



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

TESE DE DOUTORADO

**SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA: ANÁLISE DE PAINEL
MULTIGENE EM MULHERES AFRODESCENDENTES DA BAHIA**

GABRIELA DO ESPIRITO SANTO FELIX

Salvador - Brasil

2018

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e
Medicina Investigativa**

GABRIELA DO ESPIRITO SANTO FELIX

**SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA: ANÁLISE DE PAINEL MULTIGENE
EM MULHERES AFRODESCENDENTES DA BAHIA**

Orientadora: Dr^a Kiyoko Abe-Sandes
Coorientadora: Dr^a Ivana Nascimento
Orientadora no exterior: Dr^a Olufunmilayo Olopade

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Doutor.

Salvador - Brasil

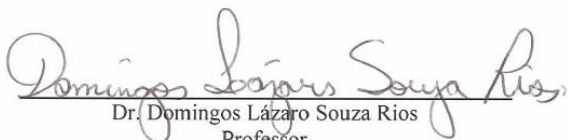
2018

SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA: ANÁLISE DE PAINEL MULTIGENE EM
MULHERES AFRODESCENDENTE DA BAHIA

GABRIELA DO ESPIRITO SANTO FELIX

FOLHA DE APROVAÇÃO

Comissão Examinadora



Dr. Domingos Lázaro Souza Rios
Professor
UNEB



Dra. Dalila Luciola Zanette
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ



Dra. Renata Lucia Leite Ferreira de Lima
Professora
UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; da Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (SESAB); da American Cancer Society (ACS); da John and Edith Kapoor Charitable Foundation e do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular.

AGRADECIMENTOS

A Deus;

A todos os indivíduos participantes da pesquisa;

Aos membros da banca examinadora;

Às minhas orientadoras Dra Kiyoko Sandes, Dra Ivana Nascimento e Dra Olufunmilayo Olopade;

Às instituições participantes da pesquisa: Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz e Center for Clinical Cancer Genetics and Global Health, Department of Medicine, University of Chicago;

As agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (SESAB), American Cancer Society e John and Editha Kapoor Charitable Foundation;

Aos meus colegas colaboradores: Yonglan Zheng, Tom Walsh, Rodrigo Santa Cruz Guindalini, Juliana Côrtes, Taisa Machado-Lopes, Selma São Bernardo, Letícia Melo, Aidil Garcez, Jing Zhang, Niu Qun, Polyanna Carôzo, Irlânia Santos, Thaís Palma, Bernardo Garicochea, Betânia Pereira Toralles, Roberto Meyer e Mary-Claire King;

A bibliotecária Ana Fiscina do Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz;

Ao minhas amigas Lise Sveen, Débora Sobreira, Jackie Dinis, Poly Martínez, Emília Pinto, Carol Miranda, Lise Marcelino, Poly Carôzo, Juli Côrtes, Gaby Manzoli, Taise Lima e Michelly Velloso;

A minha família, meus pais Márcia e Aureliano Felix e minhas irmãs Adélia e Luma.

Dedico aos meus pais e minhas irmãs.

“I never lose. I either win or learn.”

Nelson Mandela

FELIX, Gabriela do Espírito Santo. Susceptibilidade ao câncer de mama: análise de painel multigene em mulheres afrodescendentes da Bahia, Brasil. 94 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente entre mulheres no mundo, mas com diferentes taxas de mortalidade da doença entre países emergentes e desenvolvidos. Isso pode ser atribuído à susceptibilidade particular de cada população, além do modelo de prevenção e tratamento estabelecido. Uma das ferramentas que pode auxiliar na prevenção e estabelecimento de tratamento personalizado é o teste genético. **OBJETIVO:** Verificar o perfil de susceptibilidade ao câncer de mama da população feminina nordestina pouco estudada, particularmente a afrodescendente. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foi estudado um painel personalizado de 28 genes de susceptibilidade ao câncer de mama (*BROCA*) em um grupo de mulheres com câncer de mama e mulheres saudáveis. Os dados clínicos e epidemiológicos de 173 mulheres com câncer de mama e 119 mulheres controle foram coletados durante entrevista. **RESULTADOS:** A maioria dos indivíduos de ambos os grupos se autodenominou como afrodescendentes (>60%). Foram detectadas alterações genéticas de significado clínico em 37 mulheres grupo caso e uma mulher do grupo controle, $OR = 27,75$ ($p = 0,008$). Nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foi detectada a maioria das alterações (64,85%) do que outros genes de susceptibilidade (35,15%). Mutações fundadoras (recorrentes em populações ancestrais) foram mais frequentes do que mutações novas, 81,1% (30/37) e 18,9% (7/37) respectivamente. **CONCLUSÕES:** Esse foi o primeiro estudo molecular de susceptibilidade ao câncer mama realizado com mulheres afrodescendentes da Bahia, demonstrando que outros genes de susceptibilidade além do *BRCA1/2* estão envolvidos no desenvolvimento desse câncer e devem ser analisados nessas mulheres.

Palavras chave: Câncer de Mama, Afrodescendente, Susceptibilidade genética.

FELIX, Gabriela do Espirito Santo. Susceptibility to breast cancer: analysis of a multi-gene panel in African-descendants women from Bahia, Brazil. 94 f. il. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Breast cancer is the most frequent malignant neoplasia in the world, but with considerable differences of death rate among developed and developing countries. These differences could be due to susceptibility particular of each population, besides the prevention and treatment model used. One tool that could help in prevention and adequate personalized treatment is the genetic testing. **OBJECTIVE:** Verify the susceptibility profile to breast cancer of women from Northeast of Brazil, specially the African-descendants. **MATERIAL AND METHODS:** It was studied a personalized panel of 28 breast cancer susceptibility genes (BROCA) in women with and without breast cancer. The clinical and epidemiological data of the 173 breast cancer women and 119 control women were collected during the interview. **RESULTS:** Most individuals of both studied groups self-reported as African-descendants (>60%). Mutations of clinical significance was detected in 37 case women and only control, OR= 27.75 (p= 0.008). Most genetic alterations were observed in *BRCA1* and *BRCA2* (64.85%) than other susceptibility genes (35.15%). Founder mutations (recurrent in ancestral populations) were more frequent than new mutations, 81.1% (30/37) and 18.9 % (7/37) respectively. **CONCLUSIONS:** This was the first molecular study about the susceptibility to breast cancer done in African-descendants women from Bahia, demonstrating that other genes than *BRCA1/2* are involved in the development of this cancer and must be analyzed in these women.

Key words: Breast cancer, African-descendants, Genetic susceptibility.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 1. | Etapas do sequenciamento do painel BROCA. | 33 |
| Figure 1. | Frequency of the genes altered between African-descendant and non-African descendants breast cancer patients. | 58 |
| Figure 2. | Mean mutation risk estimated according self-reported African ancestry and gene altered in BROCA panel. | 59 |
| Sup Fig 1. | Distribution of the Brazilian cohort according the place of origin (birth). | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|--------------------|---|----|
| Table 1. | Baseline characteristics of the Brazilian cohort according self-reported African ancestry. | 48 |
| Table 2 | Tumor characteristic of the high-risk breast cancer patients studied with germline pathogenic variants in the susceptibility genes studied. | 49 |
| Table 3. | Genotype and breast tumor phenotype by immunohistochemistry according to self-reported African ancestry. | 52 |
| Supp Tab 1. | Description of genes and variants founds with BROCA panel according the groups analyzed. | 53 |
| Supp Tab 2. | Description of the variants found on high-risk breast cancer women from Northeast of Brazil. | 54 |
| Supp Tab 3. | Mutational and disease risk estimated according mutated status by BROCA panel. | 56 |
| Supp Tab 4. | Mean mutation risk estimated according mutated gene by BROCA panel and self-reported African ancestry. | 57 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| <i>ATM</i> | Ataxia telangiectasia mutated (Ataxia telangiectasia mutado) |
| <i>ATR</i> | Ataxia telangiectasia and Rad3 related (Ataxia telangiectasia relacionado ao Rad3) |
| <i>BA</i> | Bahia |
| <i>BAP1</i> | BRCA1 associated protein 1 (Proteína 1 associada ao BRCA1) |
| <i>BARD1</i> | BRCA1 associated RING domain 1 (BRCA1 associado ao domínio RING 1) |
| <i>BRCA 1</i> | Breast cancer gene 1 (Gene do câncer de mama 1) |
| <i>BRCA 2</i> | Breast cancer gene 2 (Gene do câncer de mama 2) |
| <i>BRIP1</i> | BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1 (Proteína Helicase 1 C-terminal de interação com BRCA1) |
| <i>BROCA</i> | Breast and Ovarian Cancer Risk Panel (Painel de risco de câncer de mama e ovário) |
| <i>CDH1</i> | Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial) (Caderina 1, tipo 1, E-caderina (epitelial)) |
| <i>CHEK1</i> | CHK1 checkpoint homolog (S. pombe) (Homólogo do ponto de checagem de CHK1 (S. pombe)) |
| <i>CHEK2</i> | Checkpoint kinase 2 (Ponto de verificação quinase 2) |
| <i>CTNNA1</i> | Catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa (Catenina (proteína associada à caderina), alfa 1, 102kDa) |
| <i>FAM175A</i> | Family with sequence similarity 175, member A (Família com similaridade de seqüência 175, membro A) |
| <i>FANCM</i> | Fanconi anemia complementation group M (Grupo M de complementação da anemia de Fanconi) |
| <i>GEN1</i> | Gen homolog 1, endonuclease (Drosophila) (Gen homólogo 1, endonuclease (Drosophila)) |

| | |
|---------------|--|
| HBOC | Hereditary Breast and Ovarian Cancer (Câncer de mama e ovário hereditário) |
| IHC | Immunohistochemistry (Imunohistoquímica) |
| IMC | Índice de Massa Corpórea |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| LFL | Li-Fraumeni Like-Syndrome (Síndrome de Li-Fraumeni “similar”) |
| LFS | Li-Fraumeni Syndrome (Síndrome de Li-Fraumeni) |
| <i>MRE11A</i> | MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>) (MRE11 recombinação meiótica 11 homólogo A (<i>S. cerevisiae</i>)) |
| <i>NBN</i> | Nibrina |
| NE | Nordeste |
| <i>PALB2</i> | Partner and localizer of BRCA2 (parceiro e localizador do BRCA2) |
| <i>PPM1D</i> | Protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform (Proteína fosfatase 1D dependente de magnésio, isoforma delta) |
| <i>PTEN</i> | Phosphatase and tensin homolog (Fosfatase e homólogo de tensinas) |
| <i>RAD51B</i> | RAD51 homolog B (<i>S. cerevisiae</i>) (Homólogo RAD51 B (<i>S. cerevisiae</i>)) |
| <i>RAD51C</i> | RAD51 homolog C (<i>S. cerevisiae</i>) (Homólogo RAD51 B (<i>S. cerevisiae</i>)) |
| <i>RAD51D</i> | RAD51 homolog D (<i>S. cerevisiae</i>) (Homólogo RAD51 B (<i>S. cerevisiae</i>)) |
| <i>RECQL</i> | RecQ like helicase (RecQ similar helicase) |
| <i>RINT1</i> | RAD50 interactor 1 (Associado 1 ao RAD50) |
| <i>SLX4</i> | SLX4 structure-specific endonuclease subunit homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (Homólogo da subunidade da endonuclease específica da estrutura SLX4 (<i>S. cerevisiae</i>)) |
| <i>SNP</i> | Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismos de Nucleotídeos simples) |
| <i>STK11</i> | Serine/threonine kinase 11 (Serina / treonina quinase 11) |
| TN | Triple negative (triplo negativo) |
| <i>TP53</i> | Tumor protein 53 (Proteína tumoral 53) |
| Wt | Wild type (Tipo selvagem) |
| <i>XRCC2</i> | X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells |

2(Reparo de raios-X complementando reparo defeituoso em células de hamster chinês 2)

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 20 |
| 2.1 | EVOLUÇÃO DE POPULAÇÕES HUMANAS E SUSCEPTIBILIDADE A DOENÇAS | 20 |
| 2.2 | SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA | 23 |
| 3 | OBJETIVOS | 28 |
| 3.1 | GERAL | 28 |
| 3.1 | ESPECÍFICOS | 28 |
| 4 | METODOLOGIA | 29 |
| 4.1 | CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E POPULAÇÃO DE ESTUDO | 29 |
| 4.2 | SELEÇÃO GRUPO CASO | 29 |
| 4.2.1 | Critérios de inclusão | 30 |
| 4.2.2 | Critérios de exclusão | 30 |
| 4.3 | SELEÇÃO GRUPO CONTROLE | 30 |
| 4.3.1 | Critérios de inclusão | 31 |
| 4.3.2 | Critérios de exclusão | 31 |
| 4.4 | CONTROLE DE QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE DNA | 32 |
| 4.5 | SEQUENCIAMENTO – PAINEL BROCA | 33 |
| 4.6 | ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 34 |
| 5 | ARTIGO ORIGINAL (em processo de submissão) | 35 |
| 6 | ARTIGO DE REVISÃO | 61 |
| 7 | CONCLUSÕES | 62 |
| | REFERÊNCIAS | 63 |
| | APÊNDICE I | 72 |
| | APÊNDICE II | 75 |
| | APÊNDICE III | 78 |
| | ANEXO I | 80 |
| | ANEXO II | 81 |

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia maligna com maior taxa de incidência de casos entre mulheres de países em desenvolvimento (~53%), exceto câncer de pele não melanoma (WCRFI, 2015). Nos últimos anos, os países desenvolvidos apresentaram redução das taxas de mortalidade de câncer de mama, enquanto nos países em desenvolvimento como Brasil, Rússia, Índia e China foram observados significativos aumento (SERVICK, 2014). Essa tendência nos alerta para o desenvolvimento urgente de mudanças nos modelos de rastreamento (prevenção), como também modelos de tratamento do câncer de mama personalizado de acordo com cada população, porque modelos de tratamento e prevenção do tipo “*one-size-fits-all*” (*um padrão para todos*), é inadequado e ultrapassado, pois não consideram as diferenças de riscos entre populações (HARFORD, 2011).

Essa neoplasia maligna acomete em sua maioria mulheres, mas também pode acometer homens (menos de 1%). A maior proporção dos casos de câncer de mama é do tipo esporádico (75-80%) – casos diagnosticados em indivíduos com mais de 60 anos, sem agregação de casos de câncer entre os familiares. Enquanto, a menor parcela cerca de 20-25% é do tipo familiar e/ou hereditário (PAL et al., 2004).

No câncer de mama hereditário a deficiência genética é herdada, ou seja, todas as células do corpo irão apresentar a alteração no DNA genômico (seja germinativo ou somático), resultando no câncer. Enquanto no câncer de mama do tipo esporádico a alteração genética é adquirida devido, por exemplo, à exposição a agentes exógenos (ionizantes etc), e geralmente o indivíduo não tem parentes com o mesmo tipo de câncer. Nesse apenas as células somáticas apresentarão a mutação genética (inicial) e causadora do câncer. Já no câncer do tipo familiar observa-se uma soma dos dois fatores, susceptibilidade genética sem padrão claro de herança e fatores de risco ambiental (ex. dieta, tabagismo etc). Logo, observa-se que todos os tipos de câncer de mama são genéticos, porque são neoplasias malignas resultantes de alterações no

material genético seja ele germinativo ou somático (MYRIAD, [s.d.]; NJIAJU; OLOPADE, 2012).

Por isso a importância do teste genético para avaliar a susceptibilidade genética ao câncer de mama seja no estudo do DNA germinativo e/ou somático. Porque com essa ferramenta podemos identificar previamente qual o indivíduo de alto risco. Assim, o teste genético deve ser oferecido a todas as mulheres, aquelas com história familiar características de síndromes hereditárias, como também os casos de câncer de mama esporádicos com fenótipo agressivos como os do tipo triplo negativos caracterizados pela expressão negativa dos receptores hormonais (estrógeno, progesterona e Her-2) e/ou em idade jovem (menor que 50 anos) (ROBERTSON et al., 2012).

Uma vez que estudos têm demonstrado que cerca de 10% dos casos de câncer de mama esporádicos do tipo triplo negativos apresentam mutação em *BRCA1* (ROBERTSON et al., 2012). Possivelmente, esses casos de câncer hereditário, passam “despercebidos” por apresentarem o núcleo familiar restrito e pouco informativo, não preenchendo, os critérios previstos nos manuais clínicos que definem as síndromes de predisposição hereditária ao câncer. Desta forma, é de extrema importância o treinamento de profissionais de saúde na detecção eficaz de indivíduos de alto risco, como também o uso ferramentas preditivas de riscos calibradas para cada população.

Por exemplo, para a população norte-americana diretrizes e ferramentas calibradas para cálculos de risco mutacional (My Myriad Risk, BRCAPRO, Claus), assim como escolas de aperfeiçoamento estão disponíveis para os profissionais de saúde atuarem na população. Um importante *manual* muito utilizado pela comunidade médica no mundo é o manual prático baseado em evidências da National Comprehensive Cancer Network®, o qual direciona qual teste genético solicitar de acordo com a clínica e características da história familiar da paciente.

A utilidade do teste genético personalizado já vem sendo discutida por muitos pesquisadores no mundo como Maire Claire King (KING et al., 2014), que defende a aplicabilidade do teste genético, pelo menos a análise dos genes *BRCA1* e *BRCA2* a qual deveria ser oferecida à população feminina em geral, aumentando assim a

utilidade do teste ao detectar os indivíduos de alto risco para câncer de mama antes do mesmo ocorrer, aumentando as chances de diagnóstico precoce e, portanto sobrevida.

