

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**O PAPEL DAS VARIANTES DE SIGNIFICADO INCERTO E VARIANTES EM
REGIÕES GÊNICAS NÃO CODIFICANTES DE *BRCA1/2* EM PACIENTES COM
SÍNDROME DE PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER DE MAMA E
OVÁRIO**

KAYANA ISABEL WEBER DE SOUZA

Porto Alegre

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO
SULFACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

**O PAPEL DAS VARIANTES DE SIGNIFICADO INCERTO E VARIANTES EM
REGIÕES GÊNICAS NÃO CODIFICANTES DE *BRCA1/2* EM PACIENTES COM
SÍNDROME DE PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER DE MAMA E
OVÁRIO**

KAYANA ISABEL WEBER DE SOUZA

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Ashton-Prolla

Coorientadora: Profa. Dra. Clévia Rosset

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção de Mestre em Medicina: Ciências
Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande
do Sul, Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas.

Porto Alegre

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Weber de Souza, Kayana Isabel
O PAPEL DAS VARIANTES DE SIGNIFICADO INCERTO E
VARIANTES EM REGIÕES GÊNICAS NÃO CODIFICANTES DE
BRCA1/2 EM PACIENTES COM SÍNDROME DE PREDISPOSIÇÃO
HEREDITÁRIA AO CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO / Kayana Isabel
Weber de Souza. -- 2023.
91 f.
Orientadora: Patricia Ashton-Prolla.

Coorientadora: Clévia Rosset.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2023.

1. Síndrome Hereditária de Câncer de Mama e Ovário.
I. Ashton-Prolla, Patricia, orient. II. Rosset,
Clévia, coorient. III. Título.

La la la la la la. Lovely Linda. With the lovely flowers in her hair. Paul McCartney, 1970.

Agradecimentos

Aos meus pais, Anelise e Clóvis, que não mediram esforços durante toda minha trajetória acadêmica até aqui. Pela educação e apoio. Obrigada por serem os meus maiores exemplos de integridade, responsabilidade, honestidade e amor.

Às minhas professoras, orientadora Prof. Dra. Patricia Ashton-Prolla, e coorientadora Prof. Dra. Clévia Rosset, pela oportunidade concedida e pelo grande conhecimento compartilhado neste período. Continuo buscando um dia me tornar uma pesquisadora tão qualificada e correta como vocês.

Aos colegas do Laboratório de Medicina Genômica (LMG) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pelo convívio e pelos cafés.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas (PPGCM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pelo suporte.

Ao Dr. José Luiz Pedrini e a equipe de Pesquisa Clínica do Setor de Mastologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição pelo ensinamento. É muito bonito poder lutar junto e acompanhar a vida de tantas mulheres com câncer de mama, devolvendo-as autoestima, saúde e qualidade de vida.

A todos os amigos e familiares que se fizeram presentes ao longo trajetória, deixando-a mais leve.

RESUMO

Sabe-se que 10% dos casos de câncer de mama e 25% dos casos de câncer de ovário são de origem hereditária e caracterizam a Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditários (HBOC), geralmente causada pela presença de variantes patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, que conferem uma probabilidade aumentada para desenvolvimento destas neoplasias, somando 72%-69% e 44-17%, respectivamente, até os 70 anos de idade. Pacientes diagnosticadas com HBOC possuem um manejo clínico específico, com ações de profilaxia, rastreamento e tratamento direcionado. Entretanto, um considerável número de pacientes apresenta o fenótipo clínico e se encaixa nos critérios de realização de teste genético para HBOC, apresenta resultado negativo ou inconclusivo, com a detecção de uma Variante de Significado Incerto (VUS).

A presença de variantes patogênicas na região não codificante destes genes pode afetar a formação de uma proteína funcional em diferentes níveis, desde a transcrição do DNA em RNA, até sua tradução. Na prática clínica, estas áreas não são comumente analisadas e continuam pouco exploradas. Além disso, não existe um consenso estabelecido para a reavaliação e reclassificação de VUS em um período determinado, assim como a escolha de qual guia de categorização se adequa à nossa população específica.

O presente trabalho, portanto, teve como objetivo explorar os mecanismos moleculares possivelmente associados com HBOC em pacientes que possuem resultado de avaliação genética de *BRCA1/2* negativo ou inconclusivo, através de análises *in silico* e *in vitro* das alterações nas regiões não codificantes destes genes, assim como comparar os guias de classificação de variantes quanto seus critérios e metodologias durante a reclassificação de VUS. Durante este processo, duas variantes foram reclassificadas para provavelmente patogênicas, e uma destas foi avaliada através de bioinformática quanto seu impacto funcional na estrutura proteica para acúmulo de evidência. Foi possível discutir sobre os principais desafios presentes neste processo de reclassificação e os principais erros inerentes possivelmente associados ao mesmo, sugerindo pontos de atenção e monitoramento regular de informações.

Foi realizada também uma busca por variantes de regiões não codificantes descritas na população brasileira com o intuito de verificar evidências e informações sobre sua patogenicidade e origem. Observou-se um significativo número de variantes não referenciadas e ausência de correlação com fenótipos clínicos. Além disso, pode-se argumentar sobre as áreas de coberturas dos testes genéticos utilizados e as altas taxas de miscigenação do país, que influenciam de forma negativa em uma possível caracterização e definição da carga genética da população, para identificação de mutações fundadoras e *hotspots*.

Ainda, através de uma busca em bancos de dados, foi estabelecida uma rede de interação entre microRNAs que possuem *BRCA1/2* e outras proteínas da via de Recombinação Homóloga como alvo e interagem direta- e indiretamente, resultando em 78 microRNAs citados. A elucidação de suas funções e impacto no processo de reparo está sendo realizado através de uma revisão de literatura.

Palavras-chave: Síndrome do câncer de mama e ovário hereditários. Região não codificante. Variantes de significado incerto. MicroRNAs. Bancos de dados.

ABSTRACT

It is known that 10% of breast cancer cases and 25% of ovarian cancer cases are hereditary and characterize the Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome (HBOC), derived from the presence of pathogenic variants in *BRCA1* and *BRCA2* genes, which result in an increased probability of these neoplasms development, adding up to 72%-69% and 44-17%, respectively, to the age of 70. HBOC diagnosed patients receive distinct clinical management, with prophylaxis, screening, and targeted treatment. However, there is a significant number of patients that present the HBOC clinical phenotype and fit the genetic testing criteria, but receive a negative or inconclusive result, with the detection of a variant of uncertain significance (VUS).

The presence of pathogenic variants in the non-coding regions of these genes can affect the protein establishment in different levels since the DNA to RNA transcription and its translation. In the current clinical practice, these areas are not commonly evaluated and remain unexplored. Besides, there is no established consensus on the re-evaluation and reclassification of VUS with a defined periodicity, as well as the choice of which classification guideline should we use in our specific population.

This work aimed to explore the molecular mechanisms possibly associated with HBOC in patients with a negative or inconclusive result in the *BRCA1/2* genetic test through *in vitro* and *in silico* evaluations of alterations located in the non-coding regions of these genes, as well as compare the variant classification guidelines and their criteria, and methodologies during a VUS case series reclassification attempt. During this process, two variants were reclassified into likely pathogenic, and one of them was still evaluated through bioinformatics on its functional impact to the protein structure to accumulate evidence. Our group was able to discuss about the main challenges present in the reclassification process and inherent errors possibly associated, making suggestions on lookout points and information regular monitoring, as new evidence arises.

