Saudáveis	4	-	4 (1,3%)
Cancro do pâncreas	1	1	2 (0,7%)
Cancro da mama e pâncreas	2	-	2 (0,7%)
Cancro da próstata	-	2	2 (0,7%)
Cancro da próstata e outros (§)	-	1	1 (0,3%)
Cancro do ovário e outros (#)	1	-	1 (0,3%)
Cancro da mama e ovário	1	-	1 (0,3%)

(\*)endométrio, útero, gástrico, colorretal, cólon, reto, tireide, linfoma não Hodgkin, linfoma de Hodgkin, pele, bexiga e intestino delgado; (§)colorretal; (#)peritoneu

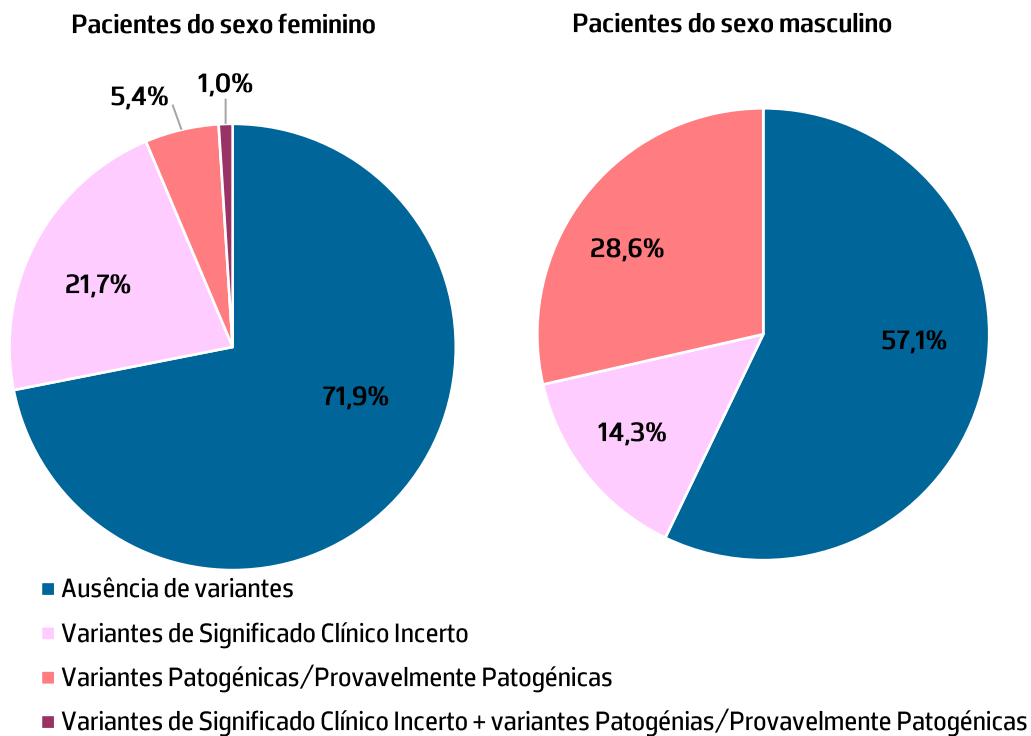
### 3.1.1. Análise da presença/ausência de variantes germinativas nos 18 genes do painel utilizado, nos 306 pacientes

Verificou-se que 219 (71,57%) dos 306 pacientes não apresentaram variantes nos 18 genes do painel utilizado. Nos 87 (28,43%) pacientes em que se detetaram variantes, verificou-se que 66 (21,57%) tinham VUS, 18 (5,88%) tinham variantes Pat./P.Pat. e ainda que 3 (0,98%) tinham VUS e variantes Pat./P.Pat. (fig.1).



**Figura 1.** Análise dos 306 pacientes quanto à presença/ausência de variantes nos 18 genes do painel utilizado.

Separando os 306 pacientes por sexo (feminino e masculino), pode observar-se que 42,9% dos homens (3/7) e 28,1% (84/299) das mulheres apresentavam variantes germinativas nos 18 genes do painel utilizado. 14,3% dos homens (1/7) e 21,7% das mulheres (65/299) apresentavam VUS. Já no que diz respeito a variantes Pat./P.Pat., observaram-se em 28,6% dos homens (2/7) em comparação com apenas 5,4% das mulheres (16/299). Verificou-se ainda que 1% (3/299) das mulheres apresentava VUS e variantes Pat./P.Pat. (fig.2).

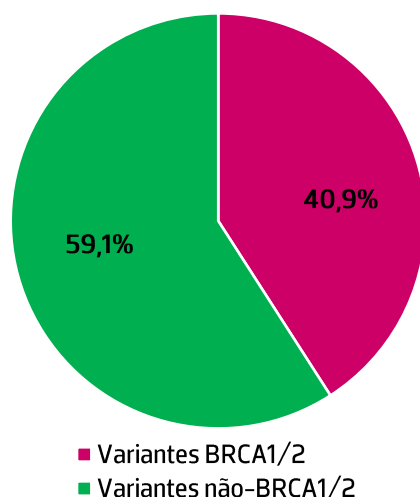


**Figura 2.** Análise dos 306 pacientes separados por sexo feminino e masculino quanto à presença/ausência de variantes nos 18 genes do painel utilizado.

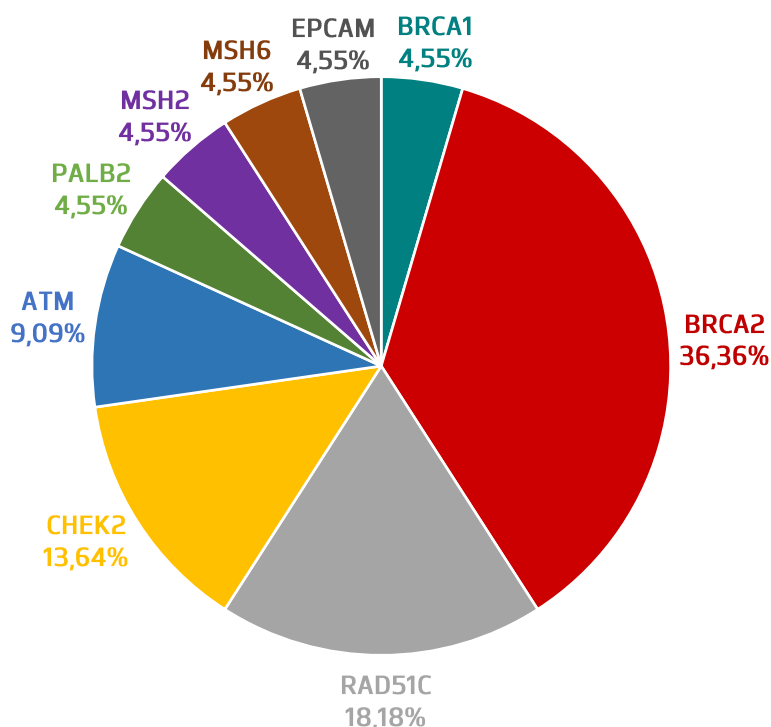
No total, nos 306 pacientes, foram detetadas 102 variantes, 80 VUS e 22 variantes Pat./P.Pat..

### 3.1.2. Variantes germinativas Patogénicas/Provavelmente Patogénicas detetadas nos 18 genes do painel utilizado, nos 306 pacientes

Relativamente às variantes Pat./P.Pat., das 22 detetadas, verificou-se que 9 (40,9%) eram nos genes *BRCA1/2* e 13 (59,1%) em genes não-*BRCA1/2* (fig. 3). Ou seja, a maioria das variantes Pat./P.Pat. foram detetadas em genes não-*BRCA1/2*: 4 (18,18%) no *RAD51C*, 3 (13,64%) no *CHEK2*, 2 (9,09%) no *ATM* e 1 (4,55%) no *PALB2*, no *MSH2*, no *MSH6* e no *EPCAM* (fig. 4). Relativamente aos genes *BRCA1/2*, foram encontradas 8 (36,36%) variantes no *BRCA2* e apenas 1 (4,55%) no *BRCA1* (fig. 4). Sendo assim, os genes que apresentaram mais variantes Pat./P.Pat. foram o *BRCA2* (36,36%), o *RAD51C* (18,18%) e o *CHEK2* (13,64%).



**Figura 3.** Percentagem de variantes Pat./P.Pat. nos genes *BRCA1/2* e em genes não-*BRCA1/2* do painel utilizado, nos 306 pacientes.



**Figura 4.** Percentagem de variantes Pat./P.Pat. encontradas nos 18 genes do painel utilizado, nos 306 pacientes.

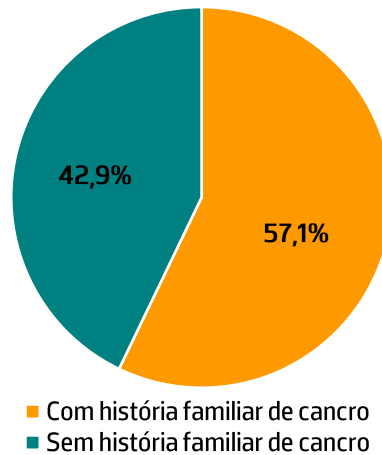
As variantes Pat./P.Pat. detetadas nos 18 genes do painel utilizado no estudo, encontram-se na tabela 2. Todas foram encontradas em heterozigotia. No paciente #107, observou-se a presença de 2 variantes: 1 Pat. no *BRCA2* e 1 P.Pat. no *CHEK2*. Além disso, verificou-se que em 3 pacientes, além das variantes Pat./P.Pat., também foram encontradas VUS. O paciente #218, apresentou, além da variante Pat. no *BRCA2*, 1 VUS no *ATM*, o paciente #268, além da variante P.Pat. no

*BRCA2*, apresentou 1 VUS também no *BRCA2* e o #289 além da Pat. no *BRCA2*, apresentou 1 VUS no *MLH1*. Ou seja, 3 (37,5 %) das 8 variantes Pat./P.Pat. encontradas no gene *BRCA2*, surgiram acompanhadas por variantes noutros genes do painel multigénico utilizado.

Tabela 2. Variantes Pat./P.Pat. detetadas nos 18 genes do painel utilizado, nos 306 pacientes.

Nº atribuído ao paciente no estudo	Género	Idade	Informações clínicas		Gene	Variante	Classificação	Grupo
			Diagnóstico	História familiar de cancro				
#11	Feminino	37	Cancro da mama	-	<i>BRCA2</i>	c.6600_6601del (p.Ser2201Ter)	Patogénica	(i)
#33	Feminino	45	Cancro da mama	-	<i>BRCA1</i>	deleção exão 3	Patogénica	(i)
#37	Feminino	41	Cancro da mama	Cancro do pâncreas, gástrico e colorretal	<i>PALB2</i>	c.1438A>T (p.Lys480Ter)	Patogénica	(iii)
#44	Feminino	41	Cancro da mama	Não especificado o tipo de cancro	<i>RAD51C</i>	c.890_899del (p.Leu297fs)	Patogénica	(iii)
#58	Feminino	55	Cancro da mama	Cancro do ovário e gástrico	<i>ATM</i>	c.4115del (p.Leu1372fs)	Patogénica	(iii)
#63	Feminino	38	Cancro da mama	-	<i>BRCA2</i>	c.1593dup (p.Glu532fs)	Patogénica	(i)
#81	Feminino	89	Cancro da mama	-	<i>ATM</i>	c.6692del (p.Leu2231fs)	Provavelmente Patogénica	(i)
#107	Feminino	58	Cancro do pâncreas	Cancro de mama	<i>BRCA2</i>	c.9074_9075del (p.Ile3025fs)	Patogénica	(iii)
					<i>CHEK2</i>	c.1169A>C (p.Tyr390Ser)	Provavelmente Patogénica	
#116	Masculino	75	Cancro do pâncreas	Cancro da mama, pâncreas, próstata, tireoide e pulmão	<i>RAD51C</i>	c.404G>A (p.Cys135Tyr)	Provavelmente Patogénica	(iii)
#171	Feminino	50	Cancro da mama	Cancro da mama	<i>CHEK2</i>	c.1427C>T (p.Thr476Met)	Provavelmente Patogénica	(iii)
#178	Feminino	84	Cancro da mama e ovário	Não especificado o tipo de cancro	<i>RAD51C</i>	c.709C>T (p.Arg237Ter)	Patogénica	(iii)
#207	Feminino	63	Cancro da mama, gástrico e colorretal	Cancro da mama e colorretal	<i>MSH2</i>	c.2152C>T (p.Gln718Ter)	Patogénica	(iii)
#213	Masculino	59	Cancro da próstata	Cancro da mama	<i>BRCA2</i>	c.156_157insAlu	Patogénica	(iii)
#216	Feminino	75	Cancro da mama	-	<i>MSH6</i>	c.3226C>T (p.Arg1076Cys)	Provavelmente Patogénica	(i)
#218	Feminino	41	Cancro da mama	-	<i>BRCA2</i>	c.1138del (p.Ser380fs)	Patogénica	(i)
#236	Feminino	59	Cancro da mama	-	<i>EPCAM</i>	c.84_87del (p.Cys29fs)	Provavelmente Patogénica	(i)
#241	Feminino	46	Cancro da mama	-	<i>RAD51C</i>	c.444del (p.Phe148fs)	Patogénica	(i)
#251	Feminino	53	Cancro da mama	Não especificado o tipo de cancro	<i>BRCA2</i>	c.67+2T>C	Patogénica	(iii)
#268	Feminino	44	Cancro da mama	-	<i>BRCA2</i>	c.492_495del (p.Leu164fs)	Provavelmente Patogénica	(i)
#275	Feminino	50	Cancro da mama	Não especificado o tipo de cancro	<i>CHEK2</i>	c.593-1G>T	Provavelmente Patogénica	(iii)
#289	Feminino	49	Cancro da mama	Cancro da próstata	<i>BRCA2</i>	c.6001dup (p.Ser2001fs)	Patogénica	(iii)

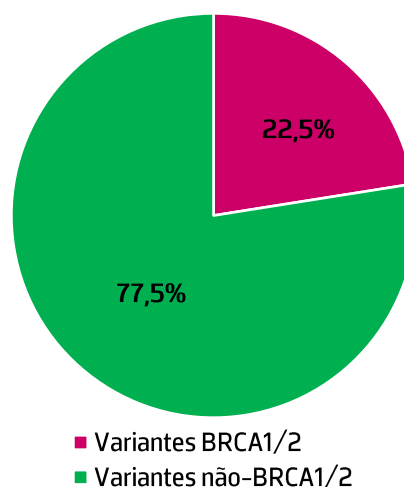
Dos 21 pacientes que apresentaram variantes Pat./P.Pat. nos genes do painel utilizado, a maioria, ou seja 57,1% (12 pacientes) tinha história familiar de cancro (fig. 5).