Tal iniciativa traria muitos benefícios à prática da medicina personalizada nas áreas da oncologia clínica. Nos Estados Unidos essa visão sobre a prática médica adequada e precisa com menos gastos, foi um dos feitos e marcos do presidente Barack Obama, com a *Precision Medicine Initiative* (tradução direta, Iniciativa da Medicina Precisa) com investimentos em pesquisas de base populacional (COLLINS; VARMUS, 2015). Essa iniciativa foi muito importante porque somente através do estudo do perfil de risco da população e seus subgrupos para câncer (de mama), podendo-se traçar medidas preventivas mais eficientes tratamentos adequados (HALL; OLOPADE, 2006; HARFORD, 2011; KNERR; WAYMAN; BONHAM, 2011).

No Brasil as ações de ensino e pesquisa da Rede Brasileira de Câncer Hereditário (ReBraCH) vêm se destacando desde 2006. Estudos significantes começaram a evidenciar o perfil de susceptibilidade genética da população brasileira ao câncer de mama com estudo dos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *PTEN* e *PALB2* etc (CARRARO et al., 2013; FELIX et al., 2014; FERNANDES et al., 2016; PALMERO et al., 2018; SILVA et al., 2014). Mostrando inclusive características clínicas particulares de pacientes brasileiras com câncer de mama e destacando a necessidade de manuais de critérios clínicos para teste genético de acordo cada população, como o estudo realizado no Sudeste do Brasil que evidenciou que perfil clínico de número significativo de mulheres com HBOC não se adequavam aos critérios do NCCN (ALEMAR et al., 2017). Porém, ainda é necessário o investimento no estudo de subgrupos populacionais brasileiros, especialmente pouco estudados como os afrodescendentes, pois a população brasileira é extremamente heterogênea.

Como novos estudos evidenciam que outros genes de susceptibilidade além do *BRCA1* e *BRCA2* estão envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama. E, com o atual barateamento do sequenciamento, outros genes de susceptibilidade também deverão ser rastreados na população. Contudo, o número de estudos de minorias populacionais é restrito devido ao baixo investimento em pesquisas de base

populacionais em países emergentes. Com isso o perfil de susceptibilidade da população afrodescendente e latina, por exemplo, é pouco conhecido.

O conhecimento do perfil susceptibilidade de uma população é importante porque cada população tem características próprias quanto ao padrão de formação e estruturação, como também fatores ambientais específicos. Por exemplo, populações altamente homogênea e endogâmica como os judeus Ashkenazi terão um perfil característico com predominância de mutações de origem Europeia como *BRCA1:c.68_69delAG* (185delAG) e *BRCA1:c.5266dupC* (5382insC), *BRCA2:c.5946_5946delT* (6174delT) (LEVY-LAHAD et al., 1997; STRUEWING et al., 1997). Enquanto populações mais heterogêneas como a brasileira, o espectro mutacional é extremamente diversificado observando, por exemplo, mutações fundadoras de diferentes origens na Europa, Ásia e África (ASHTON-PROLLA; VARGAS, 2014; DUTIL et al., 2015; OSSA; TORRES, 2016).

É importante ressaltar que todas as populações são heterogêneas, mas o grau de miscigenação e diversidade é variável devido a fatores múltiplos que influenciam o fluxo gênico (entrada e saída de alelos) na população etc.

Assim, como cada população tem um grau de miscigenação, conseqüentemente tem um perfil intrínseco de susceptibilidade genética ao câncer de mama. Verificar o perfil de risco de cada população é essencial para o estabelecimento de medidas preventivas e de tratamento adequadas, o que resulta no uso inteligente dos recursos destinados a saúde (KNERR; WAYMAN; BONHAM, 2011; SAULSBERRY; TERRY, 2013).

Sabendo que a população brasileira é uma das populações mais heterogêneas do mundo, do ponto de vista genético, por ser uma população jovem – um pouco mais de 500 anos de formação e por ter sido formada por diversos povos, é imprescindível o conhecimento do perfil de risco ao câncer de mama dessa população, em especial os grupos menos estudados como o de afrodescendentes da região do Nordeste do Brasil.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EVOLUÇÃO DE POPULAÇÕES HUMANAS E SUSCEPTIBILIDADE A DOENÇAS

A espécie humana, *Homo sapiens*, é uma das espécies mais novas da terra datando cerca de 200,000 anos. Acredita-se que os primeiros humanos modernos surgiram no continente africano e de lá parte do grupo migrou para os outros continentes do globo, primeiramente Europa, depois Ásia e por fim as Américas. Esse modelo teórico é mais conhecido como “*out-of-Africa*” (LIU et al., 2006; STRINGER, 2003).

Existe, contudo outra teoria com a hipótese de que a espécie humana surgiu em diversas regiões ao mesmo tempo, resultado do acasalamento, por exemplo, da espécie como *Homo erectus* com outras espécies mais arcaicas em cada continente, o Africano, o Europeu e o Asiático que evoluíram à espécie mais moderna dos humanos, o *Homo sapiens*. Essa teoria é mais conhecida como a hipótese multiregional (WOLPOFF; HAWKS; CASPARI, 2000).

Na literatura existem dados que compelem para as duas hipóteses, mas considerando que a espécie humana é uma das mais novas datadas, muitas questões ainda não podem ser totalmente esclarecidas devido ao pequeno passo registrado na escala evolutiva.

Embora a espécie humana tenha sido originada há pouco tempo, é possível observar características (fenótipos) que foram favoravelmente *selecionadas* em determinadas populações em detrimento a outras, como por exemplo, a variação de altura e IMC com variações na população europeia (AMATO et al., 2011; ROBINSON et al., 2015), variação da cor da pele (MCEVOY; BELEZA; SHRIVER, 2006; STURM, 2009), susceptibilidade a doenças inflamatórias, autoimune e metabólicas (ZHANG et al., 2013), susceptibilidade a anemia falciforme (ELGUERO et al., 2015) etc.

Da mesma forma para o câncer de mama, observamos diferenças de risco entre populações humanas, nas quais populações humanas mais homogêneas com tendência a maior frequência dos alelos deletérios em genes de susceptibilidade ao câncer de mama do que as populações heterogêneas (THOMSEN et al., 2015).

Dois fatores irão influenciar no grau de miscigenação de uma população: como a população foi formada e como essa estrutura é mantida. Por exemplo, a população brasileira é uma das populações mais heterogêneas do mundo. Por ser uma população recentemente formada, um pouco mais que 500 anos, e também por vários grupos populacionais da Europa, África, Ásia e nativos americanos terem contribuído para a sua formação. Além disso, é importante destacar que essa miscigenação não ocorreu da mesma forma em todas as regiões do Brasil. Na região nordeste é observada maior frequência de afrodescendentes, no norte nativos americanos, e no sudeste maior contribuição europeia (SALZANO e SANS, 2014).

Por ser uma política que apoiava a escravidão, Portugal também trouxe isso ao Brasil, ao trazer escravos da África. E esses embora fossem a força trabalhadora, não tiveram as mesmas chances de ter uniões e procriar com outros subgrupos, devido ao grupo que pertenciam na sociedade (IBGE, 2007). Isso acabava servindo de gargalo genético. Outro fator também foi a viagem dos imigrantes até a terra colonizada (Brasil), pois devido às condições da viagem muitos indivíduos morriam, e assim a representatividade genética era mais uma vez comprometida. Ou seja, as frequências dos alelos fundadores (originados nas populações ancestrais Europeia, Africana e Ameríndia) não foram as mesmas da população brasileira, recém-formada.

Estudos moleculares utilizando marcadores uniparentais (mtDNA e cromossomo Y) demonstraram que os indivíduos europeus procriavam com liberdade com mulheres de todos grupos populacionais, índias, africanas e europeias, diferentemente dos indivíduos africanos e ameríndios. Além disso, estudos com marcadores autossômicos mostram que o grau de mistura varia de acordo com a região, com a região do Nordeste com maior frequência de indivíduos com elevada contribuição ancestral africana do que as regiões do Sul do Brasil (ABE-SANDES; SILVA; ZAGO, 2004; ALVES-SILVA et al., 2000; CARVALHO-SILVA et al., 2001).

Essa alta heterogeneidade genética observada na população brasileira, também é uma característica de outras populações da América Latina, ex-colônias de populações europeias. Contudo, as proporções de contribuição ancestral são diferentes (ABE-SANDES et al., 2010; KEHDY et al., 2015; LIMA-COSTA et al., 2015; MACHADO et al., 2013).

Por exemplo, diferente do Brasil, no México a Espanha utilizou em maior parte como força escrava os nativos americanos. Sendo esse na América Latina um dos países com maior proporção de descendentes de Nativos Americanos. Assim, embora ambas as populações, brasileira e mexicana, tiveram praticamente as mesmas populações ancestrais – Europeia, Ameríndia e Africana – as proporções de contribuição ancestral são diferentes e espelham as condições de quando foram estabelecidas (colonizadas) (SALZANO e SANS 2014).

Já como exemplo de população homogênea, temos os Judeus Ashkenazi, um grupo altamente homogêneo e endogâmico observando-se uma elevada taxa de doenças raras com 1 a cada 4 judeus Ashkenazi portador de doença de Gaucher, fibrose cística, doença de Tay-Sachs e doença de Canavan (OSTRER; SKORECKI, 2013; RIVAS et al., 2018).

Acredita-se que esses alelos deletérios não foram removidos da população por conferir, primeiramente, vantagem na natureza ou ainda por serem “carregados” em heterozigose. Veja-se no caso a variante da hemoglobina que confere Anemia Falciforme tem como vantagem conferir resistência ao *Plasmodium falciparum* o parasita da malária (ELGUERO et al., 2015).

Recentemente, um grupo propôs responder através de um estudo epidemiológico quais seriam as vantagens que indivíduos que carregam alterações patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2* têm sobre aqueles que carregam alelos do tipo selvagem. Nesse estudo francês, os pesquisadores analisaram dados clínicos e epidemiológicos compilados de mais de 2.000 famílias entre 1988 e 2013. E foi observado associação estatisticamente significativa entre o gene *BRCA1* ou *BRCA2* alterado e o aumento de fertilidade – os homens e as mulheres que tinham mutação patogênica em *BRCA1* ou *BRCA2*, tinham mais filhos dos que os que não carregavam

alteração genética (KWIATKOWSKI et al., 2015). Contudo, deve-se ressaltar que tais dados são achados iniciais, sendo necessários outros estudos para validar essa hipótese.

Outro fator que também poderia explicar a permanência desses alelos deletérios na população seria a idade em que a doença é manifestada. Na população geral o câncer é comumente diagnosticado depois dos 60 anos, enquanto na população de alto risco – pessoas com alterações em genes de susceptibilidade e história familiar de câncer – a idade média ao diagnóstico menor que 50 anos.

Como nos últimos anos tem se observado aumento da expectativa de vida – devido a melhorias nas condições de saneamento, vacinas entre outros fatores – é esperado o aumento das taxas de doenças não transmissíveis associadas ao envelhecimento, como o câncer de mama (WHO, 2014). Conseqüentemente, torna-se necessário o investimento imediato no estudo de melhorias no diagnóstico preciso e eficaz do câncer de mama. Pois isso pode possibilitar a identificação dos indivíduos mais suscetíveis precocemente, aumentando assim as chances de sobrevida com qualidade dos pacientes e redução de gastos com tratamentos agressivos e invasivos das agências de saúde.

2.2 SUSCEPTIBILIDADE AO CÂNCER DE MAMA

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, 38 milhões de pessoas morrem anualmente em todo mundo devido doenças não transmissíveis, sendo 8,2 milhões dessas mortes por câncer. O câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente entre todas as mulheres no mundo, mas com grandes diferenças entre países desenvolvidos e em desenvolvimento, quanto as taxa de incidência e mortalidade (SERVICK, 2014; WHO, 2014). No Brasil foi estimado cerca de 59.700 casos novos de câncer de mama, para cada ano do biênio 2018-2019, com um risco

estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CâNCER - ESTIMATIVA 2018).

Acredita-se que essas diferenças entre as populações, não sejam somente relacionadas a diferenças de susceptibilidade genética e ambiental, mas também com os modelos de rastreio e tratamento para o câncer de mama estabelecidos pelos órgãos de saúde em cada população (HARFORD, 2011; SERVICK, 2014).

Desta forma, os órgãos de saúde governamentais deveriam estabelecer medidas adequadas ao perfil da população, identificando primeiramente quais os indivíduos de alto risco. Como descrito anteriormente, sabe-se que um indivíduo que tem história familiar de câncer, ele/ela tem mais chances de desenvolver câncer ao longo da vida do que aquele(a) quem não tem agregação familiar (casos de câncer na família) (PETRUCCELLI; DALY; FELDMAN, 2013).

Contudo outros fatores ambientais como exposição a agentes químicos tóxicos e radiológicos, assim como comportamentos pessoais podem agir como modeladores do risco ao desenvolvimento ao câncer de mama (SMITH, 2012). Pode-se citar como fatores comportamentais associados ao câncer de mama: dieta hipercalórica, manutenção do peso corporal, reposição hormonal, tabagismo e nuliparidade (FRIEBEL; DOMCHEK; REBBECK, 2014).

Mas entre todos os fatores listados acima, a susceptibilidade genética é a característica de maior importância nessa balança de riscos. Isso porque um indivíduo que carrega uma alteração genética (em heterozigose) em um gene de susceptibilidade ao câncer de mama, já nasce com desvantagem, pois um dos seus genes codificará uma proteína defeituosa, comprometendo a homeostasia celular em pelo menos 50% (KNUDSON, 2001).

Os genes de susceptibilidade ao câncer de mama codificam proteínas que desempenham papéis importantes, principalmente no reparo a danos na fita de DNA nas etapas de checagem do ciclo celular. Os primeiros genes de susceptibilidade ao câncer de mama descobertos foram o *BRCA1* e o *BRCA2* na década 90 (HALL et al., 1990; WOOSTER et al., 1994).

Indivíduos que carregam mutações patogênicas em um desses genes tem maior probabilidade de desenvolver câncer ao longo da vida, sendo o risco entre 50-80% para *BRCA1*, enquanto para o *BRCA2* este risco varia entre 40-70% (PETRUCELLI; DALY; FELDMAN, 2013). A penetrância não é completa, porque outros fatores genéticos, comportamentais e ambientais podem modular esse risco (FRIEBEL; DOMCHEK; REBBECK, 2014).

Além dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, que estão alterados em cerca de 15% dos casos de câncer de mama hereditário, outros genes de susceptibilidade estão associados a essa síndrome como o *TP53*, *PTEN*, *PALB2*, *CHEK2*, *ATM* entre outros, mas com o percentual de mutações relacionadas a tais genes está entre 10-15% (APOSTOLOU; FOSTIRA, 2013; FILIPPINI; VEGA, 2013). Desta forma, cerca 70% dos casos de câncer de mama familiar ainda não se sabe especificamente a causa genética (FILIPPINI; VEGA, 2013).

A maioria das mutações detectadas nos genes de susceptibilidade ao câncer de mama são mutações fundadoras (recorrentes), que são aquelas mutações originadas e frequentes em um determinado grupo populacional, mas uma pequena parcela podem ser mutações do tipo *de novo* (PETRUCELLI; DALY; FELDMAN, 2013).

Em populações miscigenadas e recentemente formadas, como a população brasileira espera-se detectar mutações fundadoras das populações ancestrais, mas em frequências diferentes devido a miscigenação e estruturação populacional. Foi observado na Bahia, por exemplo, cerca 50% dos casos de câncer de mama e ovário com mutação patogênica no gene *BRCA1*, tinham a mutação fundadora galega *BRCA1: c.211G>A (p.R71G)*. Acredita-se que essa frequência elevada esteja relacionada com número de indivíduos da Galícia que migraram para Bahia (FELIX et al. 2014). Já outra mutação também fundadora, a *TP53: c.1010G>A (p.R337H)* é encontrada em baixa frequência em mulheres com câncer de mama da Bahia, mas entre mulheres com câncer de mama do sul e do sudeste do Brasil esta é a mutação fundadora mais frequente (GIACOMAZZI et al., 2014).

Assim como em outras populações, no Brasil observou-se que a maioria da mulheres com câncer de mama e ovário hereditário apresentam alterações

germinativas no genes *BRCA1* e *BRCA2* (CARRARO et al., 2013; FELIX et al., 2014; PALMERO et al., 2018; SILVA et al., 2014). E com a melhoria nas ferramentas de sequenciamento outros genes de susceptibilidade foi observado que outros genes de susceptibilidade também estão associados com o câncer de mama hereditário como *PTEN*, *ATM*, *RAD50*, *RAD51*, *BRIP1*, *PALB2*, *TP53*, *FANCM*, *SLX4* etc (ECONOMOPOULOU; DIMITRIADIS; PSYRRI, 2015; FILIPPINI; VEGA, 2013; PALMERO et al., 2018).