A search for variants located in the non-coding regions described in the Brazilian population was carried out in order to verify evidence regarding their pathogenicity and origin. A significant number of non-referenced variants and absence of clinical phenotype correlation were observed. In addition, it was able to argue about the coverage of the genetic tests used and the high miscegenation rates present in the Brazilian population, which can negatively influence in the identification of founder mutations and hotspots regions, in order to characterize and define the genetic loads' population.

Also, through a databases search, an interaction network of microRNAs that target *BRCA1/2* and other proteins of homologous recombination pathway directly and indirectly was established, resulting in 78 microRNAs cited. The elucidation of their function and potential impact in the

repair process is currently being carried out through a literature review.

Keywords: Hereditary breast and ovarian cancer syndrome. Non-coding regions. Variants of uncertain significance. MicroRNAs. Databases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estratégia de busca de informações para compor a revisão bibliográfica

Figura 2 – Processo de reparo de quebra de fita dupla através de HR

Figura 3 – Interações entre as proteínas *BRCA1/2* durante o processo funcional de HR

Figura 4 – Avaliação e manejo de casos suspeitos de HBOC

Figura 5 – Estrutura gênica

Figura 6 – Mecanismos de regulação pós-transcricional do gene: adição do revestimento CAP e cadeia de poli-A

Figura 7 – Mecanismos de regulação pós-transcricional do gene: processamento de RNA

Figura 8 – Marco conceitual da proposta do trabalho

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Risco global para o desenvolvimento de câncer de mama ou ovário

Tabela 2 – Critérios clínicos considerados para a testagem de genes de alta penetrância em indivíduos com suspeita de HBOC

Tabela 3 – Variantes fundadoras significativamente encontradas em diferentes populações

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACMG	<i>American College of Medical Genetics and Genomics</i>
ANS	Agência Nacional de Saúde Suplementar
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
B	Benigna
BACH1	<i>BTB Domain and CNC Homolog 1</i>
BARD1	<i>BRCA1 Associated Ring Domain 1</i>
<i>BRCA1</i>	<i>Breast Cancer 1</i>
<i>BRCA2</i>	<i>Breast Cancer 2</i>
BRCAX	Pacientes sem mutação detectada em <i>BRCA1/2</i>
BRCT	<i>BRCA1 C Terminus Domain</i>
BRIP1/ <i>BRIP1</i>	<i>BRCA1 Interacting Helicase 1</i>
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
<i>CHEK2</i>	<i>Serine/Threonine-Protein Kinase Chk2</i>
CONITEC	Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no Sistema Único de Saúde
CtIP	<i>CtBP-Interacting Protein</i>
DBD	<i>DNA Binding Domain</i>
DSB	Quebras de Fita Dupla (<i>Double Strand Breaks</i>)
ENIGMA	<i>Evidence-Based Network Interpretation of Germline Mutant Alleles</i>
G2	Fase de Crescimento Celular
HBOC	Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditário (<i>Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome</i>)
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor 2</i>
HR	Recombinação Homóloga (<i>Homologous Recombination</i>)
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IMAMA	Instituto da Mama do Rio Grande do Sul
IMC	Índice de Massa Corporal
INCA	Instituto Nacional do Câncer
iPARP	Inibidores de PARP
kb	Quilobases
LOH	Perda de Heterozigose (<i>Loss Of Heterozygosity</i>)

MLPA	<i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i>
miR	microRNA
miRNA	microRNA
mRNA	RNA Mensageiro
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NGS	Sequenciamento de Nova Geração (<i>Next Generation Sequencing</i>)
NHEJ	União de Extremidades Não Homólogas (<i>Non Homologous End Joining</i>)
NHS	<i>National Health System</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PALB2/PALB2	<i>Partner and Localizer of BRCA2</i>
PARP	Poli-Adenosina Difosfato Ribose
RAD51	<i>DNA Repair Protein RAD51 Homolog 1</i>
P	Patogênica
PB	Provavelmente Benigna
pb	Pares de Base
PP	Provavelmente Patogênica
RBBP8	<i>RB Binding Protein 8</i>
RE	Receptor de Estrogênio
RH	Receptor Hormonal
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RP	Receptor de Progesterona
S	Fase de Síntese
SBM	Sociedade Brasileira de Mastologia
Sherloc	<i>Semiquantitative, Hierarchical Evidence-Based Rules for Locus Interpretation</i>
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único (<i>Single Nucleotide Polimorphism</i>)
ssDNA	DNA em Fita Simples (<i>Single Strand DNA</i>)
SUS	Sistema Único de Saúde
TNBC	Câncer de Mama Triplo-Negativo (<i>Triple Negative Breast Cancer</i>)
TP53	<i>Tumor Protein P53</i>
UTR	Região Não Traduzida (<i>Untranslated Region</i>)
VUS	Variante de Significado Incerto (<i>Variant of Uncertain Significance</i>)
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO:

1.	INTRODUÇÃO	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1.	Estratégias para localizar e selecionar informações	18
2.2.	Epidemiologia e Etiologia do Câncer de Mama e Ovário.....	19
2.3.	Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditários (HBOC).....	22
2.3.1	Epidemiologia e Etiologia de HBOC	22
2.3.2.	Critérios clínicos de HBOC	24
2.4.	Genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> e seu papel no reparo de DNA via Recombinação Homóloga	27
2.4.1.	Variantes Patogênicas em <i>BRCA1/2</i>	30
2.4.2.	Mecanismos Potenciais Terapêuticos para HBOC	32
2.5.	Testes Genéticos.....	32
2.5.1.	Resultados Inconclusivos e Importância de Reavaliação de Variantes em <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	36
2.5.2.	Resultados Negativos.....	38
2.6.	Regiões Não Codificantes dos Genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	39
2.6.1.	Região 5' UTR, Promotora e Associação com Hipermetilação.....	40
2.6.2	Região Intrônica e Variantes de Processamento de RNA	42
2.6.3	Região 3' UTR e Ligação de microRNAs	44
3.	MARCO CONCEITUAL	45
4.	JUSTIFICATIVA	46
5.	OBJETIVOS	48
5.1.	Objetivo Primário	48
5.2.	Objetivos Secundários	48
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
7.	ARTIGOS	58
7.1	Artigo publicado	58
7.1	Resumo publicado e apresentado em formato oral (41ª Semana Científica do HCPA).....	83
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
9.	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	86
10.	ANEXOS E/OU APÊNDICES	87

10.1 Material suplementar do artigo publicado	87
--	-----------

1. INTRODUÇÃO

Até 10% dos casos de câncer de mama e 25% dos casos de ovário são de origem hereditária, relacionados com variantes germinativas patogênicas em genes de alta ou moderada penetrância. Na Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditários (HBOC, de *Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome*), essas variantes ocorrem principalmente nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (de *Breast Cancer 1* e *2*) e conferem uma probabilidade de desenvolvimento de câncer de mama e/ou ovário de 72% e 44%, respectivamente, até os 70 anos de idade. Alterações em outros genes podem estar envolvidas nas ocorrências de HBOC, mas são menos comuns (ADAM et al., 2022; KUCHENBAECKER et al., 2017; STAFFORD et al., 2019; VAROL et al., 2018).