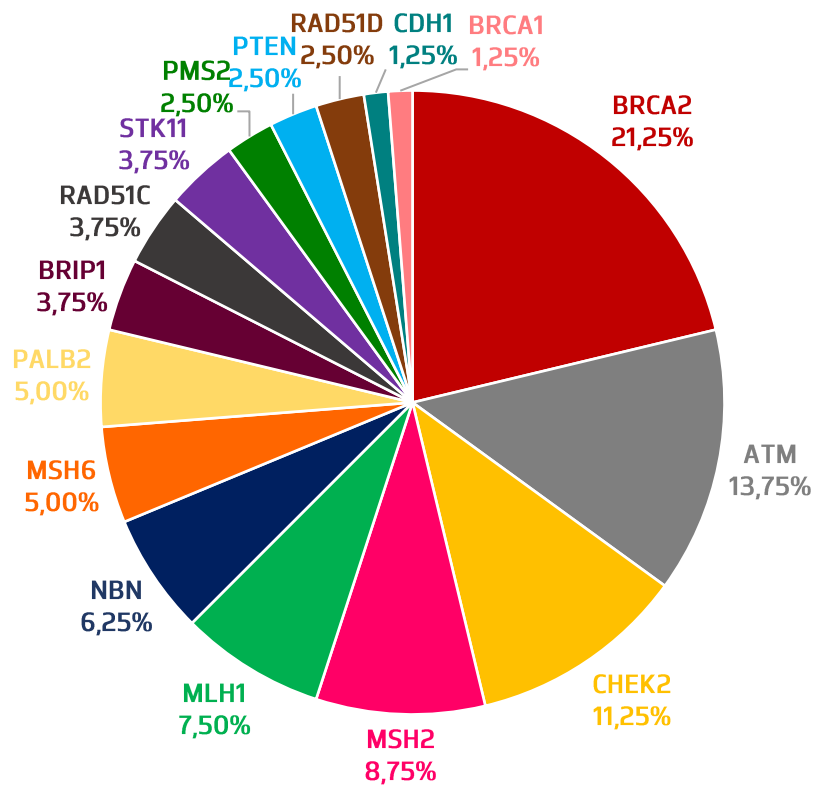
**Figura 5.** Análise dos pacientes com variantes Pat./P.Pat. quanto à presença/ausência de história familiar de cancro.

### 3.1.3. Variantes germinativas de Significado Clínico Incerto detetadas nos 18 genes do painel utilizado, nos 306 pacientes

Relativamente às VUS, das 80 detetadas, verificou-se que 18 (22,5%) eram nos genes *BRCA1/2* e 62 (77,5%) em genes não-*BRCA1/2* (fig. 6). Ou seja, tal como aconteceu para as variantes Pat./P.Pat., a maioria ocorreu em genes não-*BRCA1/2*: 11 (13,75%) no *ATM*, 9 (11,25%) no *CHEK2*, 7 (8,75%) no *MSH2*, 6 (7,50%) no *MLH1*, 5 (6,25%) no *NBN*, 4 (5,00%) no *MSH6* e no *PALB2*, 3 (3,75%) no *BRIP1*, no *RAD51C* e no *STK11*, 2 (2,50%) no *PMS2*, no *PTEN* e no *RAD51D* e 1 (1,25%) no *CDH1* (fig. 7). Relativamente aos genes *BRCA1/2*, foram encontradas 17 (21,25%) variantes no *BRCA2* e apenas 1 (1,25%) no *BRCA1* (fig. 7). Sendo assim, os genes que apresentaram mais VUS foram o *BRCA2* (21,25%), o *ATM* (13,75%) e o *CHEK2* (11,25%).



**Figura 6.** Percentagem de VUS nos genes *BRCA1/2* e em genes não-*BRCA1/2* do painel utilizado, nos 306 pacientes.

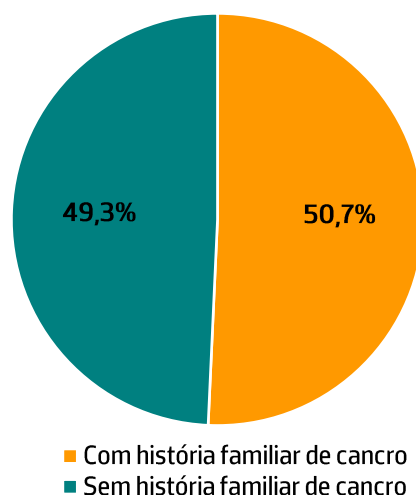


**Figura 7.** Percentagem de VUS detetadas nos 18 genes do painel utilizado, nos 306 pacientes.

As VUS detetadas nos genes do painel utilizado encontram-se numa tabela em anexo (anexo 5). Das 80 variantes, 79 foram encontradas em heterozigotia, apenas a variante no gene *NBN* do paciente #82 foi encontrada em homozigotia. Em 11 pacientes (#87, #117, #129, #134, #147, #148, #164, #185, #197, #231 e #283) observou-se a presença de 2 VUS em 2 genes diferentes do painel. Nestes 11 pacientes, foi no *BRCA2* que se observaram mais variantes (4 no total) acompanhadas por variantes noutros genes do painel.

Como referido anteriormente, nos pacientes #218, #268 e #289, observou-se, além de 1 VUS, também 1 variante Pat/P.Pat..

Dos 69 pacientes com VUS nos genes do painel utilizado, a maioria, ou seja, 50,7% (35 pacientes) tinha história familiar de cancro (fig. 8).



**Figura 8.** Análise dos pacientes com VUS quanto à presença/ausência de história familiar de cancro.

### 3.1.4. Achados incidentais no gene *NTHL1* e no *BAP1*

Nos pacientes #132 e #228, apesar de não terem sido encontradas variantes nos 18 genes do painel multigénico utilizado, foi detetada 1 variante Pat. em genes fora do painel. No #132 foi detetada uma variante Pat. no gene *NTHL1* em homozigotia e no #228 foi detetada uma variante Pat. no *BAP1* em heterozigotia. Estas variantes encontram-se na tabela 3.

**Tabela 3.** Variantes Pat. detetadas no *NTHL1* e no *BAP1*.

Nº atribuído ao paciente no estudo	Género	Idade	Informações clínicas		Gene	Variante	Classificação
			Diagnóstico	História familiar de cancro			
#132	Feminino	70	Cancro da mama, cólon e endométrio	-	<i>NTHL1</i>	c.268C>T (p.Gln90Ter)	Patogénica
#228	Feminino	46	Cancro da mama	Não especificado o tipo de cancro	<i>BAP1</i>	c.1203T>G (p.Tyr401Ter)	Patogénica

### 3.2. Análise dos diferentes grupos de pacientes

Com o objetivo de compreender melhor o impacto da história familiar de cancro, na ausência/presença de variantes germinativas, os 306 pacientes foram divididos em 3 grupos: grupo (i) ter diagnóstico de cancro da mama e/ou ovário; (ii) ser saudável com história familiar de cancro da mama e/ou ovário; (iii) ter diagnóstico de cancro da mama e/ou ovário e/ou pâncreas e/ou próstata com história familiar de cancro.

O Grupo (i) tinha na sua composição 157 pacientes, dos quais 155 (98,7%) eram do sexo feminino e 2 (1,3%) do sexo masculino. A idade média neste grupo foi de 53 anos.

O Grupo (ii) tinha na sua composição 4 pacientes, todos do sexo feminino e com idade média de 41 anos. Dos 4 pacientes do grupo (ii), 2 (50%) tinham história familiar de cancro da mama, 1 (25%) tinha história familiar de cancro da mama e do ovário e 1 (25%) tinha história familiar de cancro da mama e da próstata.

O Grupo (iii) tinha na sua composição 145 pacientes, dos quais 140 (96,6%) eram do sexo feminino e 5 (3,4%) do sexo masculino. A média de idades deste grupo foi de 54 anos. Todos os pacientes deste grupo tinham história familiar de cancro. O cancro da mama, colorretal, próstata, pâncreas, pulmão, gástrico e ovário estavam entre os cancros mais comuns nos familiares dos pacientes, naqueles em que o tipo de cancro se encontrava especificado.

A distribuição dos diagnósticos dentro de cada grupo, encontra-se na tabela 4.

**Tabela 4.** Distribuição dos diagnósticos dentro de cada grupo.

Diagnóstico	Grupo (i) (n=157)	Grupo (ii) (n=4)	Grupo (iii) (n=145)
Cancro da mama	148 (94,3%)	-	122 (84,14%)
Cancro da mama e outros (*)	4 (2,5%)	-	12 (8,28%)
Cancro do ovário	3 (1,9%)	-	4 (2,76%)
Saudáveis	-	4 (100%)	-
Cancro do pâncreas	-	-	2 (1,38%)
Cancro da mama e pâncreas	2 (1,3%)	-	-
Cancro da próstata	-	-	2 (1,38%)
Cancro da próstata e outros (§)	-	-	1 (0,69%)
Cancro do ovário e outros (#)	-	-	1 (0,69%)
Cancro da mama e ovário	-	-	1 (0,69%)

(\*)endométrio, útero, gástrico, colorretal, cólon, reto, tireoide, linfoma não Hodgkin, linfoma de Hodgkin, pele, bexiga e intestino delgado; (§)colorretal; (#)peritoneu

A distribuição, pelos diferentes grupos, das variantes Pat./P.Pat. e das VUS, detetadas nos 18 genes do painel utilizado, encontram-se respetivamente na tabela 2 e na tabela do anexo 5.

### 3.2.1. Comparação dos 3 grupos quanto à percentagem de pacientes com variantes nos 18 genes do painel utilizado

De modo a percebermos melhor as diferenças entre os 3 grupos, os valores obtidos a partir da análise separada de cada grupo foram comparados. Observando a tabela 5, foi possível verificar

que o grupo (ii) é o grupo em que há uma maior percentagem de pacientes com variantes nos 18 genes do painel utilizado. Este grupo apresentou 50% de pacientes com variantes, seguido do grupo (iii) com 30,35% e depois o grupo (i) com 26,11%. Olhando apenas para os pacientes com VUS, podemos verificar que o grupo (ii) apresenta a maior percentagem, nomeadamente 50%, seguido do grupo (iii) com 22,07% e depois o grupo (i) com 20,38%. Já relativamente aos pacientes com variantes Pat./P.Pat., observou-se a maior percentagem no grupo (iii), com 7,59%, seguido do grupo (i) com 4,46%. No grupo (ii), nenhum paciente apresentou variantes Pat./P.Pat.. Foi ainda observado que o grupo (iii), assim como o (i) tinham na sua composição pacientes com VUS e variantes Pat./P.Pat., sendo a percentagem maior no grupo (i), com 1,27%. O grupo (iii), apresentou 0,69%.

**Tabela 5.** Percentagem de pacientes com variantes nos 18 genes do painel multigénico utilizado, nos 3 grupos.

Pacientes	Grupo (i) (n=157)	Grupo (ii) (n=4)	Grupo (iii) (n=145)
Com variantes	26,11% (41/157)	50% (2/4)	30,35% (44/145)
Com variantes de Significado Clínico Incerto	20,38% (32/157)	50% (2/4)	22,07% (32/145)
Com variantes Patogénicas/ Provavelmente Patogénicas	4,46% (7/157)	-	7,59% (11/145)
Com variantes de Significado Clínico Incerto e Patogénicas/ Provavelmente Patogénicas	1,27% (2/157)	-	0,69% (1/145)

### 3.2.2. Comparação dos 3 grupos quanto à percentagem de variantes Patogénicas/Provavelmente Patogénicas detetadas nos 18 genes do painel utilizado

Analisando a tabela 6, pode observar-se que no grupo (i) a maioria das variantes Pat./P.Pat. detetadas nos 18 genes do painel, ocorreu nos genes *BRCA1/2*, 55,6%, ao contrário do que aconteceu no grupo (iii), em que a maioria ocorreu em genes não-*BRCA1/2*, 69,2%. Verificou-se também que tanto no grupo (i), como no grupo (iii), o gene com maior percentagem de variantes Pat./P.Pat. foi o *BRCA2*. No grupo (i) apresentou 44,44% de variantes Pat./P.Pat., uma percentagem maior que no grupo (iii), onde apresentou 30,77%. Olhando para os genes não-*BRCA1/2*, aqueles que apresentaram uma maior percentagem de variantes Pat./P.Pat. no grupo (iii) foram o *RAD51C* e o *CHEK2* com 23,08% cada. No grupo (i), todos os genes não-*BRCA1/2* apresentaram 11,11% de variantes Pat./P.Pat.. No grupo (iii), nenhuma variante Pat./P.Pat. foi detetada no *BRCA1*, no *MSH6* e no *EPCAM*, enquanto no grupo (i) estes genes apresentaram

11,11% de variantes cada um. Já no grupo (i), nenhuma variante Pat./P.Pat. foi detetada no *CHEK2*, no *PALB2* e no *MSH2*, enquanto no grupo (iii), o *CHEK2* apresentou 23,08% de variantes Pat./P.Pat. e o *PALB2* e o *MSH2* 7,69% cada. O *RAD51C* apresentou uma maior percentagem de variantes Pat./P.Pat. no grupo (iii) com 23,08% e apenas 11,11% no grupo (i). Já o *ATM*, apresentou uma maior percentagem de variantes Pat./P.Pat. no grupo (i) com 11,11% e apenas 7,69% no grupo (iii).

**Tabela 6.** Percentagem de variantes Pat./P.Pat. detetadas nos 18 genes do painel multigénico utilizado, nos 3 grupos.

Variantes Patogénicas/Provavelmente Patogénicas	Grupo (i) (Total: 9 variantes)	Grupo (ii) (Total: 0 variantes)	Grupo (iii) (Total: 13 variantes)
<i>BRCA1/2</i>	55,6% (5/9)	-	30,8% (4/13)
não- <i>BRCA1/2</i>	44,4% (4/9)	-	69,2% (9/13)
<i>BRCA1</i>	11,11% (1/9)	-	-
<i>BRCA2</i>	44,44% (4/9)	-	30,77% (4/13)
<i>RAD51C</i>	11,11% (1/9)	-	23,08% (3/13)
<i>CHEK2</i>	-	-	23,08% (3/13)
<i>ATM</i>	11,11% (1/9)	-	7,69% (1/13)
<i>PALB2</i>	-	-	7,69% (1/13)
<i>MSH2</i>	-	-	7,69% (1/13)
<i>MSH6</i>	11,11% (1/9)	-	-
<i>EPCAM</i>	11,11% (1/9)	-	-

### 3.2.3. Comparação dos 3 grupos quanto à percentagem de variantes de Significado Clínico Incerto detetadas nos 18 genes do painel utilizado

Relativamente às VUS nos 18 genes do painel multigénico utilizado, como podemos ver, analisando a tabela 7, verificou-se que no grupo (i), a maioria ocorreu em genes não-*BRCA1/2*, nomeadamente 81,1%, assim como aconteceu no grupo (iii), com 75,6%. No grupo (ii) 50% ocorreram nos genes *BRCA1/2* e 50% em genes não-*BRCA1/2*. Este grupo apresentou apenas 2 variantes, sendo 1 no *BRCA2* (50%) e outra no *MSH6* (50%). O *BRCA2*, foi o gene com mais VUS no grupo (i) (juntamente com o *ATM*), com 16,22% e no grupo (iii) com 24,39%. O *ATM* foi o gene não-*BRCA1/2* com maior percentagem de VUS no grupo (i) com 16,22%, seguido do *PALB2* com 10,81%. No grupo (iii), os genes não-*BRCA1/2* com maior percentagem de VUS foram o *CHEK2*

com 14,63% e também o *ATM* com 12,20%. No grupo (i) o *CHEK2* apresentou apenas 8,11% de VUS. Também o *MSH2*, o *MLH1*, o *RAD51C* e o *STK11*, apresentaram maior percentagem de VUS no grupo (iii) do que no grupo (i): o *MSH2* apresentou 9,76% no grupo (iii) e 8,11% no grupo (i); o *MLH1* apresentou também 9,76% no grupo (iii) e 5,41% no grupo (i); o *RAD51C* e o *STK11* apresentaram 4,88% cada um no grupo (iii) e 2,70% cada um no grupo (i). Já o *NBN*, apresentou maior percentagem de VUS no grupo (i) com 8,11%, em comparação com o grupo (iii), onde apresentou apenas 4,88%. O *MSH6*, como já referido, apresentou 50% de VUS no grupo (ii) e apenas 4,88% no grupo (iii) e 2,70% no grupo (i). O *BRCA1*, o *PALB2*, o *PMS2*, o *PTEN* e o *RAD51D* apresentaram VUS apenas no grupo (i), o *BRCA1* apresentou 2,70%, o *PALB2* como já referido apresentou 10,81% e o *PMS2*, o *PTEN* e o *RAD51D* apresentaram 5,41% cada. Já o *BRIP1* e o *CDH1* apresentaram VUS apenas no grupo (iii), o *BRIP1* apresentou 7,32% e o *CDH1* apresentou 2,44%.