Mutações patogênicas nesses genes de susceptibilidade estão associadas ao câncer de mama, mas o quadro clínico e espectro de agregação de casos de câncer familiar são diferentes. Por exemplo, mutações em *BRCA1* geralmente estão associadas à síndrome do câncer de mama e ovário hereditário (CASTILLA et al., 1994), enquanto mutações em *TP53* estão associadas a síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni *like* (OLIVIER; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010; VARLEY, 2003). Portanto, o estudo do perfil genético de susceptibilidade de um indivíduo ou população pode ajudar no delineamento de medidas preventivas e de tratamento específicos. Pois além de identificar o grupo de alto risco para câncer de mama, devem-se oferecer tratamentos diferenciados, porque embora o desenvolvimento do câncer seja no mesmo órgão (por exemplo mama), são tumores com diferentes características prognósticas (SORLIE et al., 2003; WANG et al., 2018).

Mutações patogênicas germinativas em *BRCA1* estão frequentemente associadas a tumores de mama do tipo basal, ou seja, ausência de expressão dos receptores de estrógeno, progesterona e HER-2, o qual é mais agressivo e de difícil tratamento (SORLIE et al., 2003). Já mutações patogênicas germinativas em *TP53* observa-se que os tumores são receptores estrógenos e progesterona positivos e HER-2 negativo (CARRARO et al. 2013). Conseqüentemente, cada câncer de mama deve ser tratado de forma personalizada, pois como pontuado por Harford (2011) um modelo de tratamento igual para todos é ineficiente e caro.

Embora hoje com o melhoramento da técnica de sequenciamento seja possível sequenciar várias regiões do genoma ao mesmo tempo. No Brasil, o uso do teste genético ainda é limitado e muitas mulheres de alto risco para o câncer de mama ainda

não foram testadas. Considerando as questões econômicas atuais seria inviável testar todas as mulheres, logo, ferramentas preditoras de riscos – questionários padronizados que a partir de informações clínicas e epidemiológicas para o cálculo da probabilidade de um indivíduo vir a ter câncer ao longo da vida e/ou ter mutação em gene de susceptibilidade – poderiam servir de triagem inicial distinguindo indivíduos de baixo e alto risco.

Ferramentas preditoras de risco mutacional como BRCAPRO, PENN II, Claus, BOADICEA e de risco clínico como o modelo de Gail já foram analisadas em diversas populações, contudo, é importante a calibração dessas ferramentas em cada população, pois cada grupo populacional possui características distintas de riscos, sejam essas extrínsecas (ambientais) ou intrínseca (genética) (FISCHER et al., 2013; KURIAN et al., 2009; LEE et al., 2014).

Considerando que estudos científicos iniciais no Brasil mostram diferenças do perfil de mulheres com câncer de mama entre regiões do Brasil, como também ressaltam que essas diferenças podem estar associada com a ancestralidade genética (FELIX et al., 2014; FERNANDES et al., 2016; VIEIRA et al., 2015). O investimento em estudos epidemiológicos moleculares pode ser o passo inicial para o conhecimento do perfil de susceptibilidade da população brasileira ao câncer de mama – principalmente os subgrupos populacionais menos estudados como afrodescendentes – que pode interferir no delineamento de medidas de tratamento e prevenção adequadas, baseadas em evidências científicas.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Verificar a frequência de mutações nos genes de susceptibilidade e características clínico-epidemiológicas de três grupos de mulheres: (1) com apenas história pessoal de câncer de mama; (2) com história pessoal de câncer de mama e familiar de qualquer tipo de câncer incluindo câncer de mama; e (3) mulheres saudáveis sem história pessoal de câncer de mama.

3.2 ESPECÍFICOS

- Verificar a frequência de mutações de significado clínico nos genes de susceptibilidade para o câncer de mama do painel multigênico BROCA nos grupos estudados e suas associações com o estado clínico patológico e fenótipo tumoral;
- Classificar as novas mutações encontradas nos genes de susceptibilidade do painel multigênico BROCA;
- Verificar o perfil de susceptibilidade dos grupos de mulheres estudadas de acordo com a auto-denominação de raça/cor e história familiar de câncer;
- Verificar a performance de ferramentas de cálculos de risco mutacional – Myriad risk, BRACAPRO e PENN – nas mulheres com câncer de mama analisadas;
- Verificar o desempenho do Modelo de Gail nas mulheres com câncer de mama analisadas.

4. METODOLOGIA

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS E POPULAÇÃO DE ESTUDO

Com o intuito de verificar a frequência de mutações de susceptibilidade em mulheres com câncer de mama e mulheres saudáveis, um estudo caso-controle foi desenhado e conduzido no Serviço de Aconselhamento Genético da Universidade Federal da Bahia, Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, sendo o protocolo de pesquisa aprovado pelo CONEP e registrado na Plataforma Brasil, CAAE 37352114.5.0000.5032 (ANEXO I).

Os indivíduos do grupo caso foram entrevistados por uma geneticista e preencheram um questionário padronizado para coleta de informações clínicas e epidemiológicas. Enquanto os indivíduos do grupo controle preencheram um questionário específico, padronizado para o respectivo grupo e foram entrevistados por um colaborador treinado.

A todos os indivíduos participantes da pesquisa foi apresentado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de acordo com grupo, se caso ou controle. A coleta da amostra biológica como também dos dados clínicos epidemiológicos somente foi realizada após o consentimento por meio de assinatura do TCLE. Durante a realização do presente estudo foram seguidas resoluções N°466/2012 e N°441/2011 do Conselho Nacional de Saúde.

4.2 SELEÇÃO GRUPO CASO

A população estudo do grupo caso foi composta por mulheres com câncer de mama referidas ao Ambulatório de Oncogenética do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

entre 2008 e 2015. Todos indivíduos formalizaram o aceite mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE I) e foram submetidos a um questionário clínico-epidemiológico padronizado (APÊNDICE III) durante a consulta com a médica geneticista que obteve dados da história familiar como também dados clínicos. O resultado dos testes genéticos, foram entregues na consulta com os médicos geneticistas do grupo de pesquisa, sendo discutidos com a paciente o significado do testes e possíveis dúvidas. O convite para o aconselhamento foi feito por telefone e/ou e-mail. Os critérios de inclusão e exclusão foram os referidos abaixo:

4.2.1. Critérios de inclusão

- Indivíduos com idade igual ou maior do que 18 anos com diagnóstico histopatológico de câncer de mama;
- Concordar em fazer parte do estudo e que tenham lido, analisado e assinado o termo de consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE I);
- Ter condições de responder o questionário a ser aplicado.

4.2.2. Critérios de exclusão

- Dados clínicos e/ou epidemiológicos insuficientes;
- Amostra insuficiente e/ou de baixa qualidade para análise do painel;
- Solicitação de saída do estudo pelo indivíduo participante.

4.3 SELEÇÃO GRUPO CONTROLE

Os indivíduos do grupo controle foram abordados no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da

Bahia entre 2014 e 2015. Tais indivíduos foram ao presente laboratório fazer exames laboratoriais de rotina e na recepção foram convidados por entrevistadores (membros da equipe de pesquisa) para participar do estudo. Na abordagem foi mencionado que a pesquisa contava com uma equipe de aconselhamento genético e que os resultados da pesquisa, caso o participante quisesse, estava disponível numa consulta com a médica geneticista que pode esclarecer possíveis dúvidas. Convidamos os indivíduos para o aconselhamento por telefone. Para os indivíduos do grupo controle somente foram coletados os itens 1 a 16 do questionário (APÊNDICE III), e o TCLE aplicado foi o descrito no (APÊNDICE II).

4.3.1. Critérios de inclusão

- Indivíduos com idade superior a 18 anos sem diagnóstico histopatológico de qualquer tipo de câncer, podendo ou não ter história familiar de câncer de mama e outro tipo de câncer;
- Que tivessem condição de responder a primeira folha do questionário (itens 1 ao 16 APÊNDICE III)
- Que após esclarecimento, concordaram em fazer parte do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE I).

4.3.2. Critérios de exclusão

- Dados clínicos e/ou epidemiológicos insuficientes;
- Amostra insuficiente e/ou de baixa qualidade para análise do painel;
- Solicitação de saída do estudo pelo indivíduo participante.

4.4 CONTROLE DE QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE DNA

As amostras de DNA germinativo de cada indivíduo foram obtidas a partir de sangue periférico coletado em tubo de EDTA K₂ BD Vacutainer®. Para extrair o DNA foi utilizado kit comercial DNeasy® Blood & Tissue QIAGEN® kit (Austin, TX, USA).

Em seguida foi realizado um processo de controle de qualidade das amostras de DNA em três etapas. A primeira etapa foi a quantificação do DNA em espectrofotômetro específico para dosagem de ácidos nucleicos, NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific®, Wilmington, DE, EUA). As configurações de comprimento de ondas usadas durante o ensaio foi a recomendada pelo fabricante (A260:A280). Todas as amostras foram quantificadas em duplicata e em cada dosagem foi utilizado 2µl de amostra DNA.

Na segunda etapa, foi feita uma diluição de 10ng/µl de cada amostra de DNA. Em seguida foi feita uma eletroforese em gel de agarose a 10% com TAE 1x, utilizando 7 µl de cada amostra de DNA, com o objetivo de observar a integridade do DNA, ou seja, a qualidade da banda (como a presença de sinais de degradação). E, por último foi realizada a terceira etapa do controle de qualidade de DNA, a qual consistiu na quantificação do DNA com o uso do Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EUA). Com o auxílio desse kit é possível quantificar especificamente DNA de dupla fita, ou seja, uma molécula de DNA não degradada. Utilizando o protocolo de uma curva padrão de *low range* (baixo alcance) recomendado pelo fabricante do PicoGreen Assay, em uma microplaca todas as amostras de DNA em teste foram diluídas de 1:1000 como também as amostras DNA padrão conforme protocolo.

Em seguida todas as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro utilizando como comprimentos de onda padrão Excitação ~ 480 nm e emissão ~ 520 nm. Depois, o valor da fluorescência do reagente branco foi subtraído de cada amostra e uma curva padrão de baixo alcance foi construída. As amostras que saíram da curva, com valores abaixo ou acima do limite foram submetidas a uma nova dosagem.

Ao final das três etapas, as amostras de DNA que estavam íntegras na eletroforese em gel de agarose 10% e que apresentaram quantidades de moléculas de DNA íntegra $\geq 500\text{ng}$ para análise do painel multigênico BROCA foram então selecionadas e utilizadas, correspondendo a 173 amostras do grupo caso e 119 amostras do grupo controle.

4.5. SEQUENCIAMENTO – PAINEL BROCA

Como descrito anteriormente, todas as amostras de DNA dos indivíduos participantes do estudo de ambos grupos casos e controles que passaram no controle de qualidade foram selecionadas para sequenciamento paralelo de 28 genes de susceptibilidade, associados ao risco de câncer de mama e/ou ovário – *ATM*, *ATR*, *BAP1*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK1*, *CHEK2*, *CTNNA1*, *FAM175A*, *FANCM*, *GEN1*, *MRE11A*, *NBN*, *PALB2*, *PPM1D*, *PTEN*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RECQL*, *RINT1*, *SLX4*, *STK11*, *TP53* e *XRCC2*.

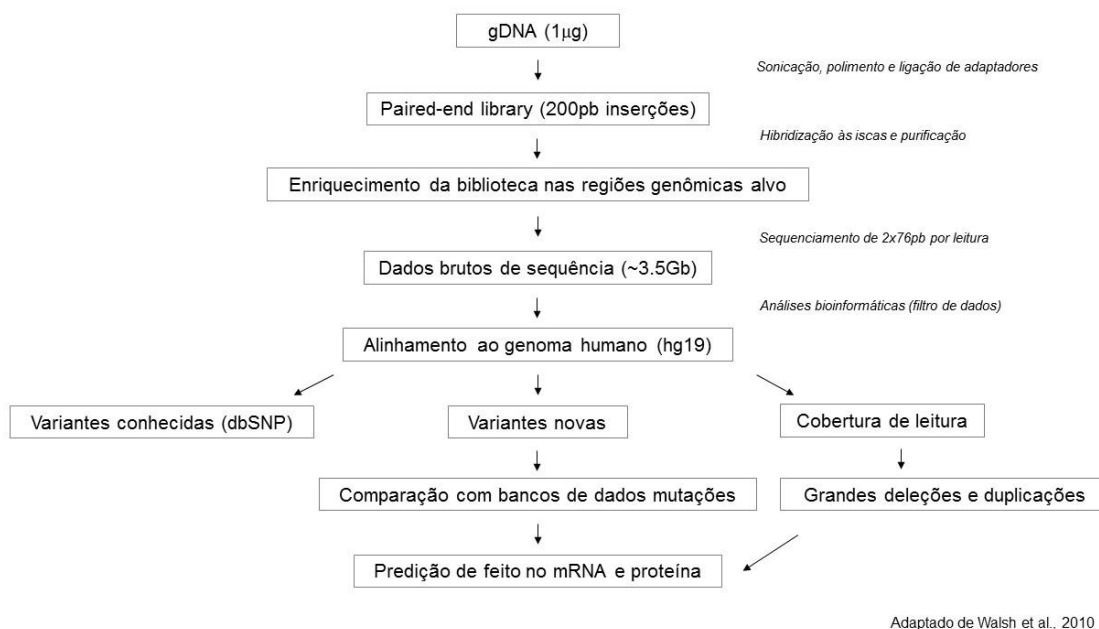


Figura 1. Etapas do sequenciamento do painel BROCA.

Para sequenciar esses 28 genes de susceptibilidade, utilizamos o painel multigênico BROCA (Breast and Ovarian Cancer – Câncer de mama e ovário). Esse painel foi patenteado pela Universidade de Washington, e através de uma colaboração internacional as amostras foram sequenciadas no laboratório da pesquisadora detentora da patente. As etapas do sequenciamento do painel estão descritas na Figura 1 adaptada de Walsh et al. 2010 onde foi descrito inicialmente o painel. Todas as mutações patogênicas encontradas foram confirmadas por sequenciamento de Sanger.

Após a finalização do sequenciamento na plataforma Illumina Genome Analyzer IIX, os dados brutos obtidos foram tratados conforme descrito por Walsh et al. 2010 e por fim realizado o *variant calling* daquelas com significado clínico e/ou incerto.

4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas descritivas e multivariadas dos dados clínicos-epidemiológicos obtidos durante a entrevista e/ou aconselhamento genético foram realizadas no Epi Info™ versão 7.2 (*Center for Disease Control and Prevention*, Atlanta, GA USA) e no SPSS® (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). O escore de grau de conservação das variantes encontradas foi obtido utilizando a Varsome database (VAR SOME, [s.d.]) que utiliza o algoritmo GERP já descrito na literatura (COOPER et al., [s.d.]).

Nos próximos tópicos serão apresentados em formato de artigos os dados obtidos no projeto científico da presente tese de doutorado.

5. ARTIGO ORIGINAL (em processo de submissão)

Original Paper

Breast Cancer Susceptibility Profile in Northeast of Brazil

Gabriela ES Felix, PhD^{1,2}, Yonglan Zheng, PhD³, Tom Walsh, PhD⁴, Rodrigo Santa Cruz Guindalini, MD, PhD^{5,x}, Juliana Côrtes, MsC^{1,2,6}, Taisa Manuela Machado Lopes, PhD¹, Jing Zhang, BSc³, Polyanna Carôzo, MsC^{1,2,6}, Irlânia Santos, MD¹, Thaís Ferreira Bonfim, PhD¹, Bernardo Garicochea, MD, PhD⁷, Betânia Pereira Toralles, MD, PhD¹, Roberto Meyer, MD, PhD¹, Kiyoko Abe-Sandes, PhD¹, Ivana Lucia de Oliveira Nascimento, MD, PhD^{1,8}, Mary-Claire King, PhD⁴ and Olufunmilayo I Olopade, MD³

¹*Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Brazil*

²*Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz Bahia, Brazil*

³*Center for Clinical Cancer Genetics and Global Health, Department of Medicine, University of Chicago, Chicago, USA*

⁴*Division of Medical Genetics, Department of Medicine, University of Washington, Seattle, USA*

⁵*Departamento de Radiologia e Oncologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

⁶*Universidade do Estado da Bahia, Bahia, Brazil*

⁷*Hospital Sírio Libanês, São Paulo, Brazil*

⁸*Núcleo de Oncologia da Bahia, Bahia, Brazil*

^x*CLION, Grupo CAM, Bahia, Brazil*

Corresponding Author:

Olufunmilayo Olopade, MD, FACP, OON
Department of Medicine, University of Chicago
5841 S. Maryland Avenue, MC 2115
Chicago, Illinois 60637-1470
Phone 773-702-4400 · Fax 773-702-0963
folopade@medicine.bsd.uchicago.edu

Abstract

State of Bahia in Northeast of Brazil has the highest frequency of African-descendants in Latin Americans, whose genetic susceptibility of cancer is understudied. We sought to evaluate the burden of inherited predisposition to breast cancer in this population. Cases were 173 women (mean age at diagnosis 47.42 ± 13.13 years) with invasive breast cancer selected regardless of age at diagnosis, family history, or prior genetic testing, and 119 controls were cancer-free women (mean age at interview 47.98 ± 14.25 years). 67% cases and 91% controls self-reported as African-descendant. 68.79% and 39.49% of cases and controls had family history of any cancer including breast cancer, respectively. Among cases, 76% were diagnosed with invasive ductal carcinoma, while 15.6% were triple-negative breast cancer (TNBC). BROCA panel sequencing was used to identify damaging mutations in known and candidate breast cancer genes. Thirty-one distinct damaging mutations were found in 37 (21.4%) cases and in one (0.8%) control ($p = 0.008$, odds ratio [OR] = 27.8). In breast cancer patients, majority of mutations were found in *BRCA1* or *BRCA2* ($n = 23$, 13.3%) compared to other breast cancer genes ($n = 14$, 8.1%). 27 (15.6%) damaging mutations in cases were detected in TNBC. In addition, we observed four African and nine non-African founder mutations, which highlights the unique degree of admixture of this Brazilian population. This is the first deep cancer-risk panel sequencing study with African-descendants in Brazil suggests inherited susceptibility to breast cancer results from germline damaging mutations in a group of genes. This finding underscores the need for comprehensive risk assessment and cancer panel genetic testing in this population.