Nos casos com suspeita de HBOC, é muito importante que a pesquisa de variantes germinativas patogênicas seja realizada. A pesquisa pode ser feita através de sequenciamento completo, abrangendo toda a região codificante dos genes *BRCA1* e *BRCA2* ou através de painéis de múltiplos genes, seguindo critérios de testagem baseados em informações clínicas e histórico familiar de câncer do indivíduo. Destaca-se o significativo percentual de testes genéticos com resultado negativo ou inconclusivo para a detecção de variantes. Até 60% terão um resultado negativo, sem nenhuma variante patogênica detectada, e 7-21% dos pacientes, dependendo sua etnia, poderão apresentar variantes de significado incerto (VUS, de *Variant of Uncertain Significance*) que requerem constante reavaliação através de critérios de diretrizes internacionais. Dessa forma, diversas variantes necessitam um maior refinamento de classificação, a fim de obter um melhor prognóstico e manejo clínico dos pacientes (ALEMAR et al., 2017; AZZOLLINI et al., 2016; BECK et al., 2020; CHERN et al., 2019; MANCHANDA et al., 2018; VALENCIA et al., 2017, WELSH et al., 2017).

Dados estes fatos, é igualmente importante explorar outros territórios e alterações além da região codificante dos genes envolvidos. A região não codificante, que não é avaliada na maioria dos testes genéticos disponíveis atualmente, é constituída por promotor, íntrons e regiões 5' e 3' não traduzidas (UTR, de *Untranslated Regions*). As regiões não codificantes podem compreender, além de variantes patogênicas, alterações epigenéticas que influenciam mecanismos associados à expressão gênica, como ligação de microRNAs (miRNAs ou miRs), metilação da região promotora e alterações de sequências *enhancers*.

Torna-se relevante, portanto, avaliar a região não codificante quanto a presença de variantes e alterações relacionadas nestas áreas através de estudos *in silico* e de bioinformática, a fim de abrir espaço para a realização de estudos funcionais no futuro, visando a inclusão desta região nos

testes genéticos comerciais. Adicionalmente, em conformidade com atuais discussões sobre a constante reavaliação de VUS, e sua influência no manejo e seguimento dos pacientes, visto que estas variantes também são tratadas na prática clínica como um resultado negativo, é considerável observar o processo de categorização e empregabilidade dos critérios estabelecidos pelas diretrizes internacionais quanto diferentes populações e instituições de saúde.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Estratégias para localizar e selecionar informações

A presente revisão bibliográfica apresenta inicialmente dados epidemiológicos sobre câncer de mama e ovário no mundo, além de aspectos etiológicos destas neoplasias. Após, passa a focar em HBOC, seu fenótipo clínico e molecular, características histopatológicas dos tumores associados, e rastreamento e manejo dos pacientes com variantes patogênicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. E finalmente, traz bases para a investigação molecular da região não codificante destes genes – promotora, intrônicas, e 5' e 3' não traduzidas, e reclassificação de VUS através de informações sobre o número significativo de indivíduos com fenótipo clínico de HBOC, mas com resultados de testes genéticos negativos ou inconclusivos.

A estratégia de busca de informações para compor o texto envolveu o banco de dados do PubMed através do uso de termos específicos e suas combinações, conforme demonstrado na Figura 1. Além disso, procuramos por dados e referências em *websites* de organizações locais, como INCA, IMAMA e plataformas do Ministério da Saúde, e internacionais, como NIH, NHS WHO e IARC, e CDC entre os anos de 2020 e 2023.

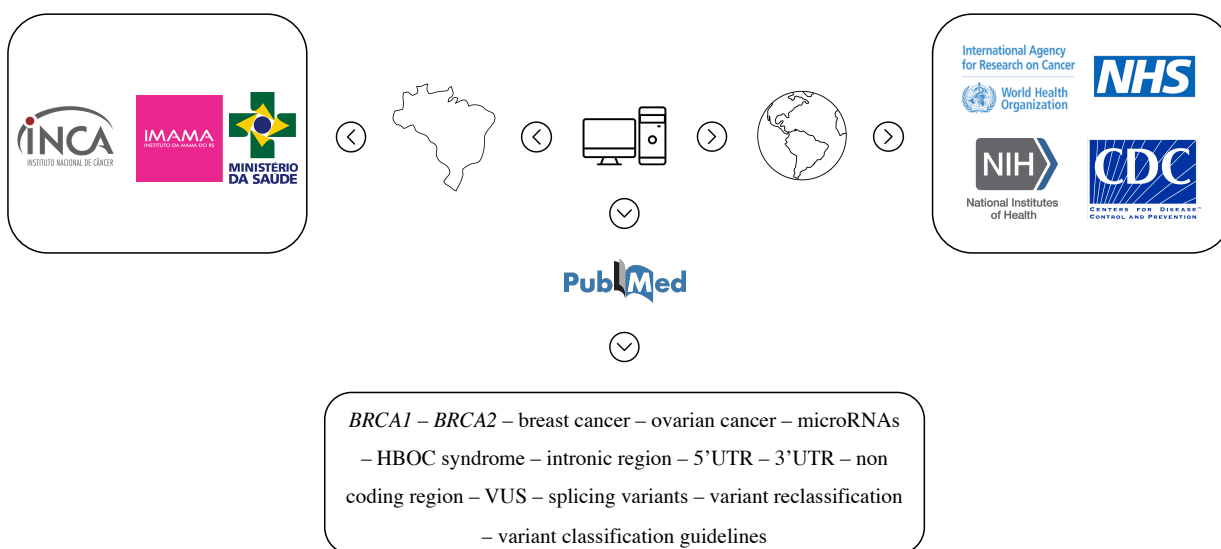


Figura 1. Estratégia de busca de informações para compor a revisão bibliográfica. Figura original.

2.2. Epidemiologia e Etiologia do Câncer de Mama e Ovário

As neoplasias malignas de mama e ovário representam problemas de saúde que requerem constante desenvolvimento e atualizações de políticas públicas de rastreamento, diagnóstico e tratamento. Atualmente, estes dois tipos de tumores ocupam entre as mulheres a primeira e oitava posição nas causas de morte por câncer, somando no ano de 2020, 684.996 óbitos decorrentes de câncer de mama e 207.252 de câncer de ovário (IARC, 2023; WHO, 2023).

Segundo as informações da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer de mama consiste atualmente na neoplasia maligna mais incidente no mundo para mulheres em qualquer faixa etária. Globalmente, apresentou em 2020 prevalência e incidência de 7.790.717 e 2.261.419 casos, respectivamente, resultando em uma taxa de incidência estimada de 47,8% (CDC, 2023; NHS, 2023; WHO, 2023; SUNG et al, 2021).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de mama é o segundo mais incidente em mulheres, estando atrás apenas dos tumores de pele não melanoma. Estima-se para o ano de 2023 o diagnóstico de 73.610 novos casos, com uma taxa de incidência ajustada de 41,89 casos a cada 100.000 mulheres. Para o estado do Rio Grande do Sul, especificamente, calcula-se uma taxa de 36,60 casos a cada 100.000 mulheres e um total de 3.720 ocorrências. Foram registrados 18.032 óbitos decorrentes desta neoplasia no ano de 2020 (A. C. CAMARGO, 2023; INCA, 2023).