**Tabela 7.** Percentagem de VUS detetadas nos 18 genes do painel multigénico utilizado, nos 3 grupos.

Variantes de Significado Clínico Incerto	Grupo (i) (Total: 37 variantes)	Grupo (ii) (Total: 2 variantes)	Grupo (iii) (Total: 41 variantes)
<i>BRCA1/2</i>	18,9% (7/37)	50% (1/2)	24,4% (10/41)
não- <i>BRCA1/2</i>	81,1% (30/37)	50% (1/2)	75,6% (31/41)
<i>BRCA1</i>	2,70% (1/37)	-	-
<i>BRCA2</i>	16,22% (6/37)	50% (1/2)	24,39% (10/41)
<i>ATM</i>	16,22% (6/37)	-	12,20% (5/41)
<i>CHEK2</i>	8,11% (3/37)	-	14,63% (6/41)
<i>MSH2</i>	8,11% (3/37)	-	9,76% (4/41)
<i>MLH1</i>	5,41% (2/37)	-	9,76% (4/41)
<i>NBN</i>	8,11% (3/37)	-	4,88% (2/41)
<i>MSH6</i>	2,70% (1/37)	50% (1/2)	4,88% (2/41)
<i>PALB2</i>	10,81% (4/37)	-	-
<i>BRIP1</i>	-	-	7,32% (3/41)
<i>RAD51C</i>	2,70% (1/37)	-	4,88% (2/41)
<i>STK11</i>	2,70% (1/37)	-	4,88% (2/41)
<i>PMS2</i>	5,41% (2/37)	-	-
<i>PTEN</i>	5,41% (2/37)	-	-
<i>RAD51D</i>	5,41% (2/37)	-	-
<i>CDH1</i>	-	-	2,44% (1/41)

#### 4. Discussão

No presente estudo, verificou-se que dos 306 pacientes, 28,43% (87) apresentavam variantes germinativas em genes do painel multigénico utilizado. Sessenta e seis (21,57%) pacientes tinham VUS, 5,88% (18) tinham variantes Pat./P.Pat. e 0,98% (3) tinham VUS e variantes Pat./P.Pat.. No total, podemos dizer que 6,86% (5,88% + 0,98%) dos pacientes apresentavam variantes Pat./P.Pat. e 22,55% (21,57% + 0,98%) apresentavam VUS, nos 18 genes do painel utilizado. Relativamente ao número de variantes, no total foram detetadas 102, das quais 22 eram Pat./P.Pat. e 80 eram VUS, o que equivale a uma prevalência de variantes Pat./P.Pat. de 7,18% (22/306 pacientes) e de VUS de 26,14% (80/306 pacientes).

Adam *et al.*, utilizaram o teste de painel multigénico em pacientes com suspeita de síndrome hereditária de cancro da mama e ovário, diagnosticados com cancro da mama, cancro do ovário, entre outros cancros, ou que tinham história familiar sugestiva desta síndrome. Com um painel multigénico > 10 genes (no qual, estavam incluídos todos os genes do nosso painel), testado em 283 pacientes, observaram uma prevalência de variantes Pat./P.Pat. de 5,7% (71). A prevalência observada no nosso estudo foi superior, possivelmente, porque como Adam *et al.* referiram, alguns pacientes que foram avaliados com o painel multigénico > 10 genes deles, já tinham sido testados anteriormente para *BRCA1/2* e eram negativos. Para contornar exatamente essa limitação, excluíram os portadores de variantes Pat./P.Pat. no *BRCA1/2*, chegando a uma prevalência de variantes Pat./P.Pat. em genes não-*BRCA1/2* de 3,9% (71). Se no presente estudo excluirmos também todos os pacientes com variantes Pat./P.Pat. no *BRCA1/2* (9 pacientes, dos quais 1 deles tinha também uma variante P.Pat. no *CHEK2*), observamos um valor muito semelhante para a prevalência de variantes Pat./P.Pat. em genes não-*BRCA1/2*, nomeadamente de 4,04% (12/297 pacientes).

Kurian *et al.*, num estudo, envolvendo um grande número de pacientes do sexo feminino (n=95561), com diagnóstico de cancro da mama e ovário, mas não só, e com ou sem história familiar de cancro da mama e ovário, testados com um painel multigénico de cancro hereditário de 25 genes (que incluía todos os genes do nosso painel, com exceção do *MLH1* e *EPCAM*), observaram que cerca de 7% dos pacientes apresentavam variantes Pat. (53), um valor semelhante ao observado no nosso estudo, em que 6,86% dos pacientes eram portadores de variantes Pat./P.Pat..

Noutro estudo, realizado por Kapoor *et al.*, incluindo 337 pacientes, maioritariamente diagnosticados com cancro da mama e com história familiar de cancro da mama, que foram

submetidos a teste de painel multigénico, observou-se que 7,4% dos pacientes tinham variantes Pat., sendo que em 3,6% dos pacientes as variantes eram nos genes *BRCA1/2* e em 3,9% as variantes eram em genes não-*BRCA1/2* (74). No presente estudo, como já referido, observámos que 6,86% dos pacientes eram portadores de variantes Pat./P.Pat, sendo que destes, 2,61% (8/306) tinham variantes nos genes *BRCA1/2*, 3,92% (12/306) tinham variantes em genes não-*BRCA1/2* e havia ainda 0,33% (1/306) que tinham variantes em genes não-*BRCA1/2* e *BRCA1/2*. Sendo assim, os nossos resultados são semelhantes também aos observados por Kappor *et al.*, que tal como nós verificaram que havia mais pacientes com variantes Pat./P.Pat. em genes não-*BRCA1/2*, do que nos genes *BRCA1/2*, embora no nosso estudo, a percentagem de pacientes com variantes Pat./P.Pat. no *BRCA1/2* tenha sido um pouco inferior. Além disso, no presente estudo observámos que das 22 variantes Pat./P.Pat. detetadas, 59,1% eram em genes não-*BRCA1/2*, e 40,9% nos genes *BRCA1/2*. Valores semelhantes foram observados por Kapoor *et al.* (74) e por Kurian *et al.* (53), embora nós tivéssemos observado uma percentagem superior de variantes Pat./P.Pat. em genes não-*BRCA1/2*. No estudo de Kapoor *et al.*, 52% das variantes Pat./P.Pat. estavam presentes em genes não-*BRCA1/2* e 48% nos genes *BRCA1/2* (74), já no estudo de Kurian *et al.*, 56% estavam presentes em genes não-*BRCA1/2* e 44% em genes *BRCA1/2*. (53).

Sendo assim, o presente estudo, juntamente com os outros aqui discutidos, demonstram a importância de usar painéis multigénicos, que permitam investigar a presença de variantes Pat./P.Pat. em vários genes de suscetibilidade para o cancro da mama e/ou ovário hereditário, e não apenas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. A percentagem de variantes Pat./P.Pat. observadas foi maior em genes não-*BRCA1/2* e além disso, e mais importante, variantes Pat./P.Pat. em genes de suscetibilidade para cancro da mama e/ou ovário não-*BRCA1/2*, seriam perdidas em cerca de 4% dos pacientes, se apenas fossem testados isoladamente os genes *BRCA1* e *BRCA2*. Quer isto dizer, que em cerca de 4% dos pacientes não iria existir gestão de risco e por isso, mesmo nos casos em que são aconselhadas e há evidências de benefício, não seriam adotadas quaisquer estratégias profiláticas, de vigilância ou tratamento.

#### **4.1. Variantes Patogénicas/Provavelmente Patogénicas detetadas nos 18 genes do painel**

Entre os 18 genes que constituíam o painel utilizado no presente trabalho, o que apresentou uma maior percentagem de variantes Pat./P.Pat. foi o *BRCA2* com 36,36% (8), seguido do *RAD51C*

com 18,18% (4), o *CHEK2* com 13,64% (3) e o *ATM* com 9,09% (2). Variantes Pat./P.Pat. também foram observadas no *BRCA1*, no *PALB2*, no *MSH2*, no *MSH6* e no *EPCAM*.

Adam *et al.*, observaram que os genes não-*BRCA1/2* no painel >10 genes, com mais variantes Pat./P.Pat. foram o *RAD51D*, o *RAD51C* e o *BRIP1* (71), enquanto na investigação realizada por Kurian *et al.* os genes não-*BRCA1/2* com mais variantes Pat./P.Pat. foram o *CHEK2*, *ATM* e o *PALB2* (53). Já Kappor *et al.* observaram que o *PALB2*, o *CHEK2* e o *ATM* também se encontravam entre os genes não-*BRCA1/2* com mais variantes Pat./P.Pat. (74). De acordo com Kurian *et al.* e Kapoor *et al.*, no presente trabalho, o *CHEK2* e o *ATM* também foram dos genes não-*BRCA1/2* com mais variantes Pat./P.Pat., mas o *PALB2* não. Na verdade, no nosso trabalho, apenas 1 das 22 variantes Pat./P.Pat. detetadas ocorreu no *PALB2*. Além disso, no presente estudo, nenhuma variante Pat./P.Pat. foi observada no *RAD51D* ou no *BRIP1*, mas por outro lado, o *RAD51C* foi o primeiro gene não-*BRCA1/2* e o segundo gene no total com mais variantes Pat./P.Pat.. Nos 4 pacientes onde se detetaram as variantes Pat./P.Pat. neste gene, observou-se, relativamente à história pessoal de cancro, que 2 tinham cancro da mama, 1 tinha cancro da mama e do ovário e 1 tinha cancro do pâncreas. Quanto à história familiar de cancro, estava presente em 3 dos 4 pacientes, apenas 1 dos pacientes com diagnóstico de cancro da mama, não tinha história familiar de cancro. Já foi demonstrado que variantes germinativas Pat./P.Pat. no *RAD51C* conferem risco para cancro da mama (66, 68) e cancro do ovário (68, 69). Uma investigação, estimou um risco cumulativo, aos 80 anos, de 21% para cancro da mama e de 11% para cancro do ovário e observou que este risco pode ser ainda superior se existir história familiar de cancro, podendo chegar aos 46% para cancro da mama e 32% para cancro do ovário (68). Num dos pacientes, o que tinha diagnóstico de cancro do pâncreas e história familiar de cancro, foi identificada uma variante Pat./P.Pat. no *RAD51C*, nomeadamente a variante, c.404G>A (p.Cys135Tyr). Esta variante já foi observada anteriormente em famílias espanholas com cancro da mama e do ovário, é uma variante *missense*, que afeta o último nucleótido do exão 2 do *RAD51C*, uma alteração que se prevê que interfira com o *splincing* (75, 76). Tendo em conta que no presente trabalho, foi detetada num paciente com cancro do pâncreas, talvez também esteja associada a um risco aumentado de cancro do pâncreas. A verdade é que, outros estudos já detetaram variantes Pat./P.Pat. germinativas no *RAD51C* em pacientes com cancro do pâncreas (77-79), no entanto, parece não haver ainda evidências suficientes que comprovem uma associação entre as variantes germinativas Pat./P.Pat. no *RAD51C* e o aumento de risco para cancro do pâncreas. Talvez deva ser uma questão a ser mais explorada no futuro.

Relativamente às variantes Pat./P.Pat. no *CHEK2*, foram identificadas em 3 pacientes, sendo que 1 deles tinha também uma variante Pat./P.Pat. no *BRCA2*. Os 2 pacientes com variantes apenas no *CHEK2* tinham ambos diagnóstico de cancro da mama e história familiar de cancro. No presente estudo uma das variantes encontradas, a c.1427C>T (p.Thr476Met) é uma variante *missense* e a outra, a c.593-1G>T é uma variante intrónica, que afeta o local de *splicing*. Sabe-se que variantes germinativas Pat./P.Pat. no *CHEK2* estão associadas a um risco aumentado de cancro da mama (55, 62, 63) e que o risco é maior, quando existe história familiar de cancro (62, 63). Um estudo demonstrou que o risco ao longo da vida pode variar de 20% (nenhum familiar afetado) a 44% (familiar de primeiro e segundo grau afetados) (63). No entanto, algumas variantes Pat./P.Pat. *missense* no *CHEK2*, parecem não conferir risco, ou estar associadas a um risco mais atenuado de cancro da mama. Por exemplo, num estudo relativamente recente, as variantes Pat. *missense* p.Ile157Thr e p.Ser428Phe no *CHEK2*, demonstraram ter uma relevância clínica limitada para o risco de cancro da mama, apresentando *odds ratio* < 1,5 (55). Num outro estudo, ainda mais recente, verificou-se uma prevalência significativamente menor de cancro da mama em portadores destas duas variantes *missense* e da variante p.Thr476Met (detetada no nosso trabalho), comparativamente a portadores de outras variantes Pat./P.Pat. no *CHEK2* e além disso, apresentaram *odds ratio* < 1,4 comparativamente a participantes *wild-type*. Estas três variantes, demonstraram ter uma associação fraca com o cancro da mama e não se encontraram associadas a outros tipos de cancro (80).

Os 2 pacientes nos quais foram detetadas as variantes Pat./P.Pat. no *ATM*, tinham ambos diagnóstico de cancro da mama e 1 deles tinha história familiar de cancro. Sabe-se que variantes germinativas Pat./P.Pat. no *ATM* se encontram associadas a um risco aumentado de cancro da mama (56–58) e que o risco estimado ao longo da vida pode chegar aos 38% (57). Embora possa haver certas variantes no *ATM*, como a c.7271T>G, que conferem riscos superiores. Um estudo demonstrou que o risco cumulativo para esta variante, aos 70 anos, pode chegar a 69% (58).

O facto de haver certas variantes Pat./P.Pat. em determinados genes, como por exemplo no *CHEK2* e no *ATM*, como discutimos aqui, que conferem riscos, significativamente mais baixos ou muito superiores para desenvolvimento de cancro, comparativamente à maioria das variantes encontradas nestes genes, demonstra que é muito importante a gestão de risco individual do paciente, quando uma variante Pat./P.Pat. é detetada, de modo a que o risco de desenvolvimento de cancro não seja subestimado ou superestimado. Isto vai permitir que as medidas tomadas,

como por exemplo medidas profiláticas e de vigilância, sejam as mais adequadas, para o paciente e conseqüentemente, também para os familiares que possam ser portadores.