Key words: breast cancer, Brazilians, BROCA panel, African-descendants

Introduction

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer among women worldwide¹. This non-communicable disease is the first or second leading cause of female death in many countries, with substantial epidemiological disparities between developed and developing countries. These differences are due to many intrinsic (e.g. genetic) and extrinsic (e.g. environment, life style) factors². Despite these differences, the “one-size-fits-all” screening and management approaches are usually applied, which are inconvenient in reducing breast cancer mortality and morbidity in different ethnic groups³.

This rising global burden of breast cancer in developing countries demands innovative interventions to accelerate progress in cancer control and prevention. Through genomic analysis of breast cancer predisposition genes, the burden of inherited breast cancer can be better estimated, so that clinical recommendations can be tailored for the mutation carriers and their families⁴.

With advances made in sequencing technologies, now it is possible to analyze numerous genomic regions simultaneously at reduced cost. Many multigene panels such as BROCA panel have been developed and applied successfully in many mutation screening studies in the United States and the Europe^{5,6}. However, there is a paucity of data in understudied populations like Latinos, Amerindians and African descendants.

Given the difference in breast cancer susceptibility among European and African populations^{7,8} and the high prevalence of aggressive breast cancer in Brazilian young women⁹, we sought to examine genetic susceptibility to breast cancer among women from the State of Bahia in the Northeast of Brazil, which has the highest population of African descendants in Latin America¹⁰.

Methods

Study population and eligibility

Between 2008 and 2015, 437 Brazilian women were recruited. Genomic DNA of each subject was extracted from peripheral blood. After strict DNA quality control, 330 were eligible for targeted panel sequencing: (a) 173 breast cancer patients (case group), (b) 119 unrelated women without personal history of any cancer (control group), and (c) 38 relatives of eighteen breast cancer probands (familial control group). The individuals from the case group were women with personal history of breast cancer with or without cancer family history. They were from private and public practices mainly from State of Bahia, Northeast of Brazil. All cases were referred to the cancer risk assessment program of the Serviço de Oncogenética do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia by their primary care physicians. Controls were cancer-free women who were doing routine lab tests in the Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular of Universidade Federal da Bahia. And the probands' relatives were individuals with (n = 33) and without (n = 5) personal history of cancer. All participants signed informed consent and data regarding their epidemiological and clinical profile were collected. The research protocol was approved by the Brazilian National Committee of Ethics in Research (CONEP, Comissão Nacional de Ética em Pesquisa) document #1.383.884.

Next-generation Sequencing

A total of 28 genes were analyzed in the BROCA panel as previously described⁵. Genes sequenced included established breast cancer genes of both high and moderate penetrance, and genes that have been suggested as candidate breast cancer genes, with varying levels of evidence: *ATM*, *ATR*, *BAP1*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK1*, *CHEK2*, *CTNNA1*, *FAM175A*, *FANCM*, *GEN1*, *MRE11A*, *NBN*, *PALB2*, *PPM1D*, *PTEN*, *RAD51B*, *RAD51C*, *RAD51D*, *RECQL*, *RINT1*, *SLX4*, *STK11*, *TP53* and *XRCC2*. Paired-end reads were mapped to the human genome reference hg19. Single nucleotide variants and small insertions and deletions were called using GATK¹¹, Pindel¹², and Breakdancer¹³, and copy number variants were detected using our method described previously¹⁴. Only mutations leading to loss of gene function or experimentally demonstrated to damage gene function were included in further analysis. In-frame deletions were included only if a critical domain was deleted, and splice or enhancer mutations were included only if functionality was tested experimentally (by us or others).

Clinical estimated risk

We analyzed the mean risk estimated by online BRCA Risk Calculators – Myriad Pro, The PENN II Risk Model, and BRCAPRO, based on epidemiological, clinical-pathological data and mutations in different groups: *BRCA1*, *BRCA2*, another breast cancer genes of the panel, and wild-type. We tested the performance of Gail model in this Brazilian cohort as well.

Statistical analysis

Descriptive and Multivariate analysis was performed on Epi Info™ software (CDC, Atlanta, GA, USA) and SPSS® (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Two-tailed Fisher's exact test or ANOVA One-way test was employed as appropriate. Odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated.

Results

African-descendants predominated among the 3 groups: 67.0% in the case group, 68.4% in the familial control group, and 90.7% in the control group. Over 90% of the study population was from the Northeast region of Brazil, particularly from the State of Bahia (Table 1, Supp Fig 1).

The mean age at breast cancer diagnosis of cases (<50yrs) and the age at study entry of cancer-free controls (~50yrs) was statistically different ($p = 5.6^{E-06}$, ANOVA One-way CI95%). The mean age at breast cancer diagnosis was not statistically different between self-reported African and non-African descendant patients (43.2 ± 11.1 years vs. 46 ± 11.6 years, $p = 0.104$). Though the proportion of patients diagnosed with breast cancer before 50 years old was higher among African-descendants than non-African descendants, 79.3% and 68.4%, respectively (Table1).

Occurrence of only breast cancer were mostly observed between the cases groups (>95%), but the occurrence of both breast and ovarian cancer, as well thyroid cancer was observed in low frequencies ($\leq 2.6\%$, Table 1). Invasive ductal carcinoma was frequent between breast cancer patients of both African and non-African self-reported ancestry, 81.9% and 79%. About 30% breast cancer patients were TNBC (Table 1-3). Familial history of cancer including breast cancer was more common among the cases groups regardless of the self-reported ancestry than the controls groups ($p = 0.012$, Table 1).

Thirty-eight pathogenic variants were found in thirty-seven breast cancer patients, one of those carried variants in two genes, *BARD1:c.1921C>T* and *BRCA2:c.3860delA*. Among the controls only one pathogenic variant was found, *RAD51C:c.264_265insA*. Pathogenic variant frequency differences between breast cancer and control groups was statistically significant ($p = 0.008$, OR = 27.8, Supp Table 1).

In the African-descendant breast cancer group, 13 pathogenic variants in *ATM*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *FAM175A*, *FANCM*, *PALB2* and *TP53* genes were found in 29 cases (25%). *BRCA1* and *BRCA2* were the genes frequently mutated in these women, 32% and 36% respectively (Table 2 and Figure 1). While among the non-African descendant breast cancer individuals, eight pathogenic variants in *BRCA1*, *BRIP1*, *NBN*, *PALB2* and *SLX4* were discovered in eight cases (14%). In this group, *BRCA1* and *BRIP1* were the most frequently mutated, 29% each (Table 2 and Figure 1). Clinical features and pathogenic variant annotation are shown in Table 2 and Supp Table 2.

Four recurrent variants were observed among the African-descendants breast cancer unrelated patients, *BRCA1:c.3331_3334delCAAG* (13.8%), *BRCA1:c.211A>G* (10.3%),

BRCA2:c.1389_1390delAG (6.9%) and *PALB2:c.1671_1674delTATT* (6.9%). No recurrent variant was found in non-African descendant breast cancer patients.

BRCA1 gene was the only mutated among TNBC patients (Supp Table 1). For the other tumor phenotypes, ER(+)/PR(+)/HER2(-) was the most frequent (36.4%) next to ER(-)/PR(-)/HER2(+) with 10.4% and ER(+)/PR(+)/HER2(+) with 7.5% (Table 3), but no significant difference was detected regarding the mutational profile and self-reported ancestry.

Breast cancer risk was measured by Myriad Risk, The PENN II Risk Model and BRCAPRO model, taking the mutation status into account. Risk was higher in breast cancer patients carrying germline pathogenic variants in *BRCA1* and/or *BRCA2* ($p < 0.05$ in all three models except *BRCA2* in PENN II, Supp Table 3). No statistical significance was observed in the Gail's model, regarding their mutational profile ($p > 0.05$, Supp Table 3). Compared to non-African descendant, African-descendant breast cancer patients had lower estimated mean risks, which varied between different tools ($p = 0.021$, Supp Table 4 and Figure 2).

Discussion

This was the first deep breast cancer germline mutation profiling in Northeastern women from Brazil, a population with scarcity data about its genetic susceptibility to breast cancer. Since previous studies showed that the Brazilian populations has some intricacies e.g. highly genetic admixture that varies according the regions of that country¹⁵. This study provides insightful view about the molecular susceptibility spectrum to breast cancer of the Brazilian African descendants which made-up most of the Northeast region, a population group that remains under studied.

Knowing that each population have a unique degree of admixtures and this is associated with the risk to genetic diseases¹⁶. Thus, it is important to obtain molecular data about all population specially the understudied groups, like developing populations groups in Latin America, Africa and Asia⁴. These data can help to improve the health of high-risk individuals, because it can provide tailored preventive and treatment measures.

For example, population structure differs in Brazil, with the highest frequency of African ancestry contribution found in the Northeast region compared with the South and Southeast of the country¹⁷⁻¹⁹. It can be expected that the diseases incidence and the mutation spectrum vary between different regions of Brazil, hence “one-size-fits-all” approach should not be applied in this highly heterogeneous population.

In the present study, 31 damaging mutations were found in 37 breast cancer patients and in one control, with *BRCA1* or *BRCA2* mutations contribute to the major risk.

Compared with the *BRCA1* and *BRCA2* mutational spectrum reported by the Brazilian Consortium of Hereditary Cancer²⁰, among 17 *BRCA1/2* pathogenic variants detected in our African-descendant breast cancer patients, nine (52.9%) were distinct (*BRCA1:c.825_826insGCCATGTGGA*, *BRCA2:c.738delT*, *BRCA2 c.1389_1390delAG*, *BRCA2:c.2111delC*, *BRCA2:c.3860delA*, *BRCA2:c.5904_5907delAGTC*, *BRCA2:c.6938-1G>C*, *BRCA2:c.7672G>T*, *BRCA2:c.9945delA*). It highlights the unique degree of admixture and susceptibility to BC of this Northeastern population. As observed in other studies *BRCA1* and *BRCA2* genes were the most altered in breast cancer patients from different regions in Brazil, here in the Northeast as well in the South and Southeast^{21, 22}. But among breast cancer patients in the South and Southeast the third most altered gene was *TP53*, and most patients harbored the variant *TP53: c.1010G>A*. In those regions of Brazil this genetic alteration has a known founder effect, while among the Northeast breast cancer patients only one was found carrying the *TP53 c.1010G>A* variant (Table 2).

Among the African-descendants women studied the other genes frequently mutated were *ATM*, *BRIP1* and *PALB2*, which is similar with the data of Churperk et al⁶ in African-American patients from USA, except for the *BRIP1* gene where no mutation was found. And among indigenous African breast cancer women were also observed that *BRCA1* and *BRCA2* genes were the most frequent mutated genes followed by *ATM*, *BARD1*, *TP53*, *BRIP1* and *PALB2*. But in that cohort any pathogenic variants were found in *FAM175A* and *FANCM* genes as were found in this Brazilian African-descendant BC patient cohort (Supp Table 1, Figure 1). These comparisons show that the frequencies of pathogenic variants vary from one population to another and even inside a population, especially in highly heterogeneous population like the Brazilian. Besides, it is also important to consider how useful is the multigene panel testing since many susceptibility genes play an important role in the inherited susceptibility to breast cancer. Though recurrent mutations have higher frequencies, it must be considered the occurrence of new variants²³.

In this Brazilian cohort, four recurrent variants among unrelated African-descendant breast cancer patients were discovered *BRCA1:c.3331_3334delCAAG* (13.8%), *BRCA1:c.211A>G* (10.3%), *BRCA2: c.1389_1390delAG* (6.9%) and *PALB2:c.1671_1674delTATT* (6.9%) (Table 2, Supp Table 1). The first two were previously described in Spanish descendants^{24,25} and in this Northeast Brazilian population²⁶. The third variant *BRCA2:c.1389_1390delAG* found in two unrelated patients was described in diverse populations in Central Europe²⁷⁻²⁹. The fourth recurrent variant *PALB2:c.1671_1674delTATT* remains uncharacterized and was documented only once in ClinVar (Variation ID: 410108). Thus, additional studies would be needed to evaluate the haplotype of these women harboring the *PALB2* c.1671_1674delTATT mutation and confirm the origin and founder effect.

Although the recurrent variants observed among Brazilian African-descendants BC patients are of European origin, it was also observed in these patients variants that are described and recurrent in African populations *ATM:c.7913G>A*^{30,31}, *BRCA1:c.815_824dupAGCCATGTGG*^{23,32}, *BRCA2:c.9945delA*³³ and *FAM175A:c.1011delA*³³.

That substantial difference in frequencies of African and European mutations in this studied population, which is known by significant contribution of African ancestry reported previously^{15,19}, may be due to founder effect since many factors influenced in the dynamics of the genetic flux of the Brazilian population as was showed elsewhere²⁶.

In addition, our data showed that predictors tools have different power in differentiating the *BRCA1* and *BRCA2* mutations carriers from the individuals carrying mutations in other breast cancer susceptibility genes and non-mutation carriers. The performance was better in African

descendants compared to their non-African counterparts -- one possible reason is that fewer mutations were found in the latter group. Larger studies are needed to validate our findings and further improve the risk prediction models in Brazilian populations with high degree of genetic admixture.

Given the paucity data about the susceptibility to breast cancer in Brazilian African-descendant population, our study first reveals that in the Northeastern of Brazil one in five breast cancer patients carry germline pathogenic variants in a breast cancer susceptibility gene. Hence, it urges the need of innovative approaches to screening all women, since resourceful and personalize methods are now available to prevent and treat breast cancer in this new genomic era.

Acknowledgements

We would like to thank the supported provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (G.E.S.F.), American Cancer Society (O.I.O., M.C.K.) and John and Editha Kapoor Charitable Foundation (O.I.O.), Susan G. Komen for the Cure (SAC110026 to O.I.O.), Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (I.L.O.N.) and Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão – FAPEX (R.M.). Y.Z is supported by Paul Calabresi Career Development Award for Clinical Oncology (K12 CA139160 to O.I.O.).

Author contributions

Conception and design: Mary-Claire King and Olufunmilayo I Olopade

Financial support: Gabriela Felix, Ivana Lucia de Oliveina Nascimento, Roberto Meyer, Mary-Claire King and Olufunmilayo I Olopade

Provision of study materials or patients: Gabriela ES Felix, Juliana Côrtes, Taisa Manuela Machado Lopes, Polyanna Carôzo, Irlânia Santos, Thaís Ferreira Bonfim, Betânia Pereira Toralles, Roberto Meyer, Kiyoko Abe-Sandes, Ivana Lucia de Oliveira Nascimento

Collection and assembly of data: Gabriela ES Felix, Yonglan Zheng, Jing Zhang, Polyanna Carôzo, Juliana Côrtes and Taisa Manuela Machado Lopes.