Os tumores de mama são avaliados e classificados de acordo com seus subtipos histopatológicos, hormonais e moleculares para a determinação do manejo clínico da paciente, considerando tratamento e prognóstico. Entre os mais frequentes em sua classificação histológica estão o carcinoma invasor ductal e lobular, diagnosticados em 40-75% e 5-15% dos casos, respectivamente. Em nível molecular e hormonal (RH) são comumente averiguados os receptores de estrogênio (ER) e progesterona (PR), e a proteína HER2, (de *human epidermal growth factor 2*). Considerando estes biomarcadores, o subtipo mais comum é o estabelecido por HR- e HER2+, em 68-72% dos casos. É relevante mencionar ainda que cerca de 10-13% dos casos de câncer de mama são categorizados como triplo-negativos (TNBC, de *triple negative breast cancer*), apresentando negatividade tanto para os receptores hormonais, quanto para a proteína HER2. O subtipo TNBC caracteriza um grupo mais agressivo, apresentando poucas opções de tratamento direcionado e relacionado com desenvolvimento de metástases, baixa taxa de sobrevida e uma ocorrência em mulheres mais jovens (ALKABBAN; FERGUSON, 2022; MAYROVITZ, 2022; IARC, 2023; SBM, 2023; NCI, 2023).

Muitos estudos e instituições citam fatores ambientais, psicossociais e hormonais como as principais causas e riscos modificáveis associados ao desenvolvimento do câncer de mama,

quando também se sabe que 10-12% deles também são decorrentes de cargas genéticas e epigenéticas, como a presença de variantes germinativas patogênicas em genes de predisposição a estas neoplasias. Alto índice de massa corporal (IMC), sedentarismo, consumo de álcool em excesso e tabagismo, número de gestações e tempo de amamentação, idade da menarca, primeira gravidez e menopausa, assim como o uso de terapia de reposição hormonal influenciam significativamente o desenvolvimento da neoplasia (A. C. CAMARGO, 2023; ALKABBAN; FERGUSON, 2022; CDC, 2023; IARC, 2023; INCA, 2023; MAYROVITZ, 2022; NHS, 2023; SUNG et al., 2021; WHO, 2023).

Em um cenário oposto, o câncer de ovário ainda é considerado raro, apresentando uma prevalência global de 823.315 casos, com taxa estimada de incidência de 6,6% com 313.959 casos diagnosticados no ano de 2020. No Brasil, esta é a segunda neoplasia de origem ginecológica mais comum entre as mulheres e são estimados para o ano de 2023 o diagnóstico de 7.310 casos com uma taxa de incidência ajustada de 5,01 casos a cada 100.000 mulheres. Espera-se o reporte de cerca de 360 ocorrências no estado do Rio Grande do Sul, resultando em uma taxa de incidência ajustada de 3,24 casos (IARC, 2023; INCA, 2023; SUNG et al., 2021).

Sabe-se que 95% dos tumores de ovário possuem sua origem nas células epiteliais que revestem o órgão, e nas células estromais responsáveis pela produção dos hormônios femininos. Estes tumores ainda podem ser subclassificados de acordo com características histológicas e grau de proliferação celular como serosos ou mucinosos, endometrióides ou de células claras, e alto ou baixo grau, onde o mais comum é o adenocarcinoma epitelial invasivo seroso de alto grau. Cerca de 6-24% dos casos de câncer de ovário estão associados com causalidade hereditária. Desta forma, para a predição de manejo clínico, tratamento e prognóstico são realizados testes genéticos para a verificação da presença de variantes patogênicas germinativas em genes de alta e moderada penetrância para o desenvolvimento da neoplasia. Com o objetivo de ainda estabelecer causas ambientais, psicossociais e hormonais, visto que a maioria das mulheres diagnosticadas não apresentam fatores de riscos hereditários associados, estuda-se regularmente e consideram-se informações de históricos de infertilidade e/ou endometriose, uso de hormônios contraceptivos e de reposição, idade da menarca e da menopausa como possíveis causadores, além do histórico familiar, descendência e diagnóstico prévio de algum outro tipo de câncer, conforme será discutido nas próximas seções como possíveis causadores da doença (A. C. CAMARGO CANCER CENTER, 2023; ALKABBAN; FERGUSON, 2022; CDC, 2023; INCA, 2023; KOIKE FOLGUEIRA et al., 2018; LA VECCHIA, 2017; MAYROVITZ, 2022; NHS, 2023; SCULLY, 1977; SUNG et al., 2021).

Cerca de 70% dos casos de câncer ocorrem em países de baixa e média renda, e somente 26%

destes países possuem serviços de patologia disponíveis no setor público de saúde para a realização de um diagnóstico precoce, quando há uma suspeita, e adequado. Além disso, também existem consideráveis variações na disponibilidade de tratamentos e programas de rastreamento, com cerca de 85% em países desenvolvidos contra 15% em países subdesenvolvidos, segundo a OMS. Aponta-se ainda que 30-50% dos casos de câncer podem ser evitados com a não exposição aos fatores de risco específicos e aderência a programas de rastreamento apropriados. Isto resultaria também em maiores taxas de sobrevivência e menor morbidade, diminuindo o tempo de manejo e complexidade de tratamento do paciente (IARC, 2023; WHO, 2023).

As estratégias de rastreamento para um diagnóstico precoce de câncer de mama variam globalmente, mas apresentam significativos índices de efetividade. A taxa de sobrevivência de 5 anos após o diagnóstico desta neoplasia chega a 90% em países desenvolvidos, mas cai para 66% e 40% quando avaliada na Índia e África do Sul, respectivamente. A mortalidade padronizada por idade caiu cerca de 40% entre 1980 e 2020 e observou-se que os países que conseguiram alcançar este feito apresentaram taxas de redução de 2-4% por ano. Desta forma, considera-se que se todas as nações conseguissem alcançar um nível de redução de 2,5% ao ano, cerca de 2,5 milhões de mortes por câncer de mama poderiam ser evitadas entre 2020 e 2040 (WHO, 2023; SUNG et al., 2021).

No Brasil, o Ministério da Saúde orienta a realização de mamografia bianualmente a partir dos 50 anos ou ultrassonografia mamária para mulheres abaixo da faixa etária recomendada, quando considerado necessário. O aconselhamento da Sociedade Brasileira de Mastologia (SBM) difere e afirma que a mamografia deve ser executada antes, a partir dos 40 anos, visto que até 20% dos casos de câncer de mama ocorrem em mulheres entre 40 e 49 anos. É importante ressaltar ainda que Sistema Único de Saúde (SUS) possui diretrizes fundamentadas para seguimento e tratamento completo do câncer de mama, disponibilizando informações sobre autoexame das mamas, rastreamento, tratamento completo e rastreamento cirúrgico, com direito da paciente à reconstrução mamária (INCA, 2015; DA COSTA VIEIRA; FORMENTON; BERTOLINI, 2017; DOS SANTOS SILVA, 2018; IMAMA, 2023; INCA, 2023; OMS, 2023; SBM, 2023).

Com exceção do câncer de colo de útero, não existem estratégias de rastreamento ou medidas de prevenção específicas estabelecidas ou atualmente em testes para cânceres ginecológicos. Por exemplo, o diagnóstico do câncer de ovário ocorre em estágios mais avançados da doença, com a já apresentação de sintomas, mesmo que inespecíficos, como dor, e inchaço abdominal e pélvico, sangramento vaginal, fadiga e mudança de hábitos intestinais e/ou urinários. No contexto atual, cabe ao profissional de saúde orientar e solicitar os exames relacionados à paciente quando e se considerar necessário. No Brasil, a Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias no

Sistema Único de Saúde (CONITEC) aprovou em 2019 diretrizes de diagnóstico e tratamento da neoplasia maligna de ovário, com recomendação e pronta disponibilidade de tratamentos mais específicos e efetivos, objetivando maiores taxas de resolução clínica e sobrevida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; CDC, 2023; CONITEC, 2019; INCA, 2023; NHS, 2023).