Embora o *RAD51C*, o *CHEK2* e o *ATM*, como já referido, tenham sido os genes não-*BRCA1/2* com mais variantes Pat./P.Pat., 1 variante Pat. também foi observada em cada um dos seguintes genes: *MSH2*, *MSH6*, *EPCAM* e *PALB2*. Ou seja, podemos dizer que cerca de 13,64% (3/22) das variantes Pat./P.Pat. detetadas no presente trabalho ocorreram em genes *mismatch repair/EPCAM*. A paciente com a variante no *MSH2*, era do sexo feminino, tinha cancro da mama, gástrico e colorretal e tinha história familiar de cancro da mama e colorretal. Ou seja, esta paciente parece incluir-se no contexto da síndrome de Lynch, uma vez que esta síndrome está associada a um risco aumentado de cancro colorretal e do estômago, entre outros (40) e cerca de 60-70% dos casos de síndrome de Lynch ocorrem devido a variantes germinativas Pat./P.Pat. no *MSH2* e *MLH1*(39). No que diz respeito ao cancro da mama, não há evidências suficientes que associem esta síndrome a um risco aumentado para este cancro, porém, a sua existência em casos de síndrome de Lynch, já foi reportada (40).

Por outro lado, as variantes Pat./P.Pat. detetadas no *MSH6* e no *EPCAM*, não parecem estar associadas à síndrome de Lynch, uma vez que tanto a paciente onde foi detetada a variante no *MSH6*, como a paciente da variante no *EPCAM*, tinham apenas diagnóstico de cancro da mama e não possuíam história familiar de cancro. Couch *et al.*, numa investigação caso-controlo, envolvendo 65057 casos de cancro da mama, observou uma associação significativa entre o risco de cancro da mama e variantes Pat./P.Pat. no *MSH6*, com *odds ratio* = 1,93 (81).

Num outro estudo prospetivo mais recente, com dados de 6350 portadores de variantes Pat./P.Pat. nos *mismatch repair*, Dominguez-Valentin *et al.*, demonstraram um risco cumulativo para cancro da mama feminino, aos 75 anos, devido a variantes germinativas Pat./P.Pat. no *MSH6*(n=841), de 13,7 %, observando-se apenas um subtil aumento de risco, comparativamente ao risco da população em geral, para o *MSH6* e também para todos os outros genes *mismatch repair* (41). Numa investigação mais pequena, realizada por Roberts *et al.*, envolvendo 140 mulheres portadoras de variantes Pat./P.Pat. no *MSH6*, observou-se uma associação entre estas variantes no *MSH6* e um risco aumentado de desenvolvimento de cancro da mama (SIR = 2,11), com um risco cumulativo, aos 60 anos, de 31,1% (82). No entanto, esta associação observada por Roberts *et al.*, foi alvo de descrença, devido a várias falhas na investigação efetuada (83). Houve ainda um estudo, que sugeriu que variantes germinativas Pat./P.Pat. no *MSH6* podem levar a uma pré-disposição para o cancro da mama triplo negativo (84).

Relativamente ao *EPCAM*, como já referido, apesar de não ser um gene *mismatch repair*, variantes Pat./P.Pat. neste gene, nomeadamente a deleção da sua extremidade 3', provocam o silenciamento epigenético do *MSH2* e por isso, são uma das causas apontadas de síndrome de Lynch (39). Neste sentido, o risco conferido por variantes Pat./P.Pat. no *EPCAM*, espera-se que seja semelhante ao risco conferido por variantes Pat./P.Pat. no *MSH2*. Num estudo, realizado em mulheres selecionadas de acordo com os critérios de inclusão para teste de síndrome de Lynch ou para teste de cancro da mama e ovário hereditário, verificou-se que nas portadoras de variantes Pat./P.Pat. no *MSH2/EPCAM*, os cancros mais comuns foram o colorretal e endometrial. O cancro da mama também foi observado nestas pacientes, mas foi menos frequente que na população feminina em geral (85). Como referido anteriormente, Dominguez-Valentin *et al.*, observaram que o risco cumulativo, para cancro da mama feminino, aos 75 anos, aumentava apenas sutilmente para portadoras de variantes Pat./P.Pat. em qualquer um dos 4 genes *mismatch repair*, incluindo o *MSH2*, em comparação com o risco da população em geral (41). Por outro lado, num estudo envolvendo 325 famílias com síndrome de Lynch, observou-se uma diferença significativa na distribuição das variantes Pat./P.Pat. entre pacientes com síndrome de Lynch e cancro da mama e pacientes com síndrome de Lynch mas sem cancro da mama, havendo uma predominância de variantes *MSH2* nos pacientes com síndrome de Lynch e cancro da mama. Além disso, observou-se um SIR = 3,11 para cancro da mama em mulheres portadoras de variantes Pat./P.Pat. no *MSH2* e um risco cumulativo ao longo da vida de 22% (86). Sendo assim, a realidade é que, atualmente, parecem não existir evidências consistentes para uma associação entre variantes Pat./P.Pat. no *MSH6* e no *MSH2/EPCAM* e um risco aumentado de cancro da mama. Ainda assim, não podemos esquecer, que há riscos associados a variantes germinativas Pat./P.Pat. no *MSH6* e *MSH2* para outros tipos de cancro, pois na verdade, um risco cumulativo para desenvolvimento de cancro, devido a estas variantes, aos 75 anos, para mulheres e homens, foi estimado em 61,8% e 41,7% respetivamente para o *MSH6* e 84,3% e 75,2% respetivamente para o *MSH2* (41), por isso, deve haver uma gestão clínica destas 2 pacientes e familiares, baseado nas evidências consistentes de risco existentes associadas a estas variantes Pat./P.Pat. detetadas tanto no *MSH6*, como no *EPCAM*.

Ainda assim, apesar de não existirem evidências consistentes de uma associação entre variantes germinativas Pat./P.Pat. nos *mismatch repair/EPCAM* e um risco aumentado para cancro da mama, é de notar, que no presente trabalho, 14,29% (3/21) dos pacientes onde se detetaram variantes Pat./P.Pat., tinham variantes nos genes *mismatch repair/EPCAM* e em todos eles foi

diagnosticado cancro da mama, sendo que 2 deles, tinham apenas diagnóstico de cancro da mama e não apresentavam história familiar de cancro.

A variante Pat./P.Pat. detetada no *PALB2* foi encontrada numa paciente do sexo feminino, com diagnóstico de cancro da mama e história familiar de cancro, incluindo cancro do pâncreas. Neste sentido, foi demonstrado por Yang *et al.*, que variantes germinativas Pat./P.Pat. no *PALB2*, aumentam significativamente o risco de cancro da mama feminino e de cancro do pâncreas, com riscos cumulativos, aos 80 anos, de 53% e 2-3% respetivamente. Além disso, na presença de história familiar de cancro, o risco cumulativo para cancro da mama feminino, aos 80 anos, pode chegar a 76% (67).

Relativamente aos genes *BRCA1/2*, observou-se, curiosamente, que no *BRCA1*, apenas 1 variante Pat./P.Pat. foi detetada, numa paciente do sexo feminino, com cancro da mama e sem história familiar de cancro. A presença de uma variante Pat./P.Pat. no *BRCA1*, confere um risco cumulativo de cancro da mama aos 80 anos de 72% e de cancro da mama contralateral, 20 anos após o primeiro diagnóstico de cancro da mama, de 40% (23). Se por um lado, o *BRCA1*, apresentou apenas 1 variante Pat./P.Pat., em contrapartida, o *BRCA2* foi o gene com mais variantes Pat./P.Pat., perfazendo 8 no total. Uma das 8 variantes encontradas no *BRCA2*, foi a variante c.156\_157insAlu. Como referido anteriormente, esta variante é considerada uma variante fundadora portuguesa, encontrada em famílias portuguesas com síndrome hereditária de cancro da mama e ovário (22). É uma variante Pat., na qual ocorre inserção de um elemento Alu no exão 3 do *BRCA2*, que resulta numa deleção in-frame deste exão do mRNA do *BRCA2* (87). No presente trabalho, esta variante foi detetada num paciente do sexo masculino, com cancro da próstata e história familiar de cancro da mama, o que se insere no contexto desta síndrome hereditária, caracterizada por um risco aumentado de desenvolvimento de cancro da mama e ovário, mas também de outros cancros, como próstata e pâncreas e cuja principal causa são variantes Pat./P.Pat. nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (20). Já foi demonstrado que variantes germinativas Pat./P.Pat. no *BRCA2* podem estar associadas a riscos cumulativos, para cancro da próstata (26), aos 85 anos, de 60% e para cancro da mama feminino (23) e também masculino (25), aos 80 anos, de 69% e 8,3% respetivamente. Além disso, mulheres, portadoras destas variantes, têm também um risco cumulativo de 26% para desenvolvimento de cancro da mama contralateral, 20 após o primeiro diagnóstico de cancro da mama (23). Relativamente aos 7 restantes pacientes com variantes Pat./P.Pat. no *BRCA2*, eram todos do sexo feminino, 4 tinham diagnóstico de cancro da mama, mas não apresentavam história familiar de cancro e 2 tinham

diagnóstico de cancro da mama e história familiar de cancro (incluindo cancro da próstata). Por fim, o último paciente, tinha cancro do pâncreas e história familiar de cancro da mama e além de 1 variante Pat./P.Pat. no *BRCA2*, apresentava também 1 variante no *CHEK2*. Variantes Pat./P.Pat. no *BRCA2* também conferem risco de cancro do pâncreas, nomeadamente, um risco vitalício estimado de 3-5% (27). Além disso como já referido, variantes Pat./P.Pat. no *BRCA2* (23) conferem um risco aumentado para cancro da mama, assim como algumas variantes no *CHEK2* (55, 62, 63).

Curiosamente, no presente estudo, observou-se que 3 das 8 variantes Pat./P.Pat. observadas no *BRCA2*, ou seja, 37,5%, estavam acompanhadas por variantes noutros genes do painel utilizado, nomeadamente, como já referido, por 1 variante P.Pat. no *CHEK2* e por 2 VUS, uma no *ATM* e outra no *MLH1*. Isto parece sugerir que quando existem variantes Pat./P.Pat. no *BRCA2*, há também uma grande probabilidade de existirem variantes noutros genes do painel utilizado. Além disso, nos pacientes em que se observaram 2 VUS, em 2 genes diferentes do painel, foi no *BRCA2* que se observaram mais variantes acompanhadas por variantes noutros genes, nomeadamente no *CHEK2*, *ATM*, *PALB2* ou *RAD51C*. Com exceção do *MLH1* que faz parte da *mismatch repair*, todos os outros genes estão envolvidos na HRR, sendo que o *ATM* e o *CHEK2* foram aqueles em que mais variantes foram observadas, juntamente com variantes no *BRCA2*. A presença de variantes noutros genes da via HRR, juntamente com variantes Pat./P.Pat. no *BRCA2*, também foram observadas por Tung *et al.*, que verificaram que 3 (1%) dos pacientes com variantes Pat./P.Pat., apresentavam uma variante Pat. no *BRCA2* e noutro gene, nomeadamente no *ATM*, *CHEK2*, ou *NBN* (88).

No presente estudo, observou-se também, curiosamente, uma elevada percentagem de homens com variantes germinativas Pat./P.Pat., nomeadamente de 28,6% (2/7), enquanto apenas 6,4% (19/299) das mulheres eram portadoras destas variantes. Outra curiosidade, é que no que diz respeito às VUS, não se observou o mesmo, ou seja, apenas 14,3% (1/7) dos homens apresentaram VUS, comparativamente a 22,7% (68/299) das mulheres. Tung *et al.*, num estudo que envolveu homens e mulheres diagnosticados com cancro da mama, submetidos a teste de painel multigénico com 25 genes (nos quais estavam incluídos todos os genes do nosso painel), verificaram que 31,8% dos homens apresentavam variantes germinativas Pat./P.Pat. (88), uma percentagem semelhante à observada por nós no presente trabalho. E além disso, constataram que a frequência de variantes germinativas Pat./P.Pat. nos homens, era significativamente superior à observada nas mulheres (13,3%) (88). Adam *et al.*, também observaram que entre

pacientes selecionados para teste de painel multigénico de síndrome de Lynch, as variantes Pat./P.Pat. foram mais frequentes nos homens (40,7%) em comparação com as mulheres (17,5%) (71). Sendo assim, os homens parecem ter grande probabilidade de apresentar variantes Pat./P.Pat. germinativas, quando selecionados, quer para painéis multigénicos associados a cancro hereditário da mama e ovário (cerca de 30% dos homens), quer para painéis multigénicos apenas de síndrome de Lynch (cerca de 40% dos homens) e além disso, em qualquer um dos casos, a percentagem de variantes germinativas Pat./P.Pat. parece ser muito superior à observada para as mulheres. Estas descobertas, realçam a importância de incluir e testar os homens por teste de painel multigénico, sempre que haja suspeita pessoal e/ou familiar de cancro hereditário, devido à grande probabilidade de possuírem variantes germinativas Pat./P.Pat. de pré-disposição para cancro.

Outra observação efetuada no presente trabalho, foi que a maioria dos pacientes com variantes Pat./P.Pat., nomeadamente 57,1% (12/21), tinham história familiar de cancro. Curiosamente, o mesmo foi observado também para os pacientes em que se detetaram VUS, pois 50,7% (35/69) tinham história familiar de cancro. Sendo assim, a história familiar de cancro, parece ser um critério muito importante, a ter em conta, na seleção de um paciente para teste de painel multigénico, já que a probabilidade de um indivíduo com história familiar de cancro ser portador de uma variante Pat./P.Pat. parece ser maior. Além disso, não podemos esquecer que ter história familiar de cancro da mama, parece conferir um risco ainda maior para portadores de variantes Pat./P.Pat. em determinados genes, incluindo no *RAD51C* e *RAD51D* (68), *CHEK2* (62, 63), *PALB2* (67), *BRCA1* e *BRCA2* (23). Sendo assim, usar a história familiar de cancro, como um dos critérios para seleção de um paciente para teste genético, parece fundamental, pois além de haver uma maior probabilidade do paciente ser portador de uma variante Pat./P.Pat., há também um maior risco associado para desenvolvimento de cancro quando uma variante Pat./P.Pat. é detetada em determinados genes.

Se por um lado, 14,29% (3/21) dos pacientes onde se detetaram variantes Pat./P.Pat., tinham variantes nos genes *mismatch repair/EPCAM*, os restantes, ou seja, 85,71% (18/21), tinham variantes Pat./P.Pat. nos genes da via HRR. Como referido anteriormente, já existem terapias disponíveis para tratamento do cancro da mama, ovário, próstata e pâncreas, associados a variantes Pat./P.Pat. nos genes *BRCA1/2*, nomeadamente, os inibidores da PARP (72). Quer isto dizer, que 42,86% (9/21) dos pacientes com variantes Pat./P.Pat. do presente trabalho, poderão vir a beneficiar da terapia direcionada com estes inibidores, já que possuem variantes Pat./P.Pat.

nos genes *BRCA1/2*. Isto é algo bastante positivo pois cerca de 43% dos portadores de variantes Pat./P.Pat., terão uma opção de tratamento direcionada, disponível. No entanto, essa opção não está disponível para os restantes 42,86% (9/21) com variantes Pat./P.Pat. em genes não-*BRCA1/2*, da via HRR. Sendo assim, e tendo em conta a elevada percentagem de pacientes com variantes Pat./P.Pat. em genes da via HRR, é essencial desenvolver novas terapias, ou explorar terapias existentes, de modo a que estas visem não apenas o tratamento de cancros associados a estes 2 genes, mas a todos os outros genes desta via que se encontram associados ao cancro hereditário, principalmente o *CHEK2*, *ATM* e *RAD51C*, que juntamente com o *PALB2*, parecem ser os genes não-*BRCA1/2* com mais variantes Pat./P.Pat..