Data analysis and interpretation: Tom Walsh, Yonglan Zheng, Gabriela ES Felix

Manuscript writing: Gabriela ES Felix, Yonglan Zheng, Rodrigo Santa Cruz Guindalini, Ivana Lucia de Oliveina Nascimento, Kiyoko Abe-Sandes, Mary-Claire King and Olufunmilayo I Olopade

Final approval of manuscript: All authors

Competing interests

Reference

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* (2018). doi:10.3322/caac.21492
2. Servick, K. Breast cancer. Breast cancer: a world of differences. *Science* **343**, 1452–3 (2014).
3. Harford, J. B. Breast-cancer early detection in low-income and middle-income countries: do what you can versus one size fits all. *The Lancet. Oncology* **12**, 306–12 (2011).
4. Felix, G. E. S., Zheng, Y. & Olopade, O. I. Mutations in context: implications of BRCA testing in diverse populations. *Fam. Cancer* 1–13 (2017). doi:10.1007/s10689-017-0038-2
5. Walsh, T. *et al.* Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 12629–12633 (2010).
6. Churpek, J. E. *et al.* Inherited predisposition to breast cancer among African American women. *Breast Cancer Res. Treat.* (2014). doi:10.1007/s10549-014-3195-0
7. Huo, D. *et al.* Comparison of Breast Cancer Molecular Features and Survival by African and European Ancestry in The Cancer Genome Atlas. *JAMA Oncol.* (2017). doi:10.1001/jamaoncol.2017.0595
8. Zheng, Y. *et al.* Inherited Breast Cancer in Nigerian Women. *J. Clin. Oncol.* JCO2018783977 (2018). doi:10.1200/JCO.2018.78.3977
9. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016. Available at: http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tbregioes_consolidado.asp. (Acessado: 31º outubro 2017)
10. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Características étnico-raciais da população : um estudo das categorias de classificação de cor ou raça, 2008.*
11. DePristo, M. A. *et al.* A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nat. Genet.* **43**, 491–498 (2011).
12. Ye, K., Schulz, M. H., Long, Q., Apweiler, R. & Ning, Z. Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads. *Bioinformatics* **25**, 2865–2871 (2009).
13. Chen, K. *et al.* BreakDancer: an algorithm for high-resolution mapping of genomic structural variation. *Nat. Methods* **6**, 677–681 (2009).
14. Nord, A. S., Lee, M., King, M.-C. & Walsh, T. Accurate and exact CNV identification

- from targeted high-throughput sequence data. *BMC Genomics* **12**, 184 (2011).
15. Kehdy, F. S. G. *et al.* Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 8696–8701 (2015).
 16. Bittles, A. H. & Black, M. L. Consanguinity, human evolution, and complex diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 1779–1786 (2010).
 17. Lima-Costa, M. F. *et al.* Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). *Sci. Rep.* **5**, 9812 (2015).
 18. Magalhães da Silva, T. *et al.* The correlation between ancestry and color in two cities of Northeast Brazil with contrasting ethnic compositions. *Eur. J. Hum. Genet.* **23**, 984–9 (2015).
 19. Felix, G. E. S. *et al.* Ancestry informative markers and complete blood count parameters in Brazilian blood donors. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **32**, 282–285 (2010).
 20. Palmero, E. I. *et al.* The germline mutational landscape of BRCA1 and BRCA2 in Brazil. *Sci. Rep.* **8**, 9188 (2018).
 21. Silva, F. C. *et al.* Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. *BMC Med. Genet.* **15**, 55 (2014).
 22. Fernandes, G. C. *et al.* Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. *Oncotarget* **7**, 80465–80481 (2016).
 23. Zhang, J. *et al.* Recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients of African ancestry. *Breast Cancer Res. Treat.* **134**, 889–94 (2012).
 24. Blay, P. *et al.* Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast and ovarian cancer families from Asturias (Northern Spain). *BMC Cancer* **13**, 243 (2013).
 25. Vega, A. *et al.* The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. *Hum. Mutat.* **17**, 520–1 (2001).
 26. Felix, G. E. *et al.* Germline mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population. *Hum. Genome Var.* **1**, 14012 (2014).
 27. Foretova, L. *et al.* BRCA1 and BRCA2 mutations in women with familial or early-onset breast/ovarian cancer in the Czech Republic. *Hum. Mutat.* **23**, 397–398 (2004).
 28. Goelen, G., Teugels, E., Bonduelle, M., Neyns, B. & De Grève, J. High frequency of BRCA1/2 germline mutations in 42 Belgian families with a small number of symptomatic subjects. *J. Med. Genet.* **36**, 304–8 (1999).

29. Machackova, E. *et al.* Spectrum and characterisation of BRCA1 and BRCA2 deleterious mutations in high-risk Czech patients with breast and/or ovarian cancer. *BMC Cancer* **8**, 140 (2008).
30. Coutinho, G. *et al.* Five haplotypes account for fifty-five percent of ATM mutations in Brazilian patients with ataxia telangiectasia: Seven new mutations. *Am. J. Med. Genet.* **126A**, 33–40 (2004).
31. Demuth, I. *et al.* New mutations in the ATM gene and clinical data of 25 AT patients. *Neurogenetics* **12**, 273–282 (2011).
32. Hall, M. J. *et al.* BRCA1 and BRCA2 mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer. *Cancer* **115**, 2222–33 (2009).
33. Lek, M. *et al.* Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* **536**, 285–291 (2016).

Table 1. Baseline characteristics of the Brazilian cohort according self-reported African ancestry.

| Characteristic | | Case group (173) | | Familial control group (38) | | Control group (119) | | P value* | |
|-----------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|-----------|---|
| | | African- descendants (116) | Non-African- descendants (57) | African- descendants (26) | Non-African- descendants (12) | African- descendants (108) | Non-African- descendants (11) | | |
| Mean age ± SD yrs | | 43.2 ± 11.1 | 46 ± 11.6 | 48.5 ± 20.9 | 45 ± 16.06 | 53.0 ± 13.3 | 43.8 ± 13.9 | 5.6E-06** | |
| Age | ≤50 yrs | 92 (79.3%) | 39 (68.4%) | 15 (57.7%) | 9 (75%) | 43 (39.8%) | 7 (63.6%) | 0.038 | |
| | >50yrs | 24 (20.7%) | 18 (31.6%) | 11 (42.3%) | 3 (25%) | 76 (70.37%) | 4 (36.4%) | 0.000 | |
| Type of Cancer | Only breast | 113 (97.4%) | 54 (94.7%) | 3 (11.5%) | 1 (8.3%) | - | - | - | |
| | Breast and Ovarian | 3 (2.6%) | 1 (1.7%) | - | - | - | - | - | |
| | Breast, Ovarian and Thyroid | - | 1 (1.7%) | - | - | - | - | - | |
| | Breast and Thyroid | - | 1 (1.7%) | - | - | - | - | - | |
| | Ovarian | - | - | 1 (3.8%) | - | - | - | - | |
| | Any | - | - | 22 (84.6%) | 11 (91.7%) | 108 (100%) | 11(100%) | - | |
| Tumor Histology/ IHC phenotype | IDC | TNBC | 16 (13.8%) | 9 (15.8%) | 1 (3.8%) | - | - | - | - |
| | | Other | 79 (68.1%) | 36 (63.2%) | - | - | - | - | - |
| | Others | TNBC | 1 (0.9%) | 1 (1.7%) | - | - | - | - | - |
| | | Other | 20 (17.2%) | 11(19.3%) | 3 (11.5%) | 1 (8.3%) | - | - | - |
| Place of Birth* | Salvador (Capital of Bahia) | 43 (37.1%) | 15 (26.3%) | 2 (7.7%) | 2 (16.7%) | 45 (41.7%) | 2 (18.2%) | 0.001 | |
| | Countryside of Bahia | 60 (51.7%) | 25 (43.9%) | 23 (88.5%) | 8 (66.7%) | 57 (52.8%) | 9 (81.9%) | 0.060 | |
| | Other States in NE Brazil | 9 (7.8%) | 8 (14.0%) | - | - | 4 (3.7%) | 0 (0%) | - | |
| | Other States | 3 (2.6%) | 6 (10.4%) | - | - | 1 (0.9%) | 0 (0%) | - | |
| | Missing | 1 (0.9%) | 3 (5.3%) | 2 (7.7%) | 2 (16.7%) | 1 (0.9%) | 0 (0%) | - | |
| Cancer family history | Yes | 77 (66.4%) | 42 (73.7%) | 26 (100%) | 12 (100%) | 41 (38%) | 6 (54.5%) | 0.012 | |
| | No | 39 (33.6%) | 15 (26.3%) | - | - | 67 (62.0%) | 5 (45.4%) | - | |

Note: IDC = invasive ductal carcinoma, TNBC = triple negative breast cancer (ER-,PR-,HER2-), NE = northeast of Brazil, Familial history of any cancer including breast cancer, TNBC =triple negative breast cancer, IHC= immunohistochemistry. *Fisher's exact test.

**One-Way ANOVA

Table 2. Tumor characteristic of the high-risk breast cancer patients studied with germline pathogenic variants in the susceptibility genes studied.

| Ind. ID# | Variant | Type of cancer | Age at diagnostic | Self-reported race/color | FH | Histology | Tumor stage | | IHQ | | |
|----------|------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------|-----|---|-------------|-----------|-----|-----|------|
| | | | | | | | Grade | TNM | ER | PR | HER2 |
| ACM076 | NBN c.156_157delTT | Breast | 56 | Missing | No | IDC | | T4cN3M1 | Pos | Pos | Pos |
| ACM088 | BRIP1 c.1741C>T | Breast | 40 | White | No | IDC | IV | T2N1M0 | Pos | Pos | . |
| CM003 | BRCA2 c.2108delC | Breast | 42 | Missing | Yes | IDC | III | T2N0M0 | Pos | Neg | Neg |
| CM023 | BRCA1 c.3331_3334delCAAG | Breast | 36 | African-descendant | Yes | IDC | I | T1N0M0 | Pos | Pos | Neg |
| CM033 | BRCA1 c.1115G>A | Breast and Ovarian | 36 | African-descendant | Yes | IDC + Lobular carcinoma (Breast); Serous adenocarcinoma (Ovarian) | IIB | T2N1M0 | Pos | Pos | Neg |
| CM048 | BRCA1 c.211A>G | Breast | 39 | African-descendant | Yes | Medullary carcinoma of the breast | - | - | Neg | Neg | Pos |
| CM130 | BRCA1 c.825_826insGCCATGTGGA | Breast and Thyroid | 64 | White | Yes | IDC | - | - | Neg | Neg | Neg |
| CM179 | BRIP1 c.2392C>T | Breast and Ovarian | 42 | African-descendant | Yes | Lobular carcinoma | - | - | Pos | Pos | Neg |
| CM211 | SLX4 c.4828delT | Breast | 28 | White | Yes | DCIS | III | TisN0M0 | Neg | Neg | Pos |
| CM223 | BRCA1 c.3331_3334delCAAG | Breast | 28 | African-descendant | Yes | IDC | III | T2N0M1 | Neg | Neg | Neg |
| CM242 | BRCA1 c.211A>G | Breast | 41 | African-descendant | Yes | Medullary carcinoma of the breast | - | - | Neg | Neg | Neg |
| CM247 | BRCA2 c.5904_5907delAGTC | Breast | 34 | African-descendant | Yes | IDC | II | T2N1M0 | Pos | Neg | Neg |
| CM252 | BRCA1 c.211A>G | Breast | 52 | African-descendant | Yes | IDC | Ila | T2N0M0 | Neg | Neg | Neg |
| CM266 | PALB2 c.1671_1674delTATT | Breast | 35 | African-descendant | Yes | IDC | - | - | Pos | Pos | Neg |
| CM277 | PALB2 c.1671_1674delTATT | Breast | 49 | African-descendant | No | IDC | II | - | Pos | Pos | Neg |
| CM278 | BRIP1 c.2097+1G>C | Breast | 52 | White | Yes | IDC | II | pT2pN0pMx | Neg | Neg | Pos |
| CM293 | PALB2 c.355delC | Breast | 49 | White | Yes | IDC | - | - | Pos | Pos | . |

| Ind. ID# | Variant | Type of cancer | Age at diagnostic | Self-reported race/color | FH | Histology | Tumor stage | | IHQ | | |
|----------|-----------------------------------|----------------|-------------------|--------------------------|-----|-----------|-------------|---------|-----|-----|------|
| | | | | | | | Grade | TNM | ER | PR | HER2 |
| CM297 | ATM c.3801delG | Breast | 38 | African-descendant | Yes | IDC | - | - | Pos | Pos | Pos |
| CM309 | FANCM c.5766_5769delGACT | Breast | 38 | African-descendant | Yes | IDC | - | - | Pos | Pos | Neg |
| CM318 | BRCA2 c.7672G>T | Breast | 27 | African-descendant | Yes | DCIS | IV | T3N2M1 | Pos | Pos | Pos |
| CM322 | FAM175A c.1011delA | Breast | 43 | African-descendant | No | IDC | III | pT4pN3 | Pos | Neg | Pos |
| CM362 | BRCA2 c.1389_1390delAG | Breast | 47 | African-descendant | No | IDC | II | - | Pos | Pos | Neg |
| CM385 | TP53 c.1010G>A | Breast | 28 | African-descendant | Yes | IDC | II | T1N1M0 | Pos | Pos | Neg |
| CM389 | BRCA1 c.1327A>T | Breast | 34 | African-descendant | Yes | IDC | - | - | Neg | Neg | Neg |
| CM403 | BRCA2 c.8488-1G>A | Breast | 34 | African-descendant | Yes | IDC | II | T1N0M0 | Pos | Neg | Neg |
| CM420 | BRCA1 c.3331_3334delCAAG | Breast | 38 | African-descendant | Yes | IDC | II | T2N0M0 | . | . | . |
| CM440 | BRCA2 c.736delT | Breast | 42 | African-descendant | Yes | IDC | IV | T4cN2MX | Pos | Pos | Pos |
| CM512 | ATM c.7913G>A | Breast | 38 | African-descendant | Yes | IDC | II | T1N1M0 | Pos | Pos | Neg |
| CM243 | BRCA1 c.470_471delCT | Breast | 60 | White | Yes | IDC | - | - | Neg | Neg | Neg |
| CM536 | BRCA2 c.1389delAG | Breast | 46 | African-descendant | Yes | IDC | II | T1N0M0 | Neg | Pos | Neg |
| CM550 | BRCA1 c.3331_3334delCAAG | Breast | 26 | African-descendant | No | IDC | II | pT3pN3a | Neg | Neg | Pos |
| CM564 | BRCA1 c.5251C>T | Breast | 40 | African-descendant | No | IDC | II | - | Neg | Neg | Neg |
| CM569 | BRCA2 c.9945delA | Breast | 35 | African-descendant | Yes | IDC | III | - | . | . | . |
| CM575 | BRCA2 c.3860delA, BARD1 c.1921C>T | Breast | 41 | African-descendant | Yes | IDC | - | - | . | . | . |
| CM581 | BRCA2 c.6938-1G>C | Breast | 43 | African-descendant | Yes | IDC | II | T2N0M0 | Pos | Pos | Neg |

| Ind. ID# | Variant | Type of cancer | Age at diagnostic | Self-reported race/color | FH | Histology | Tumor stage | | IHQ | | |
|----------|-------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------|-----|---|-----------------------------|----------|-----|----|------|
| | | | | | | | Grade | TNM | ER | PR | HER2 |
| CM582 | BRCA2 c.2T>G | Breast and Ovarian | 49 | African-descendant | No | IDC (Breast); Serous papillary cystadenocarcinoma (Ovarian) | Ib (breast) / III (ovarian) | T2 N0 M0 | . | . | . |
| CM590 | ATM c.8264_8268delATAAG | Breast | 41 | African-descendant | Yes | - | - | - | . | . | . |

Abbreviations: Ind = Individual, IDC = Invasive Ductal Carcinoma, DCIS = Ductal carcinoma in situ, Pos = positive, Neg = negative, ER = estrogen receptor, PR = progesterone receptor, HER2 = human epidermal growth factor receptor 2, and missing or unknown data (-), FH = familial history of any cancer including breast cancer.

Table 3. Genotype and breast tumor phenotype by immunohistochemistry according to self-reported African ancestry.

| Breast cancer cases (n = 173) | Gene mutated | Tumor phenotype by IHC | | | | | | Total n (%) |
|--|--------------------|------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------|------------------|--------------------|
| | | ER-, PR-, HER2- n | ER+, PR+, HER2- n | ER+, PR+, HER2+ n | ER-, PR-, HER2+ n | Others n | Missing n | |
| African- descendants (n = 116) | <i>BRCA1</i> | 5 | 2 | 0 | 2 | 0 | 1 | 10 (5.8%) |
| | <i>BRCA2</i> | 0 | 2 | 1 | 0 | 4 | 3 | 10 (5.8%) |
| | <i>Other genes</i> | 0 | 6 | 0 | 0 | 2 | 1 | 9 (7.8%) |
| | <i>Wild type</i> | 12 | 35 | 1 | 10 | 24 | 5 | 87 (75%) |
| | <i>Total</i> | 17 | 45 | 1 | 12 | 30 | 10 | 116 (100%) |
| Non-African descendants (n = 57) | <i>BRCA1</i> | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (1.1%) |
| | <i>BRCA2</i> | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0%) |
| | <i>Other genes</i> | 0 | 0 | 1 | 2 | 2 | 0 | 5 (2.89%) |
| | <i>Wild type</i> | 8 | 18 | 10 | 4 | 3 | 6 | 49 (28.32%) |
| Total | | 27 (15.6%) | 63 (36.4%) | 13 (7.5%) | 18 (10.4%) | 36 (20.8%) | 16 (9.2%) | 173 (100%) |

Abbreviations: Immunohistochemistry (IHC) staining, ER = estrogen receptor, PR = progesterone receptor, HER2 = Human Epidermal growth factor Receptor 2, missing = incomplete data and/or test not realized.

Supp Table 1. Description of genes and variants found with BROCA panel according the groups analyzed.

| Gene | Breast Cancer Cases (n= 173) | | Breast Cancer Cases' relatives (n= 38) | | Control women (n= 119) | |
|----------------|---|---|---|---|---------------------------------|---------------------------------------|
| | African-descendants (n =116) | Non-African descendants (n= 57) | African-descendants (n= 26) | Non-African descendants (n =12) | African-descendants (n =108) | Non-African descendants (n =11) |
| ATM | c.3802delG (1), c.7913G>A (1), c.8264_8268delATAAG (1) | - | - | - | - | - |
| BARD1 | c.1921C>T (1)* | - | - | - | - | - |
| BRCA1 | c.3331_3334delCAAG (4), c.211A>G (3), c.1327A>T (1), c.5251C>T (1), c.1115G>A (1) | c.825_826insGCCATGTGGA (1), c.470_471delCT (1) | c.3331_3334delCAAG (1), c.211A>G (1) | c.3331_3334delCAAG (1), c.211A>G (1) | - | - |
| BRCA2 | c.2T>G (1), c.5904_5907delAGTC (1), c.7672G>T (1), c.1389_1390delAG (2), c.8488- 1G>A (1), c.738delT (1), c.9945delA(1), c.6938-1G>C (1), c.3860delA (1)*, c.2111delC (1) | | c.2111delC (10) | | - | - |
| BRIP1 | c.2392C>T (1) | c.1741C>T (1), c.2097+1G>C (1) | - | - | - | - |
| FAM175A | c.1011delA (1) | - | - | - | - | - |
| FANCM | c.5766_5769delGACT (1) | - | - | - | - | - |
| NBN | | c.156_157delTT (1) | - | - | - | - |
| PALB2 | c.1671_1674delTATT (2) | c.355delC (1) | - | c.355delC (1) | - | - |
| RAD51C | - | - | - | - | c.264_265insA (1) | - |
| SLX4 | - | c.4828delT (1) | - | - | - | - |
| TP53 | c.1010G>A (1) | | c.1010G>A (1) | - | - | - |
| Total | 29 (25%) | 8 (14.0%) | 13 (50%) | 3 (25%) | 1 (0.9%) | 0 (0%) |

Note: *individual has two mutations, one in BRCA2 gene and another in BARD1 gene.