2.3. Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditários (HBOC)

2.3.1 Epidemiologia e Etiologia de HBOC

A maioria dos tumores se desenvolvem a partir da interação entre componentes genéticos de um indivíduo e fatores de risco ambientais, caracterizando um processo denominado herança multifatorial. Sabe-se que 5-10% e 12-25% dos casos de câncer de mama e ovário, respectivamente, são resultado da herança de alterações e presença de variantes patogênicas germinativas em genes supressores tumorais ou proto-oncogenes, ocasionando, além da perda dos mecanismos de reparo de DNA após danos ou interrupção do ciclo celular, crescimento e proliferação descontrolados de células cancerosas (ACHATZ et al., 2020; KEMP et al., 2019; SHEIKH et al., 2015; VAROL et al., 2018).

Citados pela primeira vez na literatura na década de 90, os genes *BRCA1* e *BRCA2* estão associados com o desenvolvimento do câncer de mama e/ou ovário hereditários. Referenciados nas próximas seções deste trabalho, as proteínas funcionais codificadas por estes dois genes estão presentes em diversos tecidos do organismo e estão relacionadas com importantes processos de regulação transcricional e integridade e estabilidade genômica, sendo fundamentais para o reparo de danos ocorridos no DNA, como quebras da fita dupla ou falhas na formação da forquilha de replicação, através da recombinação homóloga (HR, de *Homologous Recombination*). A presença de variantes patogênicas nestes genes caracteriza HBOC (EVANS et al., 2018; MIKI et al., 1994; SHEIKH et al., 2015; STAFFORD et al., 2019; VAROL et al., 2018; WOOSTER et al., 1995).

Apesar de somente 0,1-0,2% da população mundial ser portadora de variantes patogênicas germinativas ou somáticas em *BRCA1/2*, sabe-se que sua presença confere um risco excepcionalmente alto para o desenvolvimento de neoplasias malignas de mama e/ou ovário, conforme indicado na Tabela 1. Sabe-se que variantes patogênicas em *BRCA1* são mais frequentes e são encontradas em 15-50% das famílias afetadas pela HBOC, dependendo da população. Estas conferem um risco de 20% para o surgimento de câncer de mama antes dos 40 anos de idade e de até 72% até os 70. Para o risco de desenvolvimento de câncer de ovário, esta taxa é de até 44% aos 70 anos de idade. Variantes patogênicas em *BRCA2* apresentam índices semelhantes. Estima-se a probabilidade de desenvolvimento de câncer de mama e ovário em até 69% e 17%,

respectivamente (ADAM et al., 2022; KUCHENBAECKER et al., 2017; STAFFORD et al., 2019; VAROL et al., 2018).

Tipo de câncer	Risco global para malignidade		
	População Geral	<i>BRCA1</i> mutado	<i>BRCA2</i> mutado
Mama	12%	55-72%	45-69%
Mama bilateral	2%	20-30%	40-50%
Mama masculino	0,1%	1-2%	6-8%
Ovário	1-2%	39-44%	11-17%

Tabela 1. Risco global para o desenvolvimento de câncer de mama ou ovário. Adaptado de Adam et al., 2022.

Estudos apontam que a prevalência de variantes patogênicas em *BRCA1/2* em indivíduos de ancestralidade africana e latino-americana é significativamente mais alta do que em outras etnias, sendo resultado do processo de imigração de espanhóis, portugueses e africanos vindos da Península Ibérica às Américas Central e do Sul no século 15. Este processo também explica o surgimento de mutações fundadoras no continente. As variantes de origem judaica Asquenaze, comumente encontradas no Brasil, Chile, Argentina e Peru, também podem ser rastreadas até o ano de 1492, quando estes deixaram a Europa, coincidindo com o início da colonização das Américas. Estima-se que variantes patogênicas em *BRCA1/2* estejam presentes em 1,2-15,6% dos pacientes com câncer na América Latina. Este percentual é ainda maior, de 15-28%, em pacientes jovens que apresentam câncer de mama e/ou ovário, especificamente (CHAVARRI-GUERRA; BLAZER; WEITZEL, 2017; DUTIL et al., 2015; HERZOG et al., 2021).

O fenótipo clínico de HBOC, além do histórico familiar positivo para câncer, costuma ser bastante característico, mas varia de acordo com as variantes patogênicas detectadas nos genes específicos. Os tumores de mama associados com *BRCA1* mutado tendem a ser mais agressivos, apresentando subtipo histológico medular de alto grau e TNBC quanto aos receptores hormonais e HER2. Além disso, estão associados com metástases para linfonodos regionais e outros sítios, como ossos, fígado, pulmão e cérebro. Já os tumores associados com *BRCA2* apresentam superexpressão de receptores de estrogênio e progesterona, e índices consideráveis de proliferação. Apesar disso, seu fenótipo não é considerado tão agressivo (ADAM et al., 2022; FAZBEM, 2023; NIH, 2023; ZHANG; LONG, 2015).

Estudos clínicos apontam também um risco aumentado para a evolução de câncer de mama bilateral em até 30% e 50% em pacientes com variantes patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2*,

respectivamente, conforme a Tabela 1. Já os tumores de ovário, em sua maioria adenocarcinomas serosos de alto grau, geralmente apresentam atipia nuclear, infiltrados linfocitários e alta contagem de mitoses em suas células, não se diferenciando tanto quanto aos genes onde estão localizadas as variantes patogênicas, apesar de mais comuns quando associados com *BRCA2*. Ao diagnóstico, podem estar associados com metástases para as tubas de falópio e útero. (ADAM et al., 2022; NIH, 2023; ZHANG; LONG, 2015).

É importante ressaltar que os pacientes portadores de HBOC não respondem de forma tão efetiva aos tratamentos convencionais existentes. Além de tratamentos diferenciados, existe uma série de recomendações e procedimentos sugeridos aos pacientes após o diagnóstico de HBOC, seguindo diretrizes internacionais. Para o rastreio de indivíduos assintomáticos recomenda-se a realização de exame clínico das mamas e ressonância magnética anualmente, após os 25 anos, adicionando-se a mamografia bilateral a partir dos 30 e até os 75 anos. Realiza-se também a ultrassonografia intravaginal e quantificação da proteína CA-125, estabelecida como biomarcadora para a neoplasia maligna de ovário. Além disso, são discutidas medidas de prevenção de risco, como a realização de mastectomia profilática, ooforectomia e salpingectomia entre 35 e 40 anos de idade, após a mulher ter tido o número desejado de filhos, assim como o uso de reposição hormonal (NCCN, 2023).

As recomendações citadas acima e suas limitações são regularmente tema de debates entre os corpos clínicos de instituições públicas e privadas em diversos países. No Brasil, os testes genéticos ainda não são disponibilizados pelo SUS e se tem pouca informação sobre a caracterização genética da população, devido à alta taxa de miscigenação. Além disso, hospitais e centros de diagnóstico com recursos não estão distribuídos igualmente pelas regiões do país, muitas vezes impossibilitando um rastreio adequado e a realização de exames de forma regular. Constantemente são realizadas pesquisas para o desenvolvimento de conceitos e práticas a serem sugeridas aos órgãos públicos, adequando estas medidas de seguimento para a população brasileira (ACHATZ et al., 2020; DE SOUZA TIMOTEO, 2018).