#### 4.2. Variantes Patogénicas/Provavelmente Patogénicas detetadas em genes fora do painel

Além das variantes Pat./P.Pat. encontradas nos 18 genes do painel utilizado, detetaram-se mais 2 variantes Pat. em genes fora do painel, 1 no gene *BAP1* e 1 no gene *NTHL1*. A variante no *NTHL1* foi encontrada em homozigotia.

O gene *BAP1*, é um supressor tumoral, que codifica uma enzima desubiquitinante, que desempenha várias funções reguladoras, nomeadamente ao nível da HRR (onde parece coordenar o *BRCA1*, *BRAD1* e *RAD51*), modulação da cromatina, controlo do ciclo celular, morte celular programada, entre outras. Variantes germinativas neste gene, herdadas de forma autossómica dominante, causam a síndrome de predisposição tumoral *BAP1*, associada a um elevado risco de cancro, já que se espera que 85% dos casos diagnosticados desenvolvam pelo menos 1 cancro aos 50 anos (89). A maioria das variantes encontradas em famílias *BAP1*, são variantes truncantes (90). No presente trabalho, a variante detetada no *BAP1*, a c.1203T>G (p.Tyr401Ter), é uma variante *nonsense*, que resulta num codão *stop* prematuro no exão 12 deste gene e foi detetada numa paciente do sexo feminino, com diagnóstico de cancro da mama e com história familiar de cancro. Em linha com este achado encontrado no nosso estudo, foi reportado recentemente por Baltnik *et la.*, o caso de uma mulher com síndrome de predisposição tumoral *BAP1*, que tinha cancro da mama metastático, no qual se observou, por imunohistoquímica, ausência de expressão da proteína *BAP1*. Esta paciente era portadora da variante germinativa c.898\_899delAG (p.Arg300Glyfs\*6) no *BAP1*, uma variante classificada como P.Pat., e o seu tumor apresentava também uma variante somática no *BAP1*(91). Embora o cancro da mama, seja relativamente frequentemente na síndrome de predisposição tumoral *BAP1* (90), uma associação definitiva entre esta síndrome e cancro da mama ainda não foi estabelecida. Blatnik

*et al.* reforçaram, e nós concordamos, que é importante desenvolver mais investigações que permitam determinar o risco de cancro da mama associado a esta síndrome hereditária, para uma melhor gestão dos pacientes (91).

Relativamente ao *NTHL1*, este é também um gene supressor tumoral, que codifica uma DNA glicosilase, envolvida na via de reparação do DNA por excisão de bases. A função das glicosilases é detetar e remover bases danificadas do DNA. O alvo da *NTHL1* são as pirimidinas oxidadas. Variantes germinativas Pat. bialélicas neste gene, herdadas de forma autossómica recessiva, originam a síndrome tumoral *NTHL1*. Esta síndrome induz um risco aumentado de polipose colorretal, cancro colorretal e cancro da mama e parece encontrar-se associada a outros cancros adicionais, como cancro endometrial (92). No presente estudo, foi encontrada a variante Pat. *nonsense* c.268C>T (p.Gln90Ter) no *NTHL1*, em homozigotia, numa paciente do sexo feminino diagnosticada com cancro da mama, endométrio e cólon e por isso, esta paciente parece enquadrar-se no contexto desta síndrome. Num estudo envolvendo 29 portadores de variantes bialélicas Pat. no *NTHL1*, de 17 famílias, observou-se uma alta incidência de cancro da mama entre as mulheres portadoras, já que 60% desenvolveram este tipo de cancro (9/15 mulheres). Observaram-se também lesões pré-malignas endometriais em 5/15 mulheres e que a maioria dos indivíduos (59%) desenvolveram  $\geq 1$  cancros colorretais. Vários outros tipos de cancro foram detetados e o risco cumulativo, para desenvolvimento de cancro extracolónico, aos 60 anos, foi estimado em 35–78%. A maioria das famílias envolvidas neste estudo apresentavam também a variante Pat. c.268C>T em homozigotia no *NTHL1* (93). Numa revisão sistemática de 2022, incluindo 47 pacientes portadores de variantes Pat. bialélicas no *NTHL1*, de 32 famílias, o genótipo e o fenótipo associado à síndrome tumoral *NTHL1* foram investigados. Observou-se que, dos 47 pacientes, 35 eram homozigóticos e que destes 35 pacientes, 83% eram homozigóticos para a variante c.268C>T. Além disso, observaram que, o cancro colorretal estava presente em 23 dos 47 pacientes (49%), e que entre as 22 pacientes do sexo feminino incluídas no estudo, o cancro da mama foi observado em 12 (55%) e o cancro endometrial em 4 (94). Tendo em conta a alta incidência de cancro da mama, observada em mulheres portadoras de variantes bialélicas no *NTHL1*, talvez este gene deva ser considerado para inclusão em painéis multigénicos para teste de cancro da mama hereditário, no entanto, mais estudos e evidências parecem ser necessários para determinar o risco de cancro da mama associado e validar a possível inclusão do *NTHL1* nos painéis. Estes estudos e evidências adicionais também irão permitir uma melhor gestão de risco nas pacientes.

### 4.3. Variantes de Significado Clínico Incerto detetadas nos 18 genes do painel

No que diz respeito às VUS, Adam *et al.* observaram uma prevalência de 31,8% no painel > 10 genes (71). A prevalência observada no presente estudo foi inferior, nomeadamente de 26,14%. Já Kapoor *et al.*, observaram que 16,9% dos pacientes eram portadores de VUS, sendo que 13,6% tinham VUS em genes não-*BRCA1/2* e 3,3% nos genes *BRCA1/2*. (74). No presente trabalho, verificámos que 22,55% (69/306) dos pacientes eram portadores de VUS, e que destes, 16,67% (51/306) tinham variantes em genes não-*BRCA1/2*, 4,58% (14/306) nos genes *BRCA1/2*, e ainda que 1,31% (4/306) tinham variantes em genes não-*BRCA1/2* e *BRCA1/2*. Sendo assim, obtivemos um valor superior de pacientes portadores de VUS, mas tal como Kapoor *et al.*, observamos que a percentagem de pacientes com VUS em genes não-*BRCA1/2* era muito superior à percentagem de pacientes com VUS *BRCA1/2*. No presente trabalho, observamos ainda que das 80 VUS detetadas, 77,5% ocorreram em genes não-*BRCA1/2* e apenas 22,5% nos genes *BRCA1/2*.

Adam *et al.*, investigaram a prevalência de VUS em pacientes com suspeita de síndrome hereditária de cancro da mama e ovário e observaram que esta aumentava com o aumento dos genes incluídos no painel multigénico, sendo de 6% para o teste *BRCA1/2* apenas, 13,8% para um painel <10 genes incluindo *BRCA1/2* e 31,8% para um painel >10 genes incluindo *BRCA1/2*. Concluíram que havia uma associação significativa entre a prevalência de VUS e o número crescente de genes testados e que isso era devido à ocorrência de variantes em genes não-*BRCA1/2* (71). Kapoor *et al.* ao comparar o teste de painel multigénico (incluindo também o *BRCA1/2*) com o teste *BRCA1/2* apenas, chegaram à mesma conclusão (74). Estas observações têm lógica porque se mais genes estão a ser analisados, além do *BRCA1/2*, maior será a probabilidade de encontrar VUS e tem lógica também que o aumento seja devido aos novos genes incluídos no painel.

No presente estudo, o *BRCA2* foi o gene com maior percentagem de VUS, nomeadamente 21,25% (17), seguido do *ATM* com 13,75% (11) e depois pelo *CHEK2* com 11,25% (9). Na verdade, VUS foram observadas em quase todos os genes do painel, exceto no *EPCAM* e *TP53*. Entre os genes com mais VUS, para o painel >10 genes, Adam *et al.* observaram que o *ATM* foi o gene onde mais variantes foram detetadas, seguido do *CHEK2* e *BRCA1* (71). Kapoor *et al.*, também verificaram que o *ATM* foi o gene com mais VUS, seguido do *BRCA2*. Entre os genes do nosso painel, o terceiro com mais variantes no estudo de Kapoor *et al.* foi o *STK11* (74). Sendo assim, parece consistente concluir que o *ATM* é um gene onde há grande probabilidade de serem detetadas VUS, já que no

nosso estudo e nos outros dois aqui discutidos (71, 74), foi dos genes que apresentou mais VUS. O *CHEK2* foi também dos que apresentou mais VUS no nosso estudo e no estudo realizado por Adam *et al.* (71). Ou seja, estes 2 genes, o *ATM* e o *CHEK2*, parecem ser dos genes não-*BRCA1/2*, onde mais variantes Pat./P.Pat. são detetadas e além disso, parecem ser dos genes onde há maior probabilidade de VUS também serem encontradas. Outra observação importante é que pelo menos um dos genes *BRCA1/2* também foi encontrado entre os genes com mais VUS nos três estudos, no nosso e no de Kapoor *et al.* (74) foi o *BRCA2* e no de Adam *et al.* o *BRCA1* (71). Chern, *et al.*, num estudo que teve como objetivo comparar a gestão de risco ginecológico entre mulheres com VUS nos genes *BRCA1/2* e mulheres com resultado *BRCA1/2* negativo, concluíram não haver diferenças na taxa de cirúrgicas de redução de risco (nomeadamente salpingo-ooforectomia bilateral), nem nas recomendações de rastreio (95). Culver *et al.*, noutro estudo onde todas as pacientes foram submetidas a aconselhamento genético, verificaram que as taxas de mastectomia e ooforectomia profiláticas foram semelhantes entre mulheres detetadas com VUS nos genes *BRCA1/2* e mulheres com resultado *BRCA1/2* negativo, embora se tenha verificado menor redução do sofrimento nas mulheres com VUS, comparativamente às mulheres com resultado negativo. Este estudo acabou por concluir que, com o devido aconselhamento genético, as VUS, não resultam em cirurgias profiláticas e/ou sofrimento excessivo, apesar de serem menos tranquilizadoras (96). Embora a sua relevância clínica seja incerta, o que causa ansiedade nos pacientes e alguma confusão nos médicos, com o devido aconselhamento genético, estas dificuldades parecem ser contornadas (71), mesmo quando as variantes estão presentes em genes de elevado risco, como o *BRCA1* e *BRCA2*. Sempre que uma VUS é reclassificada, os portadores podem ser informados e se detetadas em famílias com uma extensa história de cancro, podem permitir um maior acompanhamento dessas famílias (71) e podem ser incluídas em análises de segregação.

#### **4.4. Comparação dos 3 grupos**

A história familiar de cancro é um fator de risco para desenvolvimento de cancro da mama (12, 97, 98) e cancro do ovário (17). E além disso, como já referido, pode aumentar o risco conferido por variantes Pat./P.Pat. em determinados genes, como no *RAD51C* e *RAD51D* (68), *CHEK2* (62, 63), *PALB2* (67), *BRCA1* e *BRCA2* (23). Tendo em conta a sua importância, o seu impacto foi estudado no presente trabalho, através da divisão dos 306 pacientes em 3 grupos diferentes.

Relativamente às variantes Pat./P.Pat., nenhuma foi detetada no grupo (ii), constituído por pacientes saudáveis, com história familiar de cancro, possivelmente devido ao número reduzido de pacientes (n=4). Ainda assim, foram encontradas 2 VUS neste grupo, 1 no *BRCA2* e outra no *MSH6*. Tendo em conta o contexto familiar dos 2 pacientes, como referido anteriormente, se existir, por exemplo, uma extensa história familiar de cancro, a deteção destas variantes, pode levar a um maior acompanhamento (71) e/ou ser incluídas em análises de segregação.

Devido ao número reduzido de pacientes e a ausência de variantes Pat./P.Pat. no grupo (ii), as conclusões foram retiradas principalmente da comparação entre o grupo (i) constituído por pacientes com diagnóstico de cancro, mas sem história familiar de cancro e o grupo (iii) constituído por pacientes com diagnóstico de cancro e com história familiar de cancro.

No grupo (iii), variantes Pat./P.Pat. foram observadas em cerca de 8,3% (12/145) dos pacientes, enquanto no grupo (i), foram detetadas em cerca de 5,7% (9/157). Relativamente às VUS, no grupo (iii), observou-se que estavam presentes em cerca de 22,8% (33/145) dos pacientes e no grupo (i) em cerca de 21,7% (34/157). Isto vai de encontro ao observado para a amostra total de pacientes, sugerindo que há maior probabilidade de um indivíduo com história familiar de cancro ser portador de uma variante Pat./P.Pat..

Curiosamente, observou-se que no grupo (iii), a maioria das variantes Pat./P.Pat. ocorreu em genes não-*BRCA1/2* (69,2%), enquanto no grupo (i) a maioria ocorreu nos genes *BRCA1/2* (55,6%). Por outro lado, a maioria das VUS, ocorreu em genes não-*BRCA1/2* tanto no grupo (iii) (75,6%), como no grupo (i) (81,1%). Ou seja, parece que a história familiar de cancro está mais associada a variantes Pat./P.Pat. em genes não-*BRCA1/2* do que nos genes *BRCA1/2*, já que uma maior percentagem de variantes em genes não-*BRCA1/2* foi encontrada quando a história familiar de cancro estava presente e pelo contrário, quando esta estava ausente, a percentagem foi maior nos genes *BRCA1/2*. Esta observação realça a importância da utilização de painéis multigénicos e não apenas do teste *BRCA1/2*, uma vez que estes pacientes, que têm história familiar e que por isso, podem ter associados um maior risco de cancro, assim como os familiares portadores, têm maioritariamente variantes Pat./P.Pat. em genes não-*BRCA1/2*. Quanto às VUS, estas parecem estar mesmo mais associadas aos genes não-*BRCA1/2*, independentemente da história familiar de cancro. O que está de acordo com as observações de que, nos painéis multigénicos, as VUS aumentam, principalmente devido à ocorrência de variantes em genes não-*BRCA1/2* (71, 74).

Analisando os genes que apresentaram mais variantes Pat./P.Pat., na amostra total, observámos que o *BRCA2*, foi o gene com maior percentagem de variantes Pat./P.Pat., tanto no grupo (i) (44,44% (4/9)), como no grupo (iii) (30,77% (4/13)). Relativamente às VUS, o mesmo foi observado, o *BRCA2* foi o gene com maior percentagem no grupo (i) (juntamente com o *ATM*) e no grupo (iii). Se analisarmos a prevalência de variantes Pat./P.Pat., verificamos que é semelhante nos dois grupos, grupo (i) 2,5% (4/157) e grupo (iii) 2,8% (4/145). Por isso, independentemente da história familiar de cancro, o *BRCA2* parece ser um dos genes onde ocorrem mais variantes Pat./P.Pat..