Supp Table 2. Description of the variants found on high-risk breast cancer women from Northeast of Brazil.

| Gene | Transcript | Coding impact | HGVS c.DNA level | HGVS Protein level | GERP NR | GERP RS | ClinVar ID | dbSNP | ExAC max | ExAC popn |
|--------------|-------------|---------------|----------------------------|-----------------------------|------------------|--------------------------------------|------------|-------------|----------|-----------|
| <i>ATM</i> | NM_000051.3 | Frameshift | c.3802delG | | 5.6799 | 1.3500 | 127374 | rs587779834 | 0.0001 | AMR |
| <i>ATM</i> | NM_000051.3 | Nonsense | c.7913G>A | W2638* (p.Trp2638*) | 5.09 | 5.09 | 141233 | rs377349459 | 0.0001 | AFR |
| <i>ATM</i> | NM_000051.3 | Frameshift | c.8264_8268delATAAG | Tyr2755Cysfs (p.Y2755fs) | 5.5599 | -6.5100 4.4299 5.5599 | 181865 | rs730881294 | 0.0001 | AMR |
| <i>BARD1</i> | NM_000465.3 | Nonsense | c.1921C>T | R641* (p.Arg641*) | 5.77 | 3.89 | 141702 | rs587781948 | 0.0000 | NFE |
| <i>BRCA1</i> | NM_007294.3 | Nonsense | c.5251C>T | R1751* (p.Arg1751*) | 5.07 | 1.58 | 55480 | rs80357123 | - | - |
| <i>BRCA1</i> | NM_007294.3 | Frameshift | c.3331_3334delCAAG | | 4.6500 5.1700 | 1.4700 2.2899 1.5299 4.1500 | 37523 | rs80357701 | - | - |
| <i>BRCA1</i> | NM_007294.3 | Nonsense | c.1327A>T | K443* (p.Lys443*) | 4 | -0.4099 | 91545 | rs398122630 | - | - |
| <i>BRCA1</i> | NM_007294.3 | Nonsense | c.1115G>A | W372* (p.Trp372*) | 5 | 4.85 | 54134 | rs397508838 | 0.0000 | NFE |
| <i>BRCA1</i> | NM_007294.3 | Frameshift | c.825_826insGCCATGTGG A | | 4.9499 | 3.96 | - | . | - | - |
| <i>BRCA1</i> | NM_007294.3 | Frameshift | c.470_471delCT | | 5.25 | 3.0499 3.0799 | 37608 | rs80357887 | - | - |
| <i>BRCA1</i> | NM_007294.3 | Missense | c.211A>G | R71G (p.Arg71Gly) | 4.64 | 4.64 | 17693 | rs80357382 | - | - |
| <i>BRCA2</i> | NM_000059.3 | Missense | c.2T>G | M1R (p.Met1Arg) | 5.27 | 5.27 | 51385 | rs80358547 | 0.0001 | AMR |
| <i>BRCA2</i> | NM_000059.3 | Frameshift | c.738delT | | 4.55 | -2.9900 | - | . | - | - |
| <i>BRCA2</i> | NM_000059.3 | Frameshift | c.1389_1390delIAG | | 5.3 | 0.1829 4.0799 | 51113 | rs80359283 | - | - |
| <i>BRCA2</i> | NM_000059.3 | Frameshift | c.2111delC | | 4.71 | 1.96 | - | . | - | - |
| <i>BRCA2</i> | NM_000059.3 | Frameshift | c.3860delA | | 5.71 | -2.1600 | 51545 | rs80359406 | - | - |

| Gene | Transcript | Coding impact | HGVS c.DNA level | HGVS Protein level | GERP NR | GERP RS | ClinVar ID | dbSNP | ExAC max | ExAC popn |
|----------------|-------------|---------------|--------------------|------------------------|------------------|---------------------------------------|------------|-------------|----------|-----------|
| BRCA2 | NM_000059.3 | Frameshift | c.5904_5907delAGTC | | 4.9600 5.3600 | 0.9419 1.0199 0.2720 -3.4200 | 51963 | rs80359547 | - | - |
| BRCA2 | NM_000059.3 | Splice | c.6938-1G>C | | 5.03 | 5.03 | - | . | - | - |
| BRCA2 | NM_000059.3 | Nonsense | c.7672G>T | E2558* (p.Glu2558*) | 5.15 | 5.15 | - | . | - | - |
| BRCA2 | NM_000059.3 | Splice | c.8488-1G>A | | 5.0999 | 5.0999 | 38164 | rs397507404 | - | - |
| BRCA2 | NM_000059.3 | Frameshift | c.9945delA | | 5.06 | 1.13 | 96890 | rs778530487 | 0.0003 | AFR |
| BRIP1 | NM_032043.2 | Nonsense | c.2392C>T | R798* (p.Arg798*) | 5.63 | 3.5099 | 4738 | rs137852986 | 0.0002 | NFE |
| BRIP1 | NM_032043.2 | Splice | c.2097+1G>C | | 5.2899 | 5.2899 | 186424 | rs786202941 | - | - |
| BRIP1 | NM_032043.2 | Nonsense | c.1741C>T | R581* (p.Arg581*) | 5.25 | 1.6399 | - | rs780020495 | 0.0001 | EAS |
| CHEK2 | NM_007194.3 | Missense | c.1141A>G (VUS) | M381V (p.Met381Val) | 5.8899 | 5.8899 | 140959 | rs375130261 | 0.0001 | NFE |
| CHEK2 | NM_007194.3 | Missense | c.962A>C (VUS) | E321A (p.Glu321Ala) | 5.5399 | 5.5399 | 232111 | rs374395284 | 0.0000 | NFE |
| CHEK2 | NM_007194.3 | Splice | c.592+3A>T (VUS) | | 5.8699 | 2.5699 | 142956 | rs587782849 | 0.0001 | SAS |
| CHEK2 | NM_007194.3 | Missense | c.170C>G (VUS) | S57C (p.Ser57Cys) | 5.42 | 5.42 | - | . | - | - |
| FAM175A | NM_139076.2 | Frameshift | c.1011delA | | 5.61 | 1.48 | - | rs764429803 | 0.0008 | AFR |
| FANCM | NM_020937.3 | Frameshift | c.5766_5769delGACT | | 5.84 | 1.5800 2.0199 4.7800 5.8400 | - | . | - | - |
| NBN | NM_002485.4 | Frameshift | c.156_157delTT | | 6.0399 | 2.3199 -2.0999 | - | rs767454740 | 0.0000 | NFE |
| PALB2 | NM_024675.3 | Frameshift | c.1671_1674delTATT | | 4.6799 4.9400 | 1.1399 1.2400 -5.6100 1.4500 | - | . | - | - |
| PALB2 | NM_024675.3 | Frameshift | c.355delC | | 5.7699 | 3.68 | - | . | - | - |
| PTEN | NM_000314.6 | Missense | c.421C>T (VUS) | H141Y (p.His141Tyr) | 5.2199 | 5.22 | - | . | - | - |

| Gene | Transcript | Coding impact | HGVS c.DNA level | HGVS Protein level | GERP NR | GERP RS | ClinVar ID | dbSNP | ExAC max | ExAC popn |
|---------------|-------------|---------------|------------------|------------------------|---------|---------|------------|-------------|----------|-----------|
| RAD51C | NM_058216.2 | Frameshift | c.264_265insA | | 5.65 | 5.65 | - | . | - | - |
| SLX4 | NM_032444.2 | Frameshift | c.4828delT | | 5.6399 | 5.64 | - | . | - | - |
| TP53 | NM_000546.5 | Missense | c.1010G>A | R337H (p.Arg337His) | 5.43 | 3.45 | 12379 | rs121912664 | 0.0001 | AMR |

Abbreviation: AFR = African population, AMR = American population, EAS = East Asian population, NFE = European (Non-Finnish), SAS = South Asian, ExAC max = maximum frequency observed in the ExAC database, ExAC popn = population where the variant has already been described. The Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP) is a conservative score that calculates the quantification of substitution deficits between multiple alignments of orthologous (genes) of the genome of 34 mammals. This score ranges from -12.3 to 6.17, with 6.17 being the most conserved. The GERP NR corresponds to the neutral rate (NR) of the genomic site. It is a measure used to calculate an alternative conservation measure the GERP RS score, which is the ratio between NR / RS. The rejected substitution (RS) quantifies evolutionary constraint at the specific position by estimating the actual number of substitutions at that location minus the expected number assuming neutrality (Adapted from the VARSOME database).

Supp Table 3. Mutational and disease risk estimated according mutated status by BROCA panel.

| Disease and risk predictor tool | Mean risk by gene altered | | | | Total | F | P-value |
|---|---------------------------|-------|---------------|-----------|-------|-------|---------|
| | BRCA1 | BRCA2 | Other BC gene | Wild type | | | |
| Gail's 5-year breast cancer risk | 2,5 | 1,6 | 1,6 | 2,4 | 2,2 | 1,471 | 0,225 |
| Gail's 5-year breast cancer risk for average woman | 0,7 | 0,7 | 0,7 | 1,0 | 1,0 | 1,591 | 0,194 |
| Gail's lifetime breast cancer risk | 24,1 | 18,9 | 19,3 | 20,7 | 20,6 | 0,382 | 0,766 |
| Gail's lifetime breast cancer risk for average woman | 8,6 | 8,7 | 8,8 | 9,0 | 8,9 | 0,121 | 0,948 |
| Myriad risk | 19,2 | 16,4 | 11,2 | 10,5 | 11,7 | 3,557 | 0,016* |
| PENN BRCA1 individual | 14,0 | 13,4 | 6,5 | 8,2 | 8,9 | 2,896 | 0,038* |
| PENN BRCA1 familial | 18,6 | 14,3 | 8,3 | 9,7 | 10,7 | 2,73 | 0,047* |
| PENN BRCA2 individual | 8,7 | 10,5 | 7,0 | 8,0 | 8,2 | 0,801 | 0,495 |
| PENN BRCA2 familial | 10,1 | 7,2 | 8,4 | 9,2 | 9,1 | 0,699 | 0,555 |
| BRCAPRO BRCA1 | 47,9 | 14,6 | 10,8 | 11,7 | 14,9 | 9,209 | 0* |
| BRCAPRO BRCA2 | 8,5 | 18,1 | 7,5 | 6,6 | 7,8 | 4,313 | 0,006* |

Supp Table 4. Mean mutation risk estimated according mutated gene by BROCA panel and self-reported African ancestry.

| Breast cancer group | Mutated status by BROCA panel | Risk estimator tool | | | | | One-Way ANOVA P value |
|-------------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
| | | <i>Myriad Risk</i> | PENN <i>BRCA1</i> | PENN <i>BRCA2</i> | BRCAPRO <i>BRCA1</i> | BRCAPRO <i>BRCA2</i> | |
| African-descendants | <i>BRCA1/BRCA2 (n=20)</i> | 18.05 | 27.6 | 14.85 | 28.15 | 10.02 | 0.021 |
| | Other genes (n= 9) | 11.6 | 13.11 | 10.7 | 13.9 | 7.8 | 0.801 |
| | Wild type (n = 87) | 9.31 | 11.05 | 12.2 | 10.72 | 6.14 | 0.036 |
| Non-African descendants | <i>BRCA1/BRCA2 (n=3)</i> | 16.30 | 32 | 32.7 | 50.83 | 34.20 | 0.786 |
| | Other genes (n=5) | 9.37 | 6 | 12.8 | 4.8 | 6.27 | 0.829 |
| | Wild type (n = 49) | 12.42 | 16.6 | 14 | 13.17 | 7.56 | 0.165 |

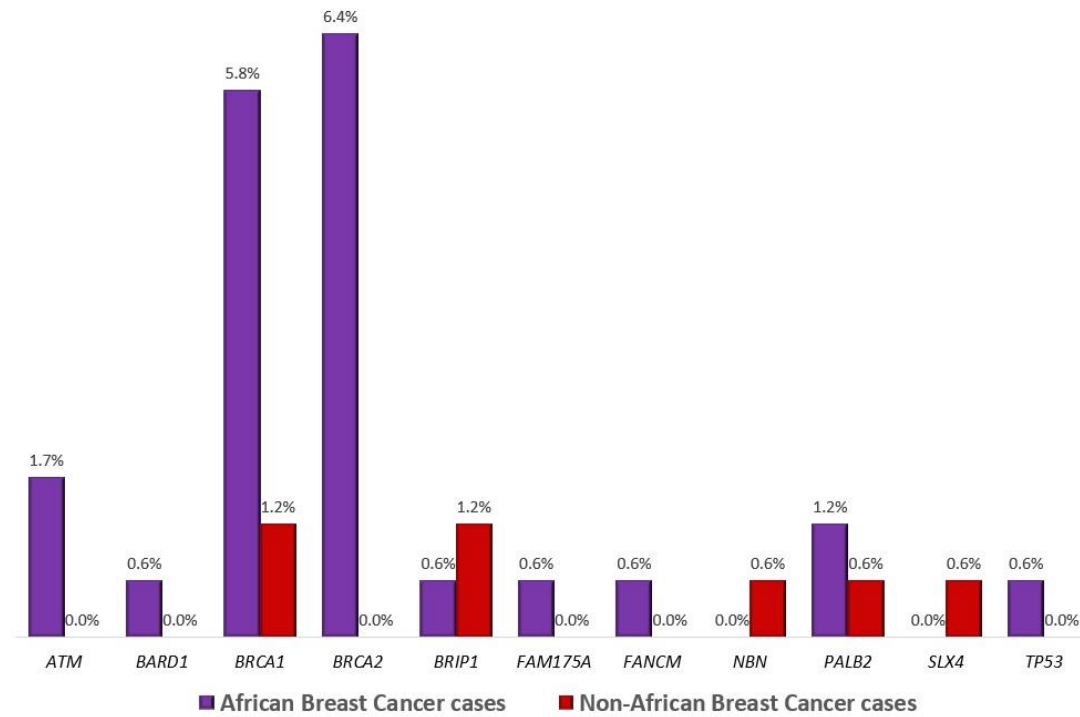


Figure 1. Frequency of the genes altered between African-descendant and non-African descendants breast cancer patients.

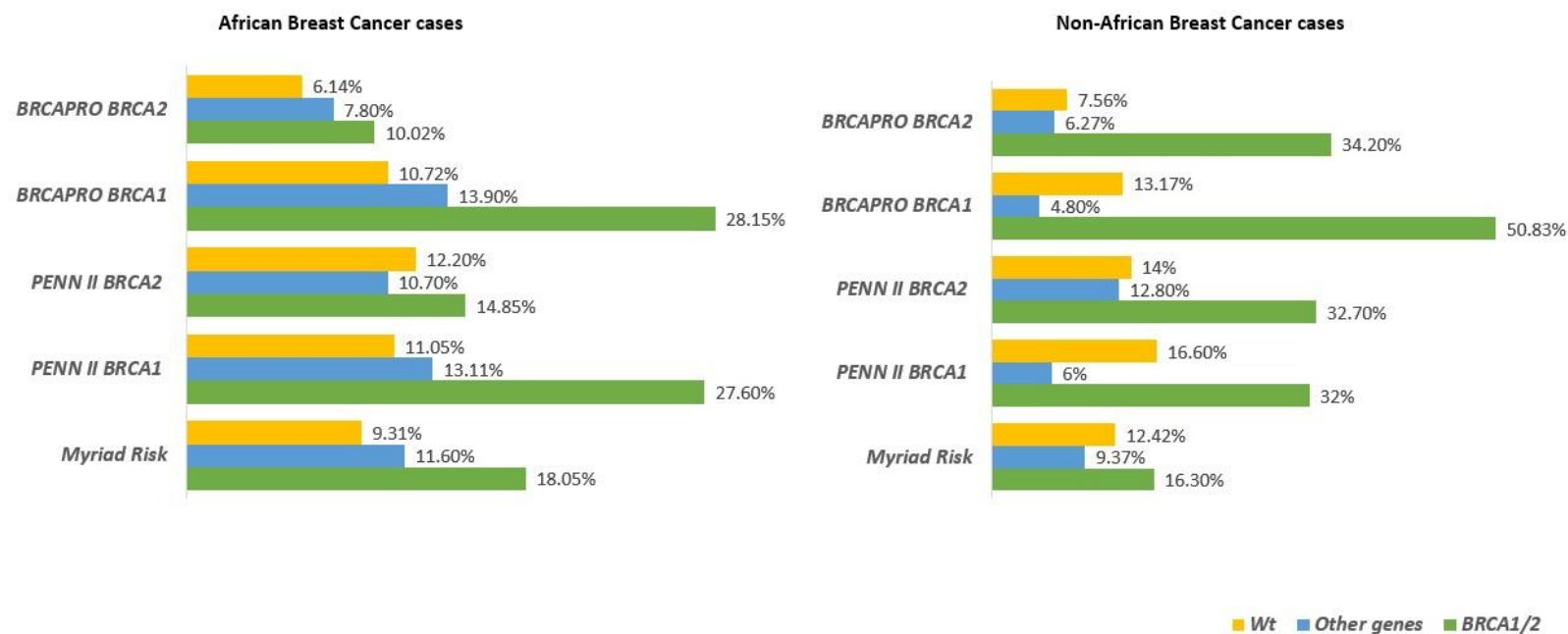


Figure 2. Mean mutation risk estimated according self-reported African ancestry and gene altered in BROCA panel.