2.3.2. Critérios clínicos de HBOC

Assim como as recomendações estabelecidas citadas acima, existem critérios clínicos determinados por organizações internacionais para a realização de testes genéticos com a finalidade de detectar e avaliar variantes patogênicas em indivíduos que apresentam o fenótipo de HBOC. As referências definidas pelo *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) são as mais comumente utilizadas no Brasil e trazem indicadores de idade ao diagnóstico, histórico pessoal e familiar de câncer, assim como subtipo histológico e hormonal do tumor, caso presente.

Os principais estão descritos na Tabela 2.

Diversos estudos são constantemente realizados em diferentes populações visando avaliar a utilização e efetividade destes critérios, estabelecidos internacionalmente como um esquema padrão para todos os países. É importante considerar e ressaltar novamente que diferentes nações possuem ancestralidade e etnias distintas, e que apresentam também diferentes cargas genéticas. A América Latina, por exemplo, possui uma população nativa bastante diversa em aspectos de distribuição étnica, cultural e geográfica, além de, historicamente, apresentar uma alta taxa de migração. Soma-se a este fato uma quantidade limitada de pesquisas a nível epidemiológico sobre os genes de alta penetrância para o desenvolvimento de câncer de mama e ovário, aperfeiçoamento e utilização de critérios clínicos, além de variantes que sejam mais frequentes nestes grupos (ALEMAR et al., 2017; DE SOUZA TIMOTEO et al., 2018; GREENBERG et al., 2019; OLIVER et al., 2019).

A população brasileira é altamente miscigenada e distinta conforme as regiões em que o país se distribui, sendo composta por descendentes de africanos, asiáticos, europeus e de povos indígenas nativos. Desta forma, o estabelecimento de padrões para critérios clínicos de testagem genética e comparação de mutações fundadoras de etnias específicas tornam-se desafios ainda presentes nas pesquisas e instituições clínicas do país. Na América Latina, por exemplo, a proporção de mulheres jovens com câncer de mama e fenótipo TNBC é quase o dobro do observado em países desenvolvidos. Estas apresentam ainda uma média de idade de 44,6 anos e histórico familiar positivo com parentes de primeiro ou segundo grau também com diagnóstico de câncer de mama ≤ 50 anos. Estima-se ainda que cerca de 8,2% destas mulheres também possuem um histórico familiar positivo para câncer de ovário (ALEMAR et al., 2017; DE SOUZA TIMOTEO et al., 2018; HERZOG et al., 2021).

A Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS) atualizou em 2021 a publicação com critérios próprios estabelecidos para a população brasileira quanto à detecção de HBOC. Esta segue a mesma linha dos critérios já previamente propostos pelo NCCN, mas inclui a realização obrigatória da avaliação de mutações fundadoras Asquenaze *BRCA1* 185delAG (p. Glu23fs), *BRCA1* 5382insC (p. Gln1756fs), e *BRCA2* 6174delT (p. Ser1982fs), assim como a utilização de metodologias específicas dependendo do histórico do paciente e os indicadores nos quais se encaixa (ANS, 2021).

Um estudo realizado no sul do Brasil comparou a prevalência de detecção de variantes patogênicas e os critérios clínicos utilizados para a determinação da realização de testes genéticos. O mesmo demonstrou que alguns critérios clínicos específicos determinados pela *American Society of Clinical Oncology* (ASCO), como históricos familiares com ≥ 2 casos de câncer de

mama; ≥ 1 caso de câncer de ovário; ≥ 3 casos de câncer de mama em indivíduos com < 50 anos; ou irmãs diagnosticadas com câncer de mama com < 50 anos, apresentaram altas taxas preditivas em nossa população (ALEMAR et al., 2017).

Histórico de câncer de mama.	Critérios e cenários considerados.	
Pessoal	Diagnosticado ≤ 50 anos de idade.	
	Diagnosticado em qualquer idade.	Fenótipo triplo-negativo.
		Múltiplos tumores primários na mama simultâneos ou metacrônicos.
		Câncer de mama masculino.
		Ancestralidade judaica Asquenaze.
		Fenótipo lobular com histórico familiar pessoal ou familiar de câncer gástrico difuso.
		Histórico familiar com ≥ 1 parente com câncer de mama diagnosticado ≤ 50 anos de idade; ou câncer de mama masculino; ou câncer de ovário; ou câncer de pâncreas; ou câncer de próstata de alto risco ou metastático.
		Histórico familiar com ≥ 2 parentes com câncer de mama ou câncer de próstata.
Histórico familiar com ≥ 3 diagnósticos de câncer de mama.		
Familiar	Indivíduo afetado ou não com um parente de primeiro ou segundo grau que preenche os critérios listados acima.	
	Indivíduo não afetado, mas com probabilidade $> 5\%$ de portar uma variante patogênica em <i>BRCA1/2</i> de acordo com modelos de probabilidade.	
Histórico de câncer de ovário.	Critérios e cenários considerados.	
Pessoal	Diagnosticado em qualquer idade.	Fenótipo epitelial.
		Câncer de tubas de falópio.
		Câncer peritoneal.
Familiar	Indivíduo não afetado com parente de primeiro ou segundo grau que apresenta câncer de ovário epitelial; ou de tubas de falópio; ou peritoneal.	
	Indivíduo não afetado, mas com probabilidade $> 5\%$ de portar uma variante patogênica em <i>BRCA1/2</i> de acordo com modelos de probabilidade.	

Tabela 2. Critérios clínicos considerados para a testagem de genes de alta penetrância em indivíduos com suspeita de HBOC. Adaptado de NCCN, 2023.

A definição de critérios específicos e altamente preditivos para diferentes etnias representa uma significativa redução de custos em relação às metodologias diagnósticas utilizadas, assim como permite também eleger de uma forma mais adequada os indivíduos que devem ser testados, especialmente em países onde os recursos são limitados (ALEMAR et al., 2017; DE SOUZA TIMOTEO et al., 2018).

2.4. Genes *BRCA1* e *BRCA2* e seu papel no reparo de DNA via Recombinação

Homóloga

O gene *BRCA1* está localizado no braço longo do cromossomo 17 e é composto por 22 éxons, contendo cerca de 110 quilobases (kb) de DNA e codificando uma proteína funcional de 1.863 aminoácidos. Já *BRCA2* está localizado no braço curto do cromossomo 13 e é formado por 26 éxons, resultando em uma proteína funcional constituída por 3.418 aminoácidos. Ambos atuam na HR, maior via de reparo de quebras de fita dupla do DNA do nosso genoma, de forma conservativa (GENECARDS, 2023; PRAKASH et al., 2015).

As quebras de fita dupla (DSB, de *double strand breaks*) representam o dano mais prejudicial e deletério que pode acontecer ao DNA, quando não programado, necessitando um reparo imediato a fim da manutenção da integridade genômica e sobrevivência celular no organismo humano. Estas quebras podem ser induzidas por agentes exógenos, como contato com radiação ionizante, e algumas substâncias químicas específicas, como metano sulfonato de etila, camptotecina e hidroxiureia. Os produtos metabólicos endógenos de espécies reativas de oxigênio (ROS) e forquilhas de replicação estagnadas e locais de danos ocasionados por ligações cruzadas de DNA também são responsáveis por sua ocorrência (HOPPE et al., 2018; LI et al., 2019a; O’KANE; CONNOR; GALLINGER, 2017; PRAKASH et al., 2015; WRIGHT; SHAH; HEYER, 2018).