Relativamente ao *RAD51C* e ao *ATM*, variantes Pat./P.Pat. foram encontradas tanto no grupo (i), como no grupo (iii) no entanto, verificou-se que o *RAD51C* apresentou uma maior percentagem de variantes Pat./P.Pat. no grupo (iii) (23,08% - (3/13)) em relação ao grupo (i) (11,11% (1/9)), enquanto o *ATM* apresentou maior percentagem no grupo (i) (11,11% (1/9)) do que no grupo (iii) (7,69% (1/13)). O mesmo foi observado para as VUS. Mas se analisarmos a prevalência de variantes Pat./P.Pat., verificamos, que para o *RAD51C* é de 0,6% (1/157) no grupo (i) e de 2,1% (3/145) no grupo (iii), enquanto para o *ATM* é semelhante nos dois grupos, sendo de 0,6% (1/157) no grupo (i) e de 0,7% (1/145) no grupo (iii). Ou seja, isto parece querer dizer que há maior probabilidade de se detetarem variantes Pat./P.Pat. no *RAD51C* na presença de história familiar de cancro, enquanto para o *ATM*, a probabilidade parece ser semelhante, quer na presença ou ausência de história familiar de cancro.

Relativamente ao *CHEK2*, foi um dos genes com maior percentagem de variantes Pat./P.Pat. nos pacientes do grupo (iii), apresentando a mesma percentagem que o *RAD51C*, ou seja, 23,08% (3/13). Em contrapartida, não foi detetada nenhuma variante Pat./P.Pat. neste gene, nos pacientes do grupo (i). A prevalência de variantes Pat./P.Pat. foi de 2,1% (3/145) no grupo (iii) e de 0% no grupo (i). Relativamente às VUS, foi um dos genes com maior percentagem de variantes no grupo (iii) e apesar de apresentar variantes nos pacientes do grupo (i) (8,11% (3/37)), a percentagem foi menor que nos pacientes do grupo (iii) (14,63% (6/41)). Isto parece indicar que variantes Pat./P.Pat. no *CHEK2* estão mais associadas à presença de história familiar de cancro. Já foi demonstrado, que o risco de desenvolvimento de cancro da mama, aumenta para portadores de variantes Pat./P.Pat. no *RAD51C* (68) e no *CHEK2* (62, 63), na presença de história familiar de cancro e o mesmo acontece para o risco de desenvolvimento de cancro do ovário em portadoras de variantes Pat./P.Pat. no *RAD51C* (68).

Sendo assim, na presença de diagnóstico de cancro, a história familiar de cancro parece aumentar a probabilidade de variantes Pat./P.Pat. serem detetadas, principalmente em genes não-*BRCA1/2*, tais como o *RAD51C* e o *CHEK2*. Isto realça a importância do uso de painéis multigénicos, que analisem outros genes de suscetibilidade além do *BRCA1/2*. No entanto, devido ao reduzido número de variantes Pat./P.Pat. detetadas, é necessário ter cautela com as conclusões retiradas na comparação dos 3 grupos. Uma amostra maior seria necessária, para podermos retirar conclusões mais robustas e consistentes.

## 5. Conclusão

No presente estudo, observou-se que 6,86% dos pacientes eram portadores de variantes Pat./P.Pat. nos genes do painel multigénico utilizado, sendo que em 3,92% destes pacientes as variantes eram em genes não-*BRCA1/2*. A maioria das variantes Pat./P.Pat. detetadas ocorreu em genes não-*BRCA1/2* e os genes que apresentaram maior percentagem de variantes foram o *BRCA2*, *RAD51C*, *CHEK2* e *ATM*. VUS foram detetadas em 22,55% dos pacientes, a percentagem foi também maior em genes não-*BRCA1/2* e os genes com maior percentagem de variantes foram o *BRCA2*, *ATM* e *CHEK2*. Resumindo, estas descobertas realçam a importância do uso do teste de painel multigénico, em detrimento do teste apenas para *BRCA1/2*, pois embora se tenha verificado uma elevada percentagem de VUS no teste de painel multigénico, maioritariamente em genes não-*BRCA1/2*, variantes Pat./P.Pat. em genes de suscetibilidade para cancro da mama e/ou ovário hereditário não-*BRCA1/2*, seriam perdidas em cerca de 4% dos pacientes, que não seriam submetidos a qualquer gestão de risco. Além disso, no presente estudo também se observou que na presença de história familiar de cancro parece haver uma maior probabilidade de variantes Pat./P.Pat. serem detetadas e estas são maioritariamente em genes não-*BRCA1/2*, tais como o *RAD51C* e o *CHEK2*. Isto demonstra que é fundamental usar a história familiar de cancro, como um dos critérios para seleção de um paciente para teste genético, pois além de haver uma maior probabilidade do paciente ser portador de uma variante Pat./P.Pat., há também um maior risco de cancro associado à presença de história familiar para variantes Pat./P.Pat. em determinados genes, como por exemplo o *RAD51C* e o *CHEK2*. Isto também salienta a importância do uso de painéis multigénicos, que analisem outros genes de suscetibilidade além do *BRCA1/2*.

Verificou-se ainda que 85,71% dos pacientes com variantes Pat./P.Pat. tinham variantes em genes da via HRR e destes, 42,86%, tinham variantes nos genes *BRCA1/2*. Cancros associados a variantes Pat./P.Pat. nestes 2 genes podem beneficiar de terapia direcionada com inibidores da PARP. Ainda assim devido à elevada percentagem de pacientes com variantes Pat./P.Pat. em genes da via HRR, é essencial desenvolver novas terapias, ou explorar terapias existentes, para que estas tenham como alvo também outros genes da via.

## Referências Bibliográficas

1. Rieger PT. The biology of cancer genetics. *Semin Oncol Nurs*. 2004;20(3):145–54.
2. Lewandowska AM, Rudzki M, Rudzki S, Lewandowski T, Laskowska B. Environmental risk factors for cancer – review paper. *Ann Agric Environ Med*. 2019;26(1):1–7.
3. National Cancer Institute Dictionary of Cancer Terms [Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/variant>.]
4. Peters J, Loud J, Dimond E, Jenkins J. Cancer genetics fundamentals. *Cancer Nurs*. 2001;24(6):446–61; quiz 62.
5. Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*. 2004;23(38):6445–70.
6. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(4):820–3.
7. Imyanitov EN, Kuligina ES, Sokolenko AP, Suspitsin EN, Yanus GA, Iyevleva AG, et al. Hereditary cancer syndromes. *World J Clin Oncol*. 2023;14(2):40–68.
8. National Cancer Institute Dictionary of Cancer Terms [Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/hereditary-cancer-syndrome>.]
9. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49.
10. Global Cancer Observatory: Cancer today 2020 [Available from: <https://gco.iarc.fr/today>.]
11. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow 2020 [Available from: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>.]
12. Lukasiewicz S, Czezelewski M, Forma A, Baj J, Sitarz R, Stanislawek A. Breast Cancer–Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies–An Updated Review. *Cancers (Basel)*. 2021;13(17).
13. Zheng G, Leone JP. Male Breast Cancer: An Updated Review of Epidemiology, Clinicopathology, and Treatment. *J Oncol*. 2022;2022:1734049.
14. Benacka R, Szaboova D, Gulasova Z, Hertelyova Z, Radonak J. Classic and New Markers in Diagnostics and Classification of Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022;14(21).
15. Liberto JM, Chen SY, Shih IM, Wang TH, Wang TL, Pisanic TR, 2nd. Current and Emerging Methods for Ovarian Cancer Screening and Diagnostics: A Comprehensive Review. *Cancers (Basel)*. 2022;14(12).
16. Tanha K, Mottaghi A, Nojomi M, Moradi M, Rajabzadeh R, Lotfi S, et al. Investigation on factors associated with ovarian cancer: an umbrella review of systematic review and meta-analyses. *J Ovarian Res*. 2021;14(1):153.
17. Reid BM, Permut JB, Sellers TA. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol Med*. 2017;14(1):9–32.
18. De Leo A, Santini D, Ceccarelli C, Santandrea G, Palicelli A, Acquaviva G, et al. What Is New on Ovarian Carcinoma: Integrated Morphologic and Molecular Analysis Following the New 2020 World Health Organization Classification of Female Genital Tumors. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(4).
19. Nunes D, Ricardo S. Ovarian Cancer Ascites as a Liquid Tumor Microenvironment. In: Lele S, editor. *Ovarian Cancer*. Brisbane (AU)2022.
20. Yoshida R. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): review of its molecular characteristics, screening, treatment, and prognosis. *Breast Cancer*. 2021;28(6):1167–80.

21. Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-Associated Hereditary Breast and Ovarian Cancer. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, et al, editors. GeneReviews((R)). Seattle (WA) 1998 [Updated 2022 May 26].
22. Vicente R, Alpuim Costa D, Vitorino M, Mendes AD, Santos C, Fontes-Sousa M. Mutation Patterns in Portuguese Families with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. *Cancers (Basel)*. 2022;14(19).
23. Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips KA, Mooij TM, Roos-Blom MJ, et al. Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers. *JAMA*. 2017;317(23):2402-16.
24. Chen J, Bae E, Zhang L, Hughes K, Parmigiani G, Braun D, et al. Penetrance of Breast and Ovarian Cancer in Women Who Carry a BRCA1/2 Mutation and Do Not Use Risk-Reducing Salpingo-Oophorectomy: An Updated Meta-Analysis. *JNCI Cancer Spectr*. 2020;4(4):pkaa029.
25. Tai YC, Domchek S, Parmigiani G, Chen S. Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(23):1811-4.
26. Nyberg T, Frost D, Barrowdale D, Evans DG, Bancroft E, Adlard J, et al. Prostate Cancer Risks for Male BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: A Prospective Cohort Study. *Eur Urol*. 2020;77(1):24-35.
27. Li S, Silvestri V, Leslie G, Rebbeck TR, Neuhausen SL, Hopper JL, et al. Cancer Risks Associated With BRCA1 and BRCA2 Pathogenic Variants. *J Clin Oncol*. 2022;40(14):1529-41.
28. Guha T, Malkin D. Inherited TP53 Mutations and the Li-Fraumeni Syndrome. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017;7(4).
29. Boutelle AM, Attardi LD. p53 and Tumor Suppression: It Takes a Network. *Trends Cell Biol*. 2021;31(4):298-310.
30. Dridi W, Krabchi K, Gadjji M, Lavoie J, Bronsard M, Fetni R, et al. [Dominant negative activity of mutated p53 proteins]. *Med Sci (Paris)*. 2006;22(3):301-7.
31. Schneider K, Zolley K, Nichols KE, Garber J. Li-Fraumeni Syndrome. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, et al, editors. GeneReviews((R)). Seattle (WA)1999 [Updated 2019 Nov 21].
32. Mai PL, Best AF, Peters JA, DeCastro RM, Khincha PP, Loud JT, et al. Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. *Cancer*. 2016;122(23):3673-81.
33. McCuaig JM, Armel SR, Novokmet A, Ginsburg OM, Demsky R, Narod SA, et al. Routine TP53 testing for breast cancer under age 30: ready for prime time? *Fam Cancer*. 2012;11(4):607-13.
34. Yehia L, Eng C. PTEN Hamartoma Tumor Syndrome. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, et al., editors. GeneReviews((R)). Seattle (WA)2001 [Updated 2021 Feb 11].
35. Dragoo DD, Taher A, Wong VK, Elsaiey A, Consul N, Mahmoud HS, et al. PTEN Hamartoma Tumor Syndrome/Cowden Syndrome: Genomics, Oncogenesis, and Imaging Review for Associated Lesions and Malignancy. *Cancers (Basel)*. 2021;13(13).
36. Bubien V, Bonnet F, Brouste V, Hoppe S, Barouk-Simonet E, David A, et al. High cumulative risks of cancer in patients with PTEN hamartoma tumour syndrome. *J Med Genet*. 2013;50(4):255-63.
37. Tan MH, Mester JL, Ngeow J, Rybicki LA, Orloff MS, Eng C. Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations. *Clin Cancer Res*. 2012;18(2):400-7.
38. Ngeow J, Stanuch K, Mester JL, Barnholtz-Sloan JS, Eng C. Second malignant neoplasms in patients with Cowden syndrome with underlying germline PTEN mutations. *J Clin Oncol*. 2014;32(17):1818-24.

39. Gambini D, Ferrero S, Kuhn E. Lynch Syndrome: From Carcinogenesis to Prevention Interventions. *Cancers (Basel)*. 2022;14(17).
40. Idos G, Valle L. Lynch Syndrome. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, et al., editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA)2004 [Updated 2021 Feb 4].
41. Dominguez-Valentin M, Sampson JR, Seppala TT, Ten Broeke SW, Plazzer JP, Nakken S, et al. Cancer risks by gene, age, and gender in 6350 carriers of pathogenic mismatch repair variants: findings from the Prospective Lynch Syndrome Database. *Genet Med*. 2020;22(1):15–25.
42. Ran X, Jing H, Li Z. The clinical features and management of Lynch syndrome-associated ovarian cancer. *J Obstet Gynaecol Res*. 2022;48(7):1538–45.
43. Klimkowski S, Ibrahim M, Ibarra Rovira JJ, Elshikh M, Javadi S, Klekers AR, et al. Peutz-Jeghers Syndrome and the Role of Imaging: Pathophysiology, Diagnosis, and Associated Cancers. *Cancers (Basel)*. 2021;13(20).
44. McGarrity TJ, Amos CI, Baker MJ. Peutz-Jeghers Syndrome. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, et al., editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA)2001 [Updated 2021 Sep 2].
45. Yamamoto H, Sakamoto H, Kumagai H, Abe T, Ishiguro S, Uchida K, et al. Clinical Guidelines for Diagnosis and Management of Peutz-Jeghers Syndrome in Children and Adults. *Digestion*. 2023:1-13.
46. Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJ, et al. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. *Clin Cancer Res*. 2006;12(10):3209–15.
47. Giardiello FM, Brensinger JD, Tersmette AC, Goodman SN, Petersen GM, Booker SV, et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome. *Gastroenterology*. 2000;119(6):1447–53.
48. Decourtye-Espiard L, Guilford P. Hereditary Diffuse Gastric Cancer. *Gastroenterology*. 2023;164(5):719–35.
49. Pharoah PD, Guilford P, Caldas C, International Gastric Cancer Linkage C. Incidence of gastric cancer and breast cancer in CDH1 (E-cadherin) mutation carriers from hereditary diffuse gastric cancer families. *Gastroenterology*. 2001;121(6):1348–53.
50. Hansford S, Kaurah P, Li-Chang H, Woo M, Senz J, Pinheiro H, et al. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. *JAMA Oncol*. 2015;1(1):23–32.
51. Roberts ME, Ranola JMO, Marshall ML, Susswein LR, Graceffo S, Bohnert K, et al. Comparison of CDH1 Penetrance Estimates in Clinically Ascertained Families vs Families Ascertained for Multiple Gastric Cancers. *JAMA Oncol*. 2019;5(9):1325–31.
52. Yamamoto H, Hirasawa A. Homologous Recombination Deficiencies and Hereditary Tumors. *Int J Mol Sci*. 2021;23(1).
53. Kurian AW, Hughes E, Handorf EA, Gutin A, Allen B, Hartman AR, et al. Breast and Ovarian Cancer Penetrance Estimates Derived From Germline Multiple-Gene Sequencing Results in Women. *JCO Precis Oncol*. 2017;1:1–12.
54. Suszynska M, Klonowska K, Jasinska AJ, Kozlowski P. Large-scale meta-analysis of mutations identified in panels of breast/ovarian cancer-related genes – Providing evidence of cancer predisposition genes. *Gynecol Oncol*. 2019;153(2):452–62.
55. Hu C, Hart SN, Gnanaolivu R, Huang H, Lee KY, Na J, et al. A Population-Based Study of Genes Previously Implicated in Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2021;384(5):440–51.
56. Marabelli M, Cheng SC, Parmigiani G. Penetrance of ATM Gene Mutations in Breast Cancer: A Meta-Analysis of Different Measures of Risk. *Genet Epidemiol*. 2016;40(5):425–31.