Note: In green and blue are depicted the mean risk estimated of individuals carrying germline alterations in BRCA1/2 and other genes, respectively. While the yellow represents individuals with no germline alterations detected in the panel.



Supp Figure 1. Distribution of the Brazilian cohort according the place of origin (birth).

6. ARTIGO DE REVISÃO

Também foi redigido um artigo de revisão sobre o tema da tese de doutorado – o uso do teste genético e seu impacto na saúde (pública), destacando os grupos populacionais minoritários pouco estudados, como afrodescendentes, latino-americanos e asiático. Como o mesmo já se encontra publicado e por questões de direitos autorais e *reprints* cedidos para a revista *Familial Cancer*, apenas citaremos o presente artigo, o qual está anexado (ANEXO II).

- FELIX, G. E. S.; ZHENG, Y.; OLOPADE, O. I. Mutations in context: implications of BRCA testing in diverse populations. **Familial Cancer**, [s. l.], p. 1–13, 2017. a. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10689-017-0038-2>>. Acesso em: 31 out. 2017.

7. CONCLUSÕES

- Entre as mulheres da Bahia com alto risco para câncer de mama os genes *BRCA1* e *BRCA2*, mas outros genes de susceptibilidade como *ATM*, *PALB2*, *BRIP1*, *BRCA2/BARD1*, *FAM175A*, *FANCM*, *NBN*, *SLX4* e *TP53* também estão alterados em menor frequência;
- A maioria das variantes detectadas eram recorrentes e/ou fundadoras, mas percentual significativo de variantes novas do tipo *frameshift* and *nonsense* também foram observadas;
- Entre as mulheres com história pessoal e familiar de câncer de mama foi detectado mais alterações em genes de susceptibilidade do que entre as mulheres com apenas história pessoal de câncer de mama;
- No câncer de mama de fenótipo triplo negativo apenas o gene *BRCA1* estava alterado, e a maioria das mulheres com esse fenótipo tumoral se autodenomiram como afrodescendentes;
- Os três preditores de risco mutacional nos genes *BRCA1* e *BRCA2* avaliados – Myriad Risk, The PENN II e BRCAPRO – apresentaram maior risco de estimativa entre as mulheres nas quais foram detectadas alterações nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*. Contudo entre as mulheres afrodescendentes o risco estimado foi menor do que as mulheres não-afrodescendentes;
- As mulheres do presente estudo apresentaram maior percentuais de risco Gail de desenvolver câncer de mama ao longo da vida e em cinco anos. Contudo não houve diferença significativa de acordo o perfil mutacional da mulher, se *BRCA1* ou *BRCA2*, outro gene de susceptibilidade ou se perfil não alterado no painel BROCA.

REFERÊNCIAS

ABE-SANDES, K. et al. Ancestralidade Genômica, nível socioeconômico e vulnerabilidade ao HIV/aids na Bahia, Brasil. **Saúde e Sociedade**, v. 19, p. 75–84, 2010.

ABE-SANDES, K.; SILVA, W. A.; ZAGO, M. A. Heterogeneity of the Y chromosome in Afro-Brazilian populations. **Human Biology**, v. 76, n. 1, p. 77–86, 2004.

ALEMAR, B. et al. Prevalence of Hispanic BRCA1 and BRCA2 mutations among hereditary breast and ovarian cancer patients from Brazil reveals differences among Latin American populations. **Cancer Genetics**, v. 209, n. 9, p. 417–422, 2016.

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

ALVES-SILVA, J. et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 2, p. 444–61, 2000.

AMATO, R. et al. Signs of selective pressure on genetic variants affecting human height. **PloS one**, v. 6, n. 11, p. e27588, 2011.

APOSTOLOU, P.; FOSTIRA, F. Hereditary breast cancer: the era of new susceptibility genes. **BioMed Research International**, p. 747318, 2013. Disponível em:
<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3618918&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 15 fev. 2016.

ASHTON-PROLLA, P.; VARGAS, F. R. Prevalence and impact of founder mutations in hereditary breast cancer in Latin America. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, p. 234–240, 2014.

BLAY, P. et al. Mutational analysis of BRCA1 and BRCA2 in hereditary breast and ovarian cancer families from Asturias (Northern Spain). **BMC Cancer**, v. 13, p. 243, 2013.

CARRARO, D. M. et al. Comprehensive Analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 Germline Mutation and Tumor Characterization: A Portrait of Early-Onset Breast Cancer in Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, 2013.

CARVALHO-SILVA, D. R. et al. The Phylogeography of Brazilian Y-Chromosome Lineages. **The American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 1, p. 281–286, 2001.

CASTILLA, L. H. et al. Mutations in the BRCA1 gene in families with early-onset breast and ovarian cancer. **Nature Genetics**, v. 8, n. 4, p. 387–391, 1994.

CHEN, K. et al. BreakDancer: an algorithm for high-resolution mapping of genomic structural variation. **Nature Methods**, v. 6, n. 9, p. 677–681, 2009.

CHURPEK, J. E. et al. Inherited predisposition to breast cancer among African American women. **Breast Cancer Research and Treatment**, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25428789>>

CLARKE, C. A. et al. Age-specific incidence of breast cancer subtypes: understanding the black-white crossover. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 14, p. 1094–101, 2012.

COLLINS, F. S.; VARMUS, H. A New Initiative on Precision Medicine. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 9, p. 793–795, 2015.

COOPER, G. M. et al. **Distribution and intensity of constraint in mammalian genomic sequence**. [s. l.], [s.d.]. Disponível em: <www.genome.org>. Acesso em: 12 set. 2016.

DEPRISTO, M. A. et al. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. **Nature Genetics**, v. 43, n. 5, p. 491–498, 2011.

DRIES, D. L. Genetic ancestry, population admixture, and the genetic epidemiology of complex disease. **Circulation. Cardiovascular Genetics**, v. 2, n. 6, p. 540–3, 2009.

DUTIL, J. et al. The spectrum of BRCA1 and BRCA2 alleles in Latin America and the Caribbean: a clinical perspective. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 154, n. 3, p. 441–53, 2015a.

DUTIL, J. et al. The spectrum of BRCA1 and BRCA2 alleles in Latin America and the Caribbean: a clinical perspective. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 154, n. 3, p. 441–53, 2015b.

ECONOMOPOULOU, P.; DIMITRIADIS, G.; PSYRRI, A. Beyond BRCA: New hereditary breast cancer susceptibility genes. **Cancer Treatment Reviews**, v. 41, n. 1, p. 1–8, 2015.

ELGUERO, E. et al. Malaria continues to select for sickle cell trait in Central Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 22, p. 7051–7054, 2015.

EWALD, I. P. et al. Prevalence of the BRCA1 founder mutation c.5266dup in Brazilian individuals at-risk for the hereditary breast and ovarian cancer syndrome. **Hereditary Cancer in Clinical Practice**, v. 9, p. 12, 2011.

FELIX, G. E. et al. Germline mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population. **Human Genome Variation**, v. 1, p. 14012, 2014.

FELIX, G. E. S.; ZHENG, Y.; OLOPADE, O. I. Mutations in context: implications of BRCA testing in diverse populations. **Familial Cancer**, p. 1–13, 2017.

FENG, Y. et al. Characterizing Genetic Susceptibility to Breast Cancer in Women of African Ancestry. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 26, n. 7, p. 1016–1026, 2017.

FERNANDES, G. C. et al. Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. **Oncotarget**, v. 7, n. 49, p. 80465–80481, 2016.

FILIPPINI, S. E.; VEGA, A. Breast cancer genes: beyond BRCA1 and BRCA2. **Frontiers in Bioscience (Landmark edition)**, v. 18, p. 1358–1372, 2013.

FISCHER, C. et al. Evaluating the performance of the breast cancer genetic risk models BOADICEA, IBIS, BRCAPRO and Claus for predicting BRCA1/2 mutation carrier probabilities: a study based on 7352 families from the German Hereditary Breast and Ovarian Cancer Consortium. **Journal of Medical Genetics**, v. 50, n. 6, p. 360–367, 2013.

FRIEBEL, T. M.; DOMCHEK, S. M.; REBBECK, T. R. Modifiers of Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: Systematic Review and Meta-Analysis. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, v. 106, n. 6, 2014.

GIACOMAZZI, J. et al. Prevalence of the TP53 p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e99893, 2014.

HALL, J. M. et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science**, v. 250, n. 4988, p. 1684–1689, 1990.

HALL, M. J.; OLOPADE, O. I. Disparities in genetic testing: thinking outside the BRCA box. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 14, p. 2197–203, 2006.

HARFORD, J. B. **Breast-cancer early detection in low-income and middle-income countries: do what you can versus one size fits all.**, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376292>>

HUO, D. et al. Population differences in breast cancer: survey in indigenous African women reveals over-representation of triple-negative breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 27, p. 4515–21, 2009.

HUO, D. et al. Comparison of Breast Cancer Molecular Features and Survival by African and European Ancestry in The Cancer Genome Atlas. **JAMA Oncology**, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28472234>>. Acesso em: 28 jul. 2017.

IBGE. **IBGE | Memória | publicações | Brasil: 500 anos de povoamento.** 2007. Disponível em: <<http://memoria.ibge.gov.br/publicacoes/brasil-500-anos-de-povoamento.html>>. Acesso em: 9 maio. 2016.

INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016. [s.d.]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/tbregioes_consolidado.asp>. Acesso em: 31 out. 2017.

INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2018. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/index.asp>>. Acesso em: 2 jul. 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Características étnico-raciais da população : um estudo das categorias de classificação de cor ou raça, 2008.** Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=249891>>. Acesso em: 31 out. 2017.

KEHDY, F. S. G. et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 28, p. 8696–8701, 2015.

KING, M.-C. et al. Population-Based Screening for *BRCA1* and *BRCA2*. **JAMA**, v. 312, n. 11, p. 1091, 2014.

KITTLES, R. A.; WEISS, K. M. Race, ancestry, and genes : Implications for Defining Disease Risk. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 4, n. 1, p. 33–67, 2003.

KNERR, S.; WAYMAN, D.; BONHAM, V. L. Inclusion of racial and ethnic minorities in genetic research: advance the spirit by changing the rules? **The Journal of Law, Medicine & Ethics**, v. 39, n. 3, p. 502–512, 2011.

KNUDSON, A G. Two genetic hits (more or less) to cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 1, n. 2, p. 157–162, 2001.

KURIAN, A. W. et al. Performance of prediction models for BRCA mutation carriage in three racial/ethnic groups: findings from the Northern California Breast Cancer Family Registry. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 18, n. 4, p. 1084–91, 2009.

KWIATKOWSKI, F. et al. BRCA mutations increase fertility in families at hereditary breast/ovarian cancer risk. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0127363, 2015.

LEE, A. J. et al. BOADICEA breast cancer risk prediction model: updates to cancer incidences, tumour pathology and web interface. **British Journal of Cancer**, v. 110, n. 2, p. 535–45, 2014.

LEVY-LAHAD, E. et al. Founder BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jews in Israel: frequency and differential penetrance in ovarian cancer and in breast-ovarian cancer families. **American Journal of Human Genetics**, v. 60, n. 5, p. 1059–1067, 1997.

LIMA-COSTA, M. F. et al. Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). **Scientific Reports**, v. 5, p. 9812, 2015.

LIU, H. et al. A geographically explicit genetic model of worldwide human-settlement history. **American Journal of Human Genetics**, v. 79, n. 2, p. 230–237, 2006.

MACHADO, T. M. B. et al. Types of marriages, population structure and genetic disease. **Journal of Biosocial Science**, v. 45, n. 4, p. 461–470, 2013.

MAVADDAT, N. et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the consortium of investigators of modifiers of BRCA1/2 (CIMBA). **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 21, n. 1, p. 134–147, 2012.

MCEVOY, B.; BELEZA, S.; SHRIVER, M. D. The genetic architecture of normal variation in human pigmentation: an evolutionary perspective and model. **Human Molecular Genetics**, p. R176-81, 2006.

MYRIAD. **Population at cancer risk: sporadic, familial, hereditary**. [s.d.]. Disponível em: <<https://myriadgenetics.eu/patients/hereditary-cancer/genetic-testing/population-at-risk/>>. Acesso em: 25 jul. 2018.

NJIAJU, U. O.; OLOPADE, O. I. Genetic determinants of breast cancer risk: a review of current literature and issues pertaining to clinical application. **The Breast Journal**, v. 18, n. 5, p. 436–442, 2012.

NORD, A. S. et al. Accurate and exact CNV identification from targeted high-throughput sequence data. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 184, 2011.

OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 1, 2010.

OSSA, C. A.; TORRES, D. Founder and recurrent mutations in BRCA1 and BRCA2 genes in Latin American Countries: state of the art and literature review. **The Oncologist**, v. 21, n. 7, p. 832–839, 2016a.

OSTRER, H.; SKORECKI, K. The population genetics of the Jewish people. **Human Genetics**, v. 132, n. 2, p. 119–127, 2013.

PAL, T. et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in a study of African American breast cancer patients. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 13, n. 11 Pt 1, p. 1794–9, 2004.

PAL, T. et al. A high frequency of *BRCA* mutations in young black women with breast cancer residing in Florida. **Cancer**, v. 121, n. 23, p. 4173–4180, 2015.

PALMERO, E. I. et al. The germline mutational landscape of BRCA1 and BRCA2 in

Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 9188, 2018.

PETRUCELLI, N.; DALY, M. B.; FELDMAN, G. L. **BRCA1 and BRCA2 hereditary breast and ovarian cancer**, University of Washington, Seattle, 2013.

RIVAS, M. A. et al. Insights into the genetic epidemiology of Crohn's and rare diseases in the Ashkenazi Jewish population. **PLOS Genetics**, v. 14, n. 5, p. e1007329, 2018.

ROBERTSON, L. et al. BRCA1 testing should be offered to individuals with triple-negative breast cancer diagnosed below 50 years. **British Journal of Cancer**, v. 106, n. 6, p. 1234–1238, 2012.

ROBINSON, M. R. et al. Population genetic differentiation of height and body mass index across Europe. **Nature Genetics**, v. 47, n. 11, p. 1357–1362, 2015.

SALZANO, F. M.; SANS, M. Interethnic admixture and the evolution of Latin American populations. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 151–170, 2014.

SAULSBERRY, K.; TERRY, S. F. The need to build trust: a perspective on disparities in genetic testing. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 17, n. 9, p. 647–648, 2013.

SERVICK, K. Breast cancer. Breast cancer: a world of differences. **Science**, v. 343, n. 6178, p. 1452–1453, 2014.

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

SMITH, E. C. An Overview of Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 57, n. 6, p. 577–584, 2012.

SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8418–8423, 2003.

STRINGER, C. Human evolution: out of Ethiopia. **Nature**, v. 423, n. 6941, p. 692–695, 2003.

STRUEWING, J. P. et al. The risk of cancer associated with specific mutations of

BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. **The New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 20, p. 1401–1408, 1997.

STURM, R. A. Molecular genetics of human pigmentation diversity. **Human molecular genetics**, v. 18, n. R1, p. R9-17, 2009.

THOMSEN, H. et al. Inbreeding and homozygosity in breast cancer survival. **Scientific Reports**, v. 5, p. 16467, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26558712>>. Acesso em: 25 set. 2016.

VARLEY, J. M. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. **Human Mutation**, v. 21, n. 3, p. 313–320, 2003. Disponível em:

VEGA, A. et al. The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. **Human Mutation**, v. 17, n. 6, p. 520–521, 2001.

VIEIRA, P. C. M. et al. Population stratification effect on cancer susceptibility in an admixed population from Brazilian Amazon. **Anticancer Research**, v. 35, n. 4, p. 2009–2014, 2015.

WALSH, T. et al. Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 28, p. 12629–12633, 2010.

WANG, Y. A. et al. Germline breast cancer susceptibility gene mutations and breast cancer outcomes. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 315, 2018.

WCRFI. **Breast cancer statistics | World Cancer Research Fund International**. 2015. Disponível em: <<http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/breast-cancer-statistics>>.

WHO. **Global status report on noncommunicable diseases 2014** World Health. [s.l: s.n.].

WOLPOFF, M. H.; HAWKS, J.; CASPARI, R. Multiregional, not multiple origins. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 112, n. 1, p. 129–136, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766948>>. Acesso em: 26 set. 2016.

WOOSTER, R. et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. **Science**, v. 265, n. 5181, p. 2088–2090, 1994.

YE, K. et al. Pindel: a pattern growth approach to detect break points of large deletions and medium sized insertions from paired-end short reads. **Bioinformatics**, v. 25, n. 21, p. 2865–2871, 2009.

ZHANG, G. et al. Signatures of natural selection on genetic variants affecting complex human traits. **Applied & Translational Genomics**, v. 2, p. 78–94, 2013.