A via de HR ocorre nas fases de síntese (S) e crescimento celular (G2) do ciclo celular, visto a disponibilidade da cromátide irmã, ou seja, uma cópia idêntica à dupla fita quebrada, para ser utilizada como molde para o reparo do dano. O processo e suas principais proteínas reguladoras, estão demonstrados nas Figura 2 e 3, respectivamente. Basicamente, pode-se dividir o mesmo nas seguintes etapas: inicialmente ocorre a ligação de proteínas especializadas nas extremidades quebradas de cada fita, digestão das extremidades 5’ por endonucleases, com o objetivo de expor as regiões 3’, que resultaram em fitas simples (ssDNA, de *single strand DNA*). Depois, o ssDNA

resultante é revestido pela proteína RAD51, tornando-se hábil para rastrear e invadir o filamento de sua cromátide irmã, idêntica e não danificada, para utilizá-la como molde, garantindo um reparo preciso. A extremidade 3' do filamento invasor, portanto, desloca a cromátide irmã e forma uma alça D e dá início à síntese contínua de DNA. Este processo segue até que ambos os filamentos se desenrolem e seus moldes se pareiem, restaurando a sequência original antes do dano (GRIFFITHS et al., 2022; HOPPE et al., 2018; LI et al., 2019a; O'KANE; CONNOR; GALLINGER, 2017; PRAKASH et al., 2015; WRIGHT; SHAH; HEYER, 2018).

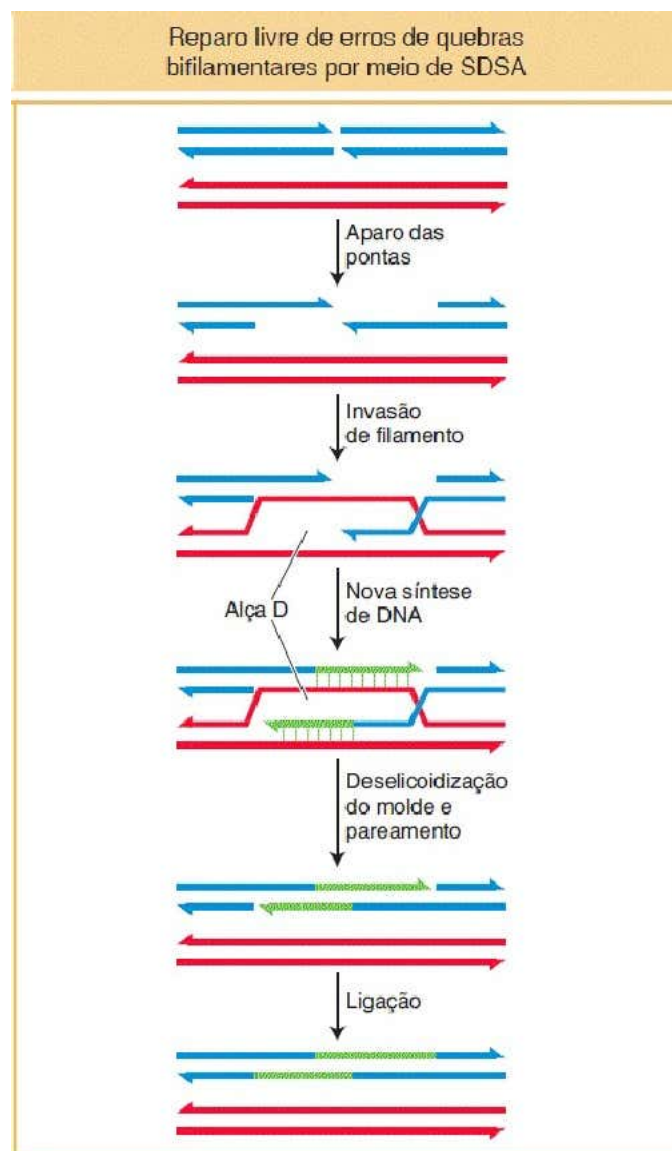


Figura 2. Processo de reparo de quebra de fita dupla através de HR. GRIFFITHS et al., 2022, p. 534.

A proteína BRCA1 atua formando complexos proteicos de múltiplas funções celulares, como

regulação da transcrição, ativação de *checkpoints* do ciclo celular e no reparo do DNA, conforme previamente mencionado. Na HR, interessantemente, seus papéis estão diretamente relacionados com sua estrutura funcional, demonstrada na Figura 2, atuando em duas fases do processo: na ressecção da fita 5' danificada para a geração do ssDNA, conforme descrito acima, e brevemente na ligação da recombinase RAD51 a este ssDNA. Pode-se dizer que BRCA1 está segmentada em três regiões: a porção inicial com o domínio RING (*Really Interesting New Gene*), uma parte central que engloba seu maior éxon, 11, que também é um *hotspot* de variantes patogênicas, seguido de um domínio super hélice (de *coiled coil*), e uma sequência de repetições em tandem em C-Terminal denominada BRCT (HOPPE et al., 2018; LI et al., 2019a; O'KANE; CONNOR; GALLINGER, 2017; PRAKASH et al., 2015; WRIGHT; SHAH; HEYER, 2018).

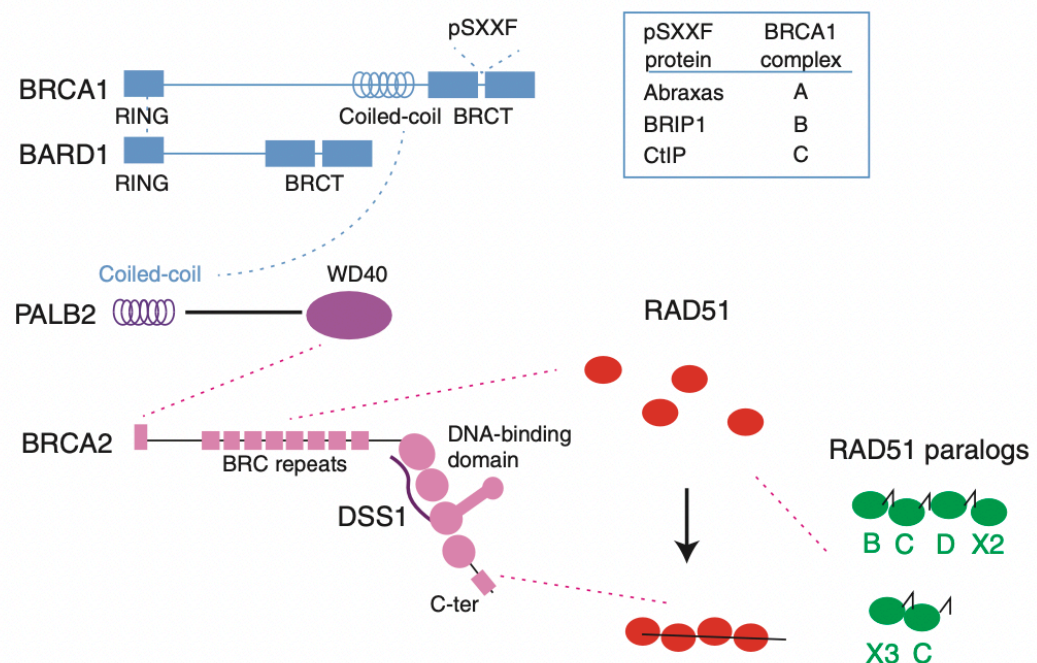


Figura 3. Interações entre as proteínas *BRCA1/2* durante o processo funcional de HR PRAKASH et al., 2015.