57. van Os NJ, Roeleveld N, Weemaes CM, Jongmans MC, Janssens GO, Taylor AM, et al. Health risks for ataxia-telangiectasia mutated heterozygotes: a systematic review, meta-analysis and evidence-based guideline. *Clin Genet.* 2016;90(2):105-17.
58. Bernstein JL, Teraoka S, Southey MC, Jenkins MA, Andrulis IL, Knight JA, et al. Population-based estimates of breast cancer risks associated with ATM gene variants c.7271T>G and c.1066-6T>G (IVS10-6T>G) from the Breast Cancer Family Registry. *Hum Mutat.* 2006;27(11):1122-8.
59. Lilyquist J, LaDuca H, Polley E, Davis BT, Shimelis H, Hu C, et al. Frequency of mutations in a large series of clinically ascertained ovarian cancer cases tested on multi-gene panels compared to reference controls. *Gynecol Oncol.* 2017;147(2):375-80.
60. Hsu FC, Roberts NJ, Childs E, Porter N, Rabe KG, Borgida A, et al. Risk of Pancreatic Cancer Among Individuals With Pathogenic Variants in the ATM Gene. *JAMA Oncol.* 2021;7(11):1664-8.
61. Karlsson Q, Brook MN, Dadaev T, Wakerell S, Saunders EJ, Muir K, et al. Rare Germline Variants in ATM Predispose to Prostate Cancer: A PRACTICAL Consortium Study. *Eur Urol Oncol.* 2021;4(4):570-9.
62. Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG. CHEK2\*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls. *J Clin Oncol.* 2008;26(4):542-8.
63. Cybulski C, Wokolorczyk D, Jakubowska A, Huzarski T, Byrski T, Gronwald J, et al. Risk of breast cancer in women with a CHEK2 mutation with and without a family history of breast cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(28):3747-52.
64. Ramus SJ, Song H, Dicks E, Tyrer JP, Rosenthal AN, Intermaggio MP, et al. Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107(11).
65. Domchek SM, Robson ME. Update on Genetic Testing in Gynecologic Cancer. *J Clin Oncol.* 2019;37(27):2501-9.
66. Hu C, Polley EC, Yadav S, Lilyquist J, Shimelis H, Na J, et al. The Contribution of Germline Predisposition Gene Mutations to Clinical Subtypes of Invasive Breast Cancer From a Clinical Genetic Testing Cohort. *J Natl Cancer Inst.* 2020;112(12):1231-41.
67. Yang X, Leslie G, Doroszuk A, Schneider S, Allen J, Decker B, et al. Cancer Risks Associated With Germline PALB2 Pathogenic Variants: An International Study of 524 Families. *J Clin Oncol.* 2020;38(7):674-85.
68. Yang X, Song H, Leslie G, Engel C, Hahnen E, Auber B, et al. Ovarian and Breast Cancer Risks Associated With Pathogenic Variants in RAD51C and RAD51D. *J Natl Cancer Inst.* 2020;112(12):1242-50.
69. Song H, Dicks E, Ramus SJ, Tyrer JP, Intermaggio MP, Hayward J, et al. Contribution of Germline Mutations in the RAD51B, RAD51C, and RAD51D Genes to Ovarian Cancer in the Population. *J Clin Oncol.* 2015;33(26):2901-7.
70. Mighton C, Lerner-Ellis JP. Principles of molecular testing for hereditary cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2022;61(6):356-81.
71. Adam F, Fluri M, Scherz A, Rabaglio M. Occurrence of variants of unknown clinical significance in genetic testing for hereditary breast and ovarian cancer syndrome and Lynch syndrome: a literature review and analytical observational retrospective cohort study. *BMC Med Genomics.* 2023;16(1):7.
72. Mastrodomenico L, Piombino C, Ricco B, Barbieri E, Venturelli M, Piacentini F, et al. Personalized Systemic Therapies in Hereditary Cancer Syndromes. *Genes (Basel).* 2023;14(3).
73. Chen A. PARP inhibitors: its role in treatment of cancer. *Chin J Cancer.* 2011;30(7):463-71.

74. Kapoor NS, Curcio LD, Blakemore CA, Bremner AK, McFarland RE, West JG, et al. Multigene Panel Testing Detects Equal Rates of Pathogenic BRCA1/2 Mutations and has a Higher Diagnostic Yield Compared to Limited BRCA1/2 Analysis Alone in Patients at Risk for Hereditary Breast Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(10):3282–8.
75. Osorio A, Endt D, Fernandez F, Eirich K, de la Hoya M, Schmutzler R, et al. Predominance of pathogenic missense variants in the RAD51C gene occurring in breast and ovarian cancer families. *Hum Mol Genet*. 2012;21(13):2889–98.
76. Sanchez-Bermudez AI, Sarabia-Meseguer MD, Garcia-Aliaga A, Marin-Vera M, Macias-Cerrolaza JA, Henarejos PS, et al. Mutational analysis of RAD51C and RAD51D genes in hereditary breast and ovarian cancer families from Murcia (southeastern Spain). *Eur J Med Genet*. 2018;61(6):355–61.
77. Palacio S, Pollack T, Silva-Smith R, Sussman DA, Hosein PJ. Exceptional response to FOLFIRINOX in a patient with pancreatic cancer and a germline RAD51C mutation. *J Gastrointest Oncol*. 2018;9(4):E19–E22.
78. Yurgelun MB, Chittenden AB, Morales-Oyarvide V, Rubinson DA, Dunne RF, Kozak MM, et al. Germline cancer susceptibility gene variants, somatic second hits, and survival outcomes in patients with resected pancreatic cancer. *Genet Med*. 2019;21(1):213–23.
79. Hu C, Hart SN, Polley EC, Gnanaolivu R, Shimelis H, Lee KY, et al. Association Between Inherited Germline Mutations in Cancer Predisposition Genes and Risk of Pancreatic Cancer. *JAMA*. 2018;319(23):2401–9.
80. Bychkovsky BL, Agaoglu NB, Horton C, Zhou J, Yussuf A, Hemyari P, et al. Differences in Cancer Phenotypes Among Frequent CHEK2 Variants and Implications for Clinical Care—Checking CHEK2. *JAMA Oncol*. 2022;8(11):1598–606.
81. Couch FJ, Shimelis H, Hu C, Hart SN, Polley EC, Na J, et al. Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer. *JAMA Oncol*. 2017;3(9):1190–6.
82. Roberts ME, Jackson SA, Susswein LR, Zeinomar N, Ma X, Marshall ML, et al. MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. *Genet Med*. 2018;20(10):1167–74.
83. Wang X, Brzosowicz JP, Park JY. Response to Roberts et al. 2018: cohort ascertainment and methods of analysis impact the association between cancer and genetic predisposition – the tale of breast cancer risk and Lynch syndrome genes MSH6/PMS2. *Genet Med*. 2019;21(9):2156–7.
84. Yi D, Xu L, Luo J, You X, Huang T, Zi Y, et al. Germline TP53 and MSH6 mutations implicated in sporadic triple-negative breast cancer (TNBC): a preliminary study. *Hum Genomics*. 2019;13(1):4.
85. Stoll J, Rosenthal E, Cummings S, Willmott J, Bernhisel R, Kupfer SS. No Evidence of Increased Risk of Breast Cancer in Women With Lynch Syndrome Identified by Multigene Panel Testing. *JCO Precis Oncol*. 2020;4:51–60.
86. Goldberg M, Bell K, Aronson M, Semotiuk K, Pond G, Gallinger S, et al. Association between the Lynch syndrome gene MSH2 and breast cancer susceptibility in a Canadian familial cancer registry. *J Med Genet*. 2017;54(11):742–6.
87. Peixoto A, Santos C, Rocha P, Pinheiro M, Principe S, Pereira D, et al. The c.156\_157insAlu BRCA2 rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious BRCA mutations in northern/central Portugal. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;114(1):31–8.
88. Tung N, Battelli C, Allen B, Kaldate R, Bhatnagar S, Bowles K, et al. Frequency of mutations in individuals with breast cancer referred for BRCA1 and BRCA2 testing using next-generation sequencing with a 25-gene panel. *Cancer*. 2015;121(1):25–33.

89. Louie BH, Kurzrock R. BAP1: Not just a BRCA1-associated protein. *Cancer Treat Rev.* 2020;90:102091.
90. Carbone M, Harbour JW, Brugarolas J, Bononi A, Pagano I, Dey A, et al. Biological Mechanisms and Clinical Significance of BAP1 Mutations in Human Cancer. *Cancer Discov.* 2020;10(8):1103–20.
91. Blatnik A, Ribnikar D, Setrajcic Dragos V, Novakovic S, Stegel V, Grcar Kuzmanov B, et al. BAP1-deficient breast cancer in a patient with BAP1 cancer syndrome. *Breast Cancer.* 2022;29(5):921–7.
92. Kuiper RP, Nielsen M, De Voer RM, Hoogerbrugge N. NTHL1 Tumor Syndrome. In: Adam MP, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Gripp KW, et al., editors. *GeneReviews*((R)). Seattle (WA)2020.
93. Grolleman JE, de Voer RM, Elsayed FA, Nielsen M, Weren RDA, Palles C, et al. Mutational Signature Analysis Reveals NTHL1 Deficiency to Cause a Multi-tumor Phenotype. *Cancer Cell.* 2019;35(2):256–66 e5.
94. Beck SH, Jelsig AM, Yassin HM, Lindberg LJ, Wadt KAW, Karstensen JG. Intestinal and extraintestinal neoplasms in patients with NTHL1 tumor syndrome: a systematic review. *Fam Cancer.* 2022;21(4):453–62.
95. Chern JY, Lee SS, Frey MK, Lee J, Blank SV. The influence of BRCA variants of unknown significance on cancer risk management decision-making. *J Gynecol Oncol.* 2019;30(4):e60.
96. Culver JO, Brinkerhoff CD, Clague J, Yang K, Singh KE, Sand SR, et al. Variants of uncertain significance in BRCA testing: evaluation of surgical decisions, risk perception, and cancer distress. *Clin Genet.* 2013;84(5):464–72.
97. Fakhri N, Chad MA, Lahkim M, Houari A, Dehbi H, Belmouden A, et al. Risk factors for breast cancer in women: an update review. *Med Oncol.* 2022;39(12):197.
98. Khan NAJ, Tirona M. An updated review of epidemiology, risk factors, and management of male breast cancer. *Med Oncol.* 2021;38(4):39.

## **Anexo 1. Extração automática de DNA com o Chemagic 360**

A extração com o Chemagic 360, realizou-se de acordo com o protocolo “chemagic DNA Blood 200 360 prefilling H96 VD150706”.

Selecionou-se, no aparelho, o número e posição na placa das amostras de sangue a extrair. De seguida, colocaram-se 200 µL de cada amostra no poço/posição correspondente. Depois, pipetaram-se 80 µL de tampão de eluição e 150 µL de esferas magnéticas (completamente ressuspendas) para as respetivas placas, de acordo com a posição das amostras de sangue. De seguida, colocou-se nas seguintes posições do aparelho:

- **Posição 1:** Suporte com pontas (colocadas de acordo com a posição das amostras);
- **Posição 2:** Placa com os 150 µL de esferas magnéticas;
- **Posição 3:** Placa com os 200 µL das amostras de sangue [ + tampão de lise 1 (adicionado automaticamente) + tampão de ligação 2 (adicionado automaticamente)];
- **Posição 4:** Placa vazia [tampão de lavagem 3 adicionado automaticamente];
- **Posição 5:** Placa vazia [tampão de lavagem 4 adicionado automaticamente];
- **Posição 6:** Placa vazia [tampão de lavagem 5 adicionado automaticamente];
- **Posição 7:** Placa vazia [tampão de lavagem 6 adicionado automaticamente];
- **Posição 8:** Placa com os 80 µL de tampão de eluição.

Iniciou-se a extração e no final, após o procedimento estar concluído, recolheu-se o DNA para tubos de 1,5 mL e determinou-se a concentração.

## Anexo 2. Extração automática de DNA com o Chemagic Prepito-D

A extração com o Chemagic Prepito-D efectuou-se utilizando o "Prepito DNA Blood250 Kit" ou o "Prepito DNA Blood600 kit".

O "Prepito DNA Blood250kit" para extração de 12 amostras:

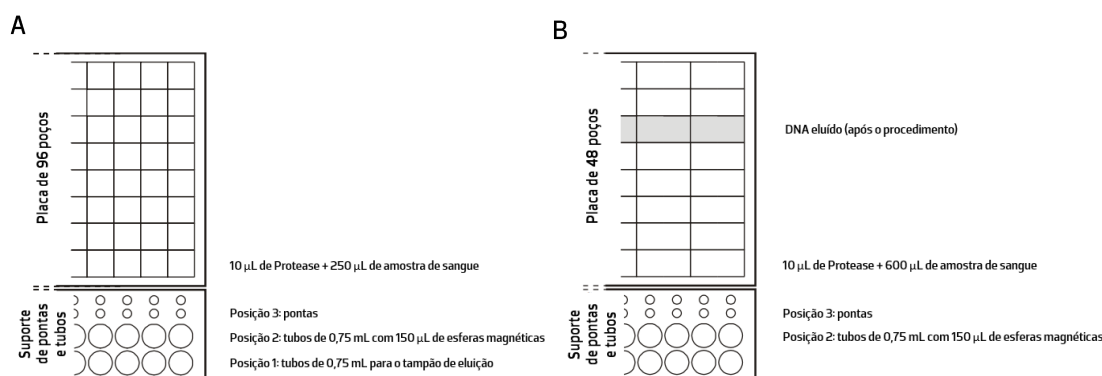
Adicionou-se, a cada poço da primeira fila da placa de 96 poços, 10  $\mu$ L de Protease + 250  $\mu$ L de amostra de sangue e preparou-se o suporte de pontas e tubos (como exemplificado fig. 1A):

- **Posição 1:** 12 tubos de 0,75 mL vazios para o tampão de eluição;
- **Posição 2:** 12 tubos de 0,75 mL no qual se adicionaram 150  $\mu$ L de esferas magnéticas (completamente ressuspensas);
- **Posição 3:** 12 pontas.

E o "Prepito DNA Blood600kit" para extração de 6 amostras:

Adicionou-se, a cada poço da primeira fila da placa de 48 poços, 10  $\mu$ L de Protease + 600  $\mu$ L de amostra de sangue e preparou-se o suporte de pontas e tubos (como exemplificado na fig. 1B):

- **Posição 2:** 12 tubos de 0,75 mL no qual se adicionaram 150  $\mu$ L de esferas magnéticas (completamente ressuspensas);
- **Posição 3:** 12 pontas.