APÊNDICE I

Pg 1/3

TCLE GRUPO CASO

Coordenadora e Oncologista Responsável pelo projeto:
Dra. Ivana Lucia de Oliveira Nascimento – CREMEB: 10845
Endereço: Av. Reitor Miguel Calmon, s/n - Vale do Canela
Salvador, BA, CEP: 40.110-100
Tel: (71) 3235-9682 ramal 234/235

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**ANÁLISE DA ANCESTRALIDADE E DE GENES DE SUSCEPTIBILIDADE EM
PORTADORES DE CÂNCER DE MAMA E DE PRÓSTATA NO ESTADO DA BAHIA**

Caro participante:

Gostaríamos de convidar você a participar voluntariamente de um estudo que identificará a contribuição ancestral (antepassados) dos índios, dos africanos e europeus na formação da nossa população e a relação desta contribuição com o desenvolvimento dos câncer de mama e câncer de próstata.

Para isso faremos testes para verificação de possíveis alterações (mudanças) do seu DNA e RNA (material genético). Primeiro será analisado um painel genes (regiões do DNA) de susceptibilidade (risco) ao câncer de mama e próstata, depois se necessário (se o primeiro teste for negativo) será analisado todo o genoma (toda a molécula do DNA) na busca de outras regiões associadas ao risco de câncer de mama e câncer próstata. Este estudo é de extrema importância porque o número de casos de câncer de mama e próstata estão aumentando em nossa população, além de que melhor compreensão destas doenças pode vir a contribuir com melhor estratégia de tratamento e, portanto, sobrevida através de um diagnóstico diferenciado.

Você é livre para aceitar participar ou não, como também tem tempo para refletir e/ou consultar, seus familiares ou seu médicos que possam ajudá-los na tomada de decisão. Qualquer dúvida que você tenha o entrevistador, como também toda a equipe está disposta para esclarecimentos. Caso você concorde será feito uma entrevista seguida da coleta dos seguintes materiais biológicos: sangue por punção na veia do braço (8 mL), equivalente a 4 colheres de sopa, que será coletado por um profissional de saúde treinado. Os riscos associados à coleta do sangue venoso são mínimos como desconforto no local da coleta, dor ou talvez uma pequena mancha roxa no braço. Para a coleta do tecido tumoral você concederá a equipe da pesquisa acesso a amostras tumorais fixadas em parafina (pedacinho do tumor que foi retirado na cirurgia).

Entrevistador: _____ Participante: _____

Você também pode ficar apreensivo, ansioso em relação aos resultados da pesquisa, pois trará informação sobre sua susceptibilidade genética (risco herdado) no desenvolvimento de câncer de mama e câncer de próstata., o que terá impacto sobre sua família também. Mas, esse desconforto também pode ser amenizado pois a equipe de pesquisa conta com uma psicóloga treinada, além da médica geneticista da equipe que está disponível para você e sua família. Ressaltamos também que em casos de qualquer dano decorrentes da pesquisa, físico, morais ou psicológicos será garantido indenização e assistência integral e imediata, pelo tempo que for necessário, de forma gratuita.

Durante a entrevista com a médica geneticista, serão coletados dados pessoais e clínicos, ou você pode conceder à equipe responsável, acesso ao seu prontuário para informações complementares, o qual contém dados clínicos importantes descritos pelo seu médico. Como também acesso a amostra do tumor.

Todos os materiais colhidos para essa pesquisa serão armazenados em caráter de biorepositório e analisadas no Setor de Oncogenética do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia e no Laboratório de Dra Olopade no Centro Médico da Universidade de Chicago. E caso ocorram novas pesquisas, entraremos em contato com você para obtenção do seu consentimento como também submeteremos os novos protocolos de estudo aos Comitês de Ética em Pesquisa conforme requerido resoluções nº 466/2012 e nº 441/2011 do Conselho Nacional de Saúde.

Em nenhum momento do desenvolvimento da pesquisa seu nome será revelado, o que garante seu anonimato e preserva a sua identidade e previne a estigmatização e discriminação. Também não será cobrado nada de você. Como sua participação é voluntária, ou seja, você pode recusar-se a participar ou ainda retirar seu consentimento em qualquer fase do estudo, sem penalização alguma.

Aceitando participar do estudo você ficará com uma via deste termo assinada por você e o entrevistador. E como benefício iremos convidar você, caso queira, para ter acesso aos seus resultados dos testes realizados nessa pesquisa através de uma consulta com uma médica geneticista colaboradora da pesquisa, que explicará os resultados a você sobre sua ancestralidade genética (grau de mistura) e susceptibilidade (risco) genética ao câncer de mama ou câncer de próstata. E, em caso de dúvida(s), desistências, e outros esclarecimento(s), você pode entrar em contato conosco pelo telefone 0xx71 3235 9682 ramal 235; ou ivanasci@gmail.com.

Este projeto científico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituto Mantenedor de Ensino Superior da Bahia – IMES e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CAAE 37352114.5.0000.5032 em xx/xx/xxxx).

Coordenação: Dra. Ivana Lucia do Nascimento (CRM 10845)

Equipe colaboradora: Kiyoko Abe Sandes, Maria Betânia Pereira Toralles, Maura Alice Santos Romeo, Rodrigo Santa Cruz Guindalini, Olufunmilayo Olopade, Taisa Manuela Bonfim Machado, Thaís Ferreira Bomfim, Gabriela do Espírito Santo Felix, Polyanna Carôzo de Oliveira e Roberto Meyer

Instituições participantes: (A) Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia localizado na Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brasil, CEP 40.110-000. (B) Center for Clinical Cancer Genetics, University of Chicago, 5841 S. Maryland Avenue, MC 2115 Chicago, Illinois 60637-1470Chicago-Illinois, USA, 60637.

Entrevistador: _____ Participante: _____

Eu, _____,
CPF/RG _____, declaro que
o entrevistador _____ explicou-
me os objetivos, riscos e benefícios da pesquisa “Análise da ancestralidade e de genes de
susceptibilidade em portadores de câncer de mama e próstata no estado da Bahia”, como também a
forma de participação. E, após ler e compreender o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
concordo em participar como voluntário do presente estudo.

Indivíduo participante da pesquisa

Impressão digital

Membro da equipe que apresentou o TCLE (entrevistador)

Dra. Ivana Lucia do Nascimento CRM 10845
Pesquisador responsável

Salvador-BA, ____ de _____ de _____

Entrevistador: _____ Participante: _____

APÊNDICE II

Pg 1/3

TCLE GRUPO CONTROLE



Coordenadora e Oncologista Responsável pelo projeto:
Dra. Ivana Lucia de Oliveira Nascimento – CREMEB: 10845
Endereço: Av. Reitor Miguel Calmon, s/n - Vale do Canela
Salvador, BA, CEP: 40.110-100
Tel: (71) 3235-9682 ramal 234/235

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ANÁLISE DA ANCESTRALIDADE E DE GENES DE SUSCEPTIBILIDADE EM PORTADORES DE CÂNCER DE MAMA E DE PRÓSTATA NO ESTADO DA BAHIA

Caro participante:

Gostaríamos de convidar você a participar voluntariamente de um estudo que identificará a contribuição ancestral (antepassados) dos índios, dos africanos e europeus na formação da nossa população e a relação desta contribuição com o desenvolvimento dos câncer de mama e câncer de próstata.

Para isso faremos testes para verificação de possíveis alterações (mudanças) do seu DNA e RNA (material genético). Primeiro será analisado um painel genes (regiões do DNA) de susceptibilidade (risco) ao câncer de mama e próstata, depois se necessário (se o primeiro teste for negativo) será analisado todo o genoma (toda a molécula do DNA) na busca de outras regiões associadas ao risco de câncer de mama e câncer próstata.

Você é livre para aceitar participar ou não, como também tem tempo para refletir e/ou consultar, seus familiares ou seu médicos que possam ajudá-los na tomada de decisão. Qualquer dúvida que você tenha o entrevistador como também toda a equipe está disposta para esclarecimentos

Caso você concorde será feito uma entrevista seguida da coleta dos seus dados pessoais, você vai responder um questionário e iremos coletar também seu sangue por punção na veia do braço (8 mL), equivalente a 4 colheres de sopa, que será coletado por um profissional de saúde treinado. Os riscos associados à coleta do sangue venoso são mínimos como desconforto no local da coleta, dor ou talvez uma pequena mancha roxa no braço.

Você também pode ficar apreensivo, ansioso em relação aos resultados da pesquisa, pois trará informação sobre sua susceptibilidade genética (risco herdado) no desenvolvimento de câncer, o que

Entrevistador: _____ Participante: _____

terá impacto sobre sua família também. Mas, esse desconforto também pode ser amenizado pois a equipe de pesquisa conta com uma psicóloga treinada, além da médica geneticista da equipe que está disponível para você e sua família. Ressaltamos também que em casos de qualquer dano decorrentes da pesquisa, físico, morais ou psicológicos será garantido indenização e assistência integral e imediata, pelo tempo que for necessário, de forma gratuita. Durante a entrevista com o entrevistador, membro da equipe, serão coletados dados pessoais.

Todos os materiais colhidos para essa pesquisa serão armazenados em caráter de biorepositório e analisadas no Setor de Oncogenética do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia e no Laboratório de Dra Olopade no Centro Médico da Universidade de Chicago. E caso ocorram novas pesquisas, entraremos em contato com você para obtenção do seu consentimento como também submeteremos os novos protocolos de estudo aos Comitês de Ética em Pesquisa conforme requerido resoluções nº 466/2012 e nº 441/2011 do Conselho Nacional de Saúde.

Em nenhum momento do desenvolvimento da pesquisa seu nome será revelado, o que garante seu anonimato e preserva a sua identidade e previne a estigmatização e discriminação. Também não será cobrado nada de você. Como sua participação é voluntária, ou seja, você pode recusar-se a participar ou ainda retirar seu consentimento em qualquer fase do estudo, sem penalização alguma.

Aceitando participar do estudo você ficará com uma via deste termo assinada por você e o entrevistador. E como benefício iremos convidar você, caso queira, para ter acesso aos seus resultados dos testes realizados nessa pesquisa através de uma consulta com uma médica geneticista colaboradora da pesquisa, que explicará os resultados a você sobre sua ancestralidade genética (grau de mistura) e susceptibilidade (risco) genética ao câncer de mama ou câncer de próstata. E, em caso de dúvida(s), desistências, e outros esclarecimento(s), você pode entrar em contato conosco pelo telefone 0xx71 3235 9682 ramal 235; ou ivanasci@gmail.com.

Este projeto científico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituto Mantenedor de Ensino Superior da Bahia – IMES e Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CAAE 37352114.5.0000.5032 em xx/xx/xxxx).

Coordenação: Dra. Ivana Lucia do Nascimento (CRM 10845)

Equipe colaboradora: Kiyoko Abe Sandes, Maria Betânia Pereira Toralles, Maura Alice Santos Romeo, Rodrigo Santa Cruz Guindalini, Olufunmilayo Olopade, Taisa Manuela Bonfim Machado, Thaís Ferreira Bomfim, Gabriela do Espírito Santo Felix, Polyanna Carôzo de Oliveira e Roberto Meyer

Instituições participantes: (A) Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia localizado na Av. Reitor Miguel Calmon, s/n, Vale do Canela, Salvador, Bahia, Brasil, CEP 40.110-000. (B) Center for Clinical Cancer Genetics, University of Chicago, 5841 S. Maryland Avenue, MC 2115 Chicago, Illinois 60637-1470 Chicago-Illinois, USA, 60637.

Entrevistador: _____ Participante: _____

Eu, _____,
CPF/RG _____, declaro que
o entrevistador _____ explicou-
me os objetivos, riscos e benefícios da pesquisa “Análise da ancestralidade e de genes de
susceptibilidade em portadores de câncer de mama e próstata no estado da Bahia”, como também a
forma de participação. E, após ler e compreender o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
concordo em participar como voluntário do presente estudo.

Indivíduo participante da pesquisa

Impressão digital

Membro da equipe que apresentou o TCLE (entrevistador)

Dra. Ivana Lucia do Nascimento CRM 10845
Pesquisador responsável

Salvador-BA, ____ de _____ de _____

Entrevistador: _____ Participante: _____

APÊNDICE III

ANÁLISE DA ANCESTRALIDADE E DE GENES DE SUSCEPTIBILIDADE EM PORTADORES DE CÂNCER DE MAMA E DE PRÓSTATA NO ESTADO DA BAHIA

Questionário 1

| | | |
|----|--|--------------------------|
| 1. | Data da entrevista: Endereço | Entrevistador(a): |
|----|--|--------------------------|

| | | |
|----|--|-----------------------|
| 2. | Nome do participante: Nome do Pai: _____ Nome da Mãe: _____ Filiação Biológica: ()1. Sim ()2. Não ()3. Não sabe informar | |
| 3. | Data de Nascimento: Sexo: ()1. Feminino ()2. Masculino | |
| 4. | Cidade de residência: | De nascimento: |

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DO PACIENTE

| | |
|-----|--|
| 5. | Raça/Cor (Auto-denominação): ()1. Negro ()2. Pardo ()3. Branco ()4. Indígena ()0. Outros |
| 6. | Cabelo (Textura): ()1. Crespo ()2. Ondulado ()3. Liso |
| 7. | Nariz: ()1. Achatado ()2. Médio ()3. Fino |
| 8. | Lábios (Forma): ()1. Grossa ()2. Média ()3. Fina |
| 9. | Pele (Cor): ()1. Preta ()2. Marrom ()3. Branca |
| 10. | Raça/Cor (Análise fenotípica): ()1. Negro ()2. Mulato Escuro ()3. Mulato Médio ()4. Mulato Claro ()5. Branco ()0. Outros |

ANCESTRALIDADE REFERIDA DOS PAIS E AVÓS DO PACIENTE

| | |
|-----|---|
| 11. | Pai: ()1. Negro ()2. Mulato ()3. Branco ()4. Índio ()5. Outro: ()0. Não sabe informar Local de nascimento: |
| 12. | Mãe: ()1. Negro ()2. Mulato ()3. Branco ()4. Índio ()5. Outro ()0. Não sabe informar Local de nascimento: |
| 13. | Avó Materna: ()1. Negro ()2. Mulato ()3. Branco ()4. Índio ()5. Outro ()0. Não sabe informar Local de nascimento: |
| 14. | Avô Materno: ()1. Negro ()2. Mulato ()3. Branco ()4. Índio ()5. Outro ()0. Não sabe informar Local de nascimento: |
| 15. | Avó Paterna: ()1. Negro ()2. Mulato ()3. Branco ()4. Índio ()5. Outro ()0. Não sabe informar Local de nascimento: |
| 16. | Avô Paterno: ()1. Negro ()2. Mulato ()3. Branco ()4. Índio ()5. Outro ()0. Não sabe informar Local de nascimento: |

DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS – CÂNCER DE MAMA

| | |
|-----|---|
| 17. | <p>Estadiamento: ()1. I ()2. II ()3. III ()4. IV T: N: M: () ()0. Não tem dados</p> |
| 18. | <p>Tipo histológico: ()1. Carcinoma ductal infiltrante ()2. Carcinoma ductal “ in situ” ()3. Microinvasão: Sim () Não () () 4. Outros: Grau histológico: ()1. Bem diferenciado ()2. Moderadamente diferenciado ()3. Pouco diferenciado ()4. Indiferenciado ()5. Não avaliado.</p> |
| 19. | <p>Imunoistoquímica ()1. Sim; Onde foi realizada? ()2. Não RE: ()1 :0 ()2.+ ()3. ++ ()4. +++ ()5. ++++ RP: ()1 :0 ()2. + ()3. ++ ()4. +++ ()5. ++++ HER-2 : ()1: 0 ()2:+ ()3:++ ()4:+++ TP53: ()1. Neg ()2. Pos ()0. Não tem dados KI-67: ()1. Neg. ()2. Pos ()0. Não tem dados</p> |
| 20. | <p>Data do diagnóstico histopatológico – Onde foi realizado-</p> |
| 21. | <p>Tratamento: 1. Cirurgia: ()1. Sim ()2. Não <input type="checkbox"/> Tipo: ()1. Quadrantectomia ()2. Mastectomia 2. Esvaziamento axilar: ()1. Sim ()2. Não <input type="checkbox"/> Linfonodo sentinela: ()1. Sim ()2. Não 3. Radioterapia: ()1. Sim ()2. Não 4. Quimioterapia: ()1. Sim ()2. Não <input type="checkbox"/> Protocolo: ()1. CMF ()2. FAC ()3. AC ()4. AC- T ()5. AC-D ()6. Outro 5. Hormonioterapia: ()1. Sim ()2. Não <input type="checkbox"/> Protocolo: ()1. Tamoxifeno ()2. Inibidor de aromatase ()3. Qual?</p> |
| 22. | <p>Recidiva: ()1. Sim ()2. Não Data:</p> |
| 23. | <p>Tipo de recidiva: ()1. Ossea ()2. Visceral ()3. Loco-regional</p> |

ANEXO I

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA ANCESTRALIDADE E DE GENES DE SUSCEPTIBILIDADE EM PORTADORES DE CÂNCER DE MAMA E DE PRÓSTATA NO ESTADO DA BAHIA

Pesquisador: IVANA LUCIA DE OLIVEIRA NASCIMENTO

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Versão: 4

CAAE: 37352114.5.0000.5032

Instituição Proponente: Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
American Cancer Society

ANEXO II