**Figura 1.** Posicionamento das amostras de sangue, reagentes, tubos e pontas na placa e no suporte de pontas e tubos, para o "Prepito DNA Blood250kit" (A) e para o "Prepito DNA Blood600kit" (B). Imagens adaptadas dos protocolos "Prepito DNA Blood250kit" e "Prepito DNA Blood600kit".

Depois de preparados, a placa e o suporte, foram colocados no aparelho e iniciou-se a extração automática. No final recolheu-se o DNA para tubos de 1,5 mL e determinou-se a concentração.

### Anexo 3. Quantificação da concentração de DNA no fluorímetro

Em primeiro lugar prepararam-se:

- **Branco:** num tubo de PCR de 0,5 mL vazio, adicionaram-se 200  $\mu$ L de QuantiFluor® ONE dsDNA Dye;
- **Padrão de 400 ng:** num tubo de PCR de 0,5 mL vazio, adicionou-se 199  $\mu$ L de QuantiFluor® ONE dsDNA Dye + 1  $\mu$ L de QuantiFluor® ONE Lambda DNA standard (400  $\mu$ g/mL);
- **Amostras nas quais se pretende determinar a concentração de DNA:** num tubo de PCR de 0,5 mL vazio, adicionaram-se 199  $\mu$ L de QuantiFluor® ONE dsDNA Dye + 1  $\mu$ L de amostra.

Todos os tubos foram homogeneizados no vortex e depois sujeitos a uma centrifugação rápida e curta. Calibrou-se o aparelho com o branco e o padrão e depois quantificou-se a concentração de DNA nas amostras através da medição da fluorescência.

#### **Anexo 4. Diluição e desnaturação das bibliotecas genômicas para sequenciação no Illumina NextSeq 500 System**

Utilizando os valores obtidos para a concentração no fluorímetro ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) e o tamanho dos fragmentos no TapeStation (pb) determinou-se a concentração de cada biblioteca enriquecida em nM. De seguida, diluiu-se com água cada biblioteca enriquecida para uma concentração final de 4 nM, na placa de PCR de 96 poços com os 30  $\mu\text{L}$  de cada biblioteca. Depois, juntaram-se todas: pipetaram-se 1,42  $\mu\text{L}$  de cada biblioteca para um poço vazio da placa de PCR de 96 poços e fez-se uma nova diluição para uma concentração final de 1 nM (5  $\mu\text{L}$  das bibliotecas juntas a 4 nM + 15  $\mu\text{L}$  de água). Por fim, para sequenciação no Illumina NextSeq 500 System, as bibliotecas com concentração de 1 nM, foram desnaturadas e diluídas para uma concentração final de carregamento de 1,8 pM num volume de 1,3 mL, seguindo o protocolo A: "Standard Normalization Method" do "NextSeq 500 and 550 Sequencing Systems Denature and Dilute Libraries Guide". Sendo assim, em primeiro lugar preparou-se uma diluição de NaOH a 0,2 N (5  $\mu\text{L}$  de NaOH a 2 N + 45  $\mu\text{L}$  de água). Depois, desnaturaram-se as bibliotecas: num tubo de 1,5 mL, adicionaram-se 20  $\mu\text{L}$  das bibliotecas a 1 nM + 20  $\mu\text{L}$  do NaOH a 0,2 N e incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente. Adicionaram-se mais 20  $\mu\text{L}$  de água e de seguida, diluíram-se as bibliotecas desnaturadas para 20 pM por adição de 940  $\mu\text{L}$  de Prechilled HT1. Por fim, as bibliotecas foram diluídas para a concentração final de carregamento: num tubo de 1,5 mL, adicionaram-se 117  $\mu\text{L}$  da solução das bibliotecas desnaturadas a 20 pM + 1183  $\mu\text{L}$  de Prechilled HT1, perfazendo um volume final de carregamento de 1,3 mL a uma concentração de 1,8 pM.

Anexo 5. Variantes de Significado Clínico Incerto detetadas nos 18 genes do painel utilizado, nos 306 pacientes.

Nº atribuído ao paciente no estudo	Género	Idade	Informações clínicas		Gene	Variante	Grupo
			Diagnóstico	História familiar de cancro			
#3	Feminino	51	Cancro da mama	-	<i>RAD51D</i>	c.793G>A (p.Gly265Arg)	(i)
#10	Feminino	47	Cancro da mama	Cancro da mama, próstata e intestino	<i>BRCA2</i>	c.1012G>A (p.Ala338Thr)	(iii)
#23	Feminino	70	Cancro da mama	-	<i>RAD51D</i>	c.26G>C (p.Cys9Ser)	(i)
#26	Feminino	35	Cancro da mama	-	<i>RAD51C</i>	c.32A>G (p.Gln11Arg)	(i)
#27	Feminino	56	Cancro da mama	-	<i>PMS2</i>	c.11C>G (p.Ala4Gly)	(i)
#45	Feminino	55	Cancro da mama	Cancro da mama	<i>NBN</i>	c.628G>T (p.Val210Phe)	(iii)
#49	Feminino	63	Cancro da mama	Cancro da mama	<i>MLH1</i>	c.1154G>A (p.Arg385His)	(iii)
#51	Feminino	47	Cancro da mama	Cancro do ovário, linfoma de Hodgkin, pulmão e pele	<i>CDH1</i>	c.1793G>A (p.Arg598Gln)	(iii)
#53	Feminino	47	Cancro da mama	-	<i>NBN</i>	c.1591A>G (p.Ile531Val)	(i)
#56	Feminino	31	Cancro da mama	Não especificado o tipo de cancro	<i>BRCA2</i>	c.1096T>G (p.Leu366Val)	(iii)
#62	Feminino	50	-	Cancro da mama e próstata	<i>BRCA2</i>	c.565G>T (p.Asp189Tyr)	(ii)
#82	Feminino	70	Cancro da mama	-	<i>NBN</i>	c.671G>A (p.Gly224Glu)	(i)
#84	Feminino	40	Cancro da mama	-	<i>PALB2</i>	c.2897T>C (p.Ile966Thr)	(i)
#87	Feminino	52	Cancro da mama	Cancro da mama, pâncreas, gástrico e ependimoma	<i>ATM</i>	c.6493T>A (p.Ser2165Thr)	(iii)
					<i>STK11</i>	c.464+5G>A	
#88	Feminino	62	Cancro da mama	Cancro colorretal	<i>CHEK2</i>	c.320-5T>A	(iii)
#96	Feminino	43	Cancro da mama	Cancro da mama	<i>ATM</i>	c.5753G>C (p.Arg1918Thr)	(iii)
#103	Feminino	72	Cancro da mama	-	<i>BRCA2</i>	c.3245A>G (p.Lys1082Arg)	(i)
#111	Feminino	49	Cancro da mama	-	<i>PALB2</i>	c.480A>T (p.Arg160Ser)	(i)
#114	Feminino	39	Cancro da mama	-	<i>CHEK2</i>	c.246_260del (p.Asp82_Glu86del)	(i)
#117	Feminino	41	Cancro da mama	Cancro do Sistema Nervoso Central	<i>BRIP1</i>	c.550G>T (p.Asp184Tyr)	(iii)
					<i>NBN</i>	c.517A>G (p.Lys173Glu)	

Nº atribuído ao paciente no estudo	Género	Idade	Informações clínicas		Gene	Variante	Grupo
			Diagnóstico	História familiar de cancro			
#123	Feminino	38	Cancro da mama	-	<i>PTEN</i>	c.549G>C (p.Lys183Asn)	(i)
#129	Feminino	42	Cancro da mama	Não especificado o tipo de cancro	<i>MLH1</i>	c.206G>A (p.Arg69Lys)	(iii)
					<i>RAD51C</i>	c.244C>T (p.His82Tyr)	
#131	Feminino	79	Cancro da mama	Cancro da mama	<i>BRIP1</i>	c.139C>G (p.Pro47Ala)	(iii)
#134	Feminino	50	Cancro da mama	-	<i>PALB2</i>	c.1982C>G (p.Pro661Arg)	(i)
					<i>STK11</i>	c.863-5_863-3del	
#135	Feminino	66	Cancro da mama	-	<i>ATM</i>	c.4414T>G (p.Leu1472Val)	(i)
#137	Feminino	34	Cancro da mama	-	<i>PTEN</i>	c.685T>A (p.Ser229Thr)	(i)
#138	Feminino	35	-	Cancro da mama e ovário	<i>MSH6</i>	c.818G>T (p.Gly273Val)	(ii)
#140	Feminino	68	Cancro da mama	Cancro da mama e próstata	<i>ATM</i>	c.4414T>G (p.Leu1472Val)	(iii)
#141	Feminino	50	Cancro da mama	Não especificado o tipo de cancro	<i>CHEK2</i>	c.1141A>G (p.Met381Val)	(iii)
#147	Feminino	50	Cancro da mama	Não especificado o tipo de cancro	<i>BRCA2</i>	c.4828G>C (p.Val1610Leu)	(iii)
					<i>CHEK2</i>	c.1489G>A (p.Asp497Asn)	
#148	Feminino	48	Cancro da mama	Não especificado o tipo de cancro	<i>ATM</i>	c.8110T>C (p.Cys2704Arg)	(iii)
					<i>BRCA2</i>	c.3299A>T (p.Asn1100Ile)	
#150	Feminino	50	Cancro da mama	Não especificado o tipo de cancro	<i>MSH2</i>	c.236T>G (p.Val79Gly)	(iii)
#152	Feminino	58	Cancro do ovário	Não especificado o tipo de cancro	<i>BRCA2</i>	c.8363G>T (p.Trp2788Leu)	(iii)
#153	Feminino	52	Cancro da mama	Não especificado o tipo de cancro	<i>CHEK2</i>	c.962A>C (p.Glu321Ala)	(iii)
#156	Feminino	49	Cancro da mama	-	<i>ATM</i>	c.3240C>A (p.Asp1080Glu)	(i)
#158	Feminino	73	Cancro da mama	Cancro da mama	<i>MSH6</i>	c.3968T>C (p.Phe1323Ser)	(iii)
#163	Feminino	36	Cancro da mama	-	<i>PMS2</i>	c.2186_2187del (p.Leu729GlnfsTer6)	(i)
#164	Feminino	36	Cancro da mama	-	<i>BRCA2</i>	c.3397C>T (p.Pro1133Ser)	(i)
					<i>PALB2</i>	c.2453T>C (p.Phe818Ser)	
#165	Feminino	62	Cancro do ovário	Cancro da mama, próstata, colorretal e sarcoma de Ewing	<i>BRCA2</i>	c.9442G>T (p.Ala3148Ser)	(iii)

Nº atribuído ao paciente no estudo	Género	Idade	Informações clínicas		Gene	Variante	Grupo
			Diagnóstico	História familiar de cancro			
#174	Feminino	59	Cancro da mama	Cancro da mama	<i>CHEK2</i>	c.695G>T (p.Gly232Val)	(iii)
#182	Feminino	56	Cancro do ovário e peritoneu	Cancro da próstata	<i>ATM</i>	c.6835A>G (p.Lys2279Glu)	(iii)
#185	Feminino	58	Cancro da mama	Não especificado o tipo de cancro	<i>BRIP1</i>	c.671G>C (p.Gly224Ala)	(iii)
					<i>MSH2</i>	c.1787A>G (p.Asn596Ser)	
#190	Masculino	72	Cancro da próstata e colorretal	Cancro da mama, próstata e colorretal	<i>MSH2</i>	c.1595T>C (p.Val532Ala)	(iii)
#197	Feminino	57	Cancro da mama	Cancro da mama	<i>MLH1</i>	c.1453G>T (p.Asp485Tyr)	(iii)
					<i>MSH2</i>	c.1130A>G (p.Gln377Arg)	
#198	Feminino	45	Cancro da mama	Não especificado o tipo de cancro	<i>MSH6</i>	c.2640_2641insAAA (p.Asp880_Gly881insLys)	(iii)
#199	Feminino	44	Cancro da mama	Cancro colorretal	<i>BRCA2</i>	c.1993A>G (p.Thr665Ala)	(iii)
#202	Feminino	47	Cancro da mama	-	<i>ATM</i>	c.6067G>A (p.Gly2023Arg)	(i)
#206	Feminino	38	Cancro da mama	-	<i>BRCA2</i>	c.7618-10T>G	(i)
#209	Feminino	40	Cancro da mama	-	<i>MSH2</i>	c.435T>G (p.Ile145Met)	(i)
#218	Feminino	41	Cancro da mama	-	<i>ATM</i>	c.3240C>A (p.Asp1080Glu)	(i)
#220	Feminino	43	Cancro da mama	-	<i>BRCA2</i>	c.1096T>G (p.Leu366Val)	(i)
#221	Feminino	46	Cancro da mama	-	<i>BRCA2</i>	c.1012G>A (p.Ala338Thr)	(i)
#222	Feminino	52	Cancro da mama	Cancro da mama	<i>BRCA2</i>	c.1096T>G (p.Leu366Val)	(iii)
#225	Feminino	49	Cancro da mama	-	<i>MSH6</i>	c.3260C>G (p.Pro1087Arg)	(i)
#231	Feminino	53	Cancro do ovário	Cancro da mama	<i>BRCA2</i>	c.280C>T (p.Pro94Ser)	(iii)
					<i>RAD51C</i>	c.896C>G (p.Pro299Arg)	
#239	Feminino	49	Cancro da mama, bexiga e intestino delgado	Cancro gástrico	<i>BRCA2</i>	c.383A>G (p.Asp128Gly)	(iii)
#243	Feminino	41	Cancro da mama	-	<i>MSH2</i>	c.934C>G (p.Leu312Val)	(i)
#246	Feminino	66	Cancro da mama	-	<i>CHEK2</i>	c.1556G>T (p.Arg519Leu)	(i)
#249	Feminino	63	Cancro da mama	-	<i>BRCA1</i>	c.488G>C (p.Arg163Thr)	(i)

Nº atribuído ao paciente no estudo	Género	Idade	Informações clínicas		Gene	Variante	Grupo
			Diagnóstico	História familiar de cancro			
#255	Feminino	41	Cancro da mama	-	<i>MLH1</i>	c.1501A>T (p.Ile501Phe)	(i)
#257	Feminino	46	Cancro da mama	Cancro do ovário e pâncreas	<i>STK11</i>	c.465-3C>T	(iii)
#264	Feminino	41	Cancro da mama	-	<i>MSH2</i>	c.1571G>A (p.Arg524His)	(i)
#268	Feminino	44	Cancro da mama	-	<i>BRCA2</i>	c.1706A>G (p.Gln569Arg)	(i)
#269	Feminino	56	Cancro da mama	Não especificado o tipo de cancro	<i>CHEK2</i>	c.320-5T>A	(iii)
#279	Feminino	71	Cancro da mama	-	<i>CHEK2</i>	c.1216C>T (p.Arg406Cys)	(i)
#283	Feminino	60	Cancro da mama	-	<i>ATM</i>	c.202A>G (p.Ile68Val)	(i)
					<i>MLH1</i>	c.1453G>T (p.Asp485Tyr)	
#289	Feminino	49	Cancro da mama	Cancro da próstata	<i>MLH1</i>	c.1153C>T (p.Arg385Cys)	(iii)
#293	Feminino	64	Cancro da mama	-	<i>ATM</i>	c.1595G>A (p.Cys532Tyr)	(i)
#294	Feminino	36	Cancro da mama	-	<i>NBN</i>	c.1454C>T (p.Thr485Met)	(i)