Pode-se dizer que os domínios RING e BRCT de BRCA1 atuam de forma semelhante. RING é responsável pela formação de um heterodímero junto de BARD1, complexo que contribui para interação com E3 ubiquitina ligases que posteriormente irão catalisar a ligação e o acúmulo de proteínas especializadas para as extremidades 5' e 3'. Já BRCT atua comunicando-se com diversas outras proteínas através do reconhecimento de porções fosforiladas. Abraxas/FAM175A, BRIP1/BACH1 e CtIP/RBBP8 formam os complexos BRCA1-A, BRCA1-B e BRCA1-C,

respectivamente. Estes atuam na regulação e sinalização do sítio da quebra da fita dupla, ressecção do filamento 5' e desdobramento de estruturas secundárias de DNA que possam vir a se formar e impedir a replicação posteriormente. Já a porção de super hélice de BRCA1 atua interagindo com PALB2 para o recrutamento de proteínas mediadoras, como BRCA2, que irão auxiliar a ligação de RAD51 no ssDNA proveniente do filamento 3' para que síntese da nova fita possa de fato ocorrer, sendo esta a principal função de BRCA2, formada por 8 repetições BRC conservadas e um domínio DBD (de *DNA Binding Domain*) (HOPPE et al., 2018; LI et al., 2019a; O'KANE; CONNOR; GALLINGER, 2017; PRAKASH et al., 2015; WRIGHT; SHAH; HEYER, 2018).

A maioria das síndromes de predisposição hereditárias ao câncer é herdada da forma autossômica dominante e em heterozigose, onde a variante germinativa patogênica encontra-se localizada em somente um dos dois cromossomos, representando dois alelos diferentes, um normal e outro alterado. Muitas vezes, contudo, o processo de tumorigênese está associado a um segundo evento denominado perda de heterozigose (LOH, de *loss of heterozygosity*), onde o alelo normal ainda sofre uma mutação somática e torna-se igualmente disfuncional. Desta forma, com a perda completa do mecanismo de reparo de DNA via HR, as células passam a buscar por outros mecanismos de reparo disponíveis. O principal destes é a união de extremidades não homólogas (NHEJ, de *Non Homologous End Joining*), que atua de forma semelhante, mas não tão específica quanto HR. Em NHEJ, ao invés de ocorrer a síntese de um novo filamento, utilizando o antigo como molde, as duas extremidades entre a quebra são apenas unidas novamente, resultando, portanto, na adição ou deleção de pares de base envolvidos no dano. Desta forma, este processo pode resultar igualmente em alterações patogênicas adicionais que levam a proliferação celular incorreta e posterior tumorigênese (GEENEN et al., 2017; KNUDSON, 1971; LORD; ASHWORTH, 2017; TAYLOR; ESKANDER, 2017).

2.4.1. Variantes Patogênicas em *BRCA1/2*

Variantes genéticas *drivers* que contribuem para a proliferação, invasão tecidual, metástase e evasão da apoptose podem estar presentes em *BRCA1/2* como substituições de bases, deleções ou inserções de fragmentos de DNA, e rearranjos ou amplificação de sequência. Assim, mesmo que muitos tumores apresentem as mesmas características histopatológicas, suas assinaturas genômicas demonstram grande heterogeneidade. A caracterização tumoral a nível molecular, portanto, é de extrema importância para a medicina personalizada, apontando elementos de prognóstico e predição de resposta às terapias alvo (DE SILVA; TENNEKOON; KARUNANAYAKE, 2019; LAL et al., 2017).

Os testes genéticos comerciais realizados nos genes *BRCA1/2* sequenciam apenas a partir do segundo éxon, onde se inicia, de fato, a região codificante que irá formar a proteína, e 5 a 10 pares de bases dos íntrons adjacentes a estes éxons. A região não codificante, promotora, 5' UTR, 3' UTR, íntrons e o primeiro éxon, não é sequenciada nas análises convencionais, podendo eventualmente omitir variantes localizadas nestas áreas. Avalia-se também que estes genes não apresentam muitas regiões *hotspots* estabelecidas, onde as variantes patogênicas ocorrem em maior frequência e que, conseqüentemente, se tornam alvos de testes genéticos. Sabe-se que o éxon 11 de *BRCA1* pode abrigar um significativo número de variantes (DOS SANTOS et al., 2018a, 2018b; EVANS et al., 2018; HOLSTEGE et al., 2009; LI et al., 2018; OSSA; TORRES, 2015).

Conforme citado anteriormente, algumas populações específicas e já estudadas quanto suas cargas genéticas apresentam mutações fundadoras, ou seja, uma variante que foi transmitida de geração em geração por seus ancestrais e está presente em uma frequência significativa neste grupo. As principais variantes fundadoras conhecidas em *BRCA1/2* estão listadas na Tabela 3. Novamente, destaca-se que a população brasileira não apresenta nenhuma variante patogênica fundadora própria, mas grupos de descendência Asquenaze estão presentes no país e são considerados pelas diretrizes da ANS.

Gene	Alteração	População
<i>BRCA1</i>	c.68_69delAG/185delAG/187delAG (p.Glu23ValfsTer17)	Europa (Judaica Asquenaze)
	c.115T>G (p.Cys39Gly)	Groelândia (Amassalik)
	c.815_824dupAGCCATGTGG/943ins10 (p.Thr276AlafsTer14)	África Ocidental
	c.5266dupC/5385insC/5382insC (p.Gln1756ProfsTer74)	Europa (Judaica Asquenaze)
<i>BRCA2</i>	c.771_775delTCAAA/999del15 (p.Asn257LysfsTer17)	Islândia
	c.5073dupA (p.Trp1692MetfsTer3)	Estados Unidos (Amish Somerset County, Pennsylvania)
	c.5946delT/6174delT (p.Ser1982ArgfsTer22)	Europa (Judaica Asquenaze)

Tabela 3. Variantes fundadoras significativamente encontradas em diferentes populações. Adaptado de Adam et al., 2022.

2.4.2. Mecanismos Potenciais Terapêuticos para HBOC

Apesar de apresentarem boa tolerância e resposta aos medicamentos à base de platina e taxano em cenários de doença localizada, os pacientes que apresentam variantes patogênicas nos genes *BRCAl/2* já possuem acesso às terapias de alvo molecular. Aprovados entre 2014 e 2018, os inibidores de poli-adenosina difosfato-ribose polimerase (iPARP) podem ser utilizados para o tratamento de câncer de mama e ovário metastáticos, e como terapia de manutenção associados com radioterapia, imunoterapia ou quimioterapia (ADAM et al, 2022; GEENEN et al., 2017; LORD; ASHWORTH, 2017; TAYLOR; ESKANDER, 2017).

Esta classe de medicamentos atua inibindo as enzimas PARP1 e PARP2, envolvidas em diferentes processos de reparo de DNA, como HR e NHEJ. Desta forma, quando as células defeituosas que seguem se reproduzindo são expostas aos iPARPs, perdem a sua capacidade de reparo de DNA, resultando em um acúmulo de danos e apoptose (ADAM et al., 2022; GEENEN et al., 2017; LORD; ASHWORTH, 2017; TAYLOR; ESKANDER, 2017).

A quimioprevenção, indicada para pacientes com variantes patogênicas identificadas, mas sem o desenvolvimento da neoplasia, também pode ser realizada. Pacientes com variantes em *BRCA2*, que apresentam um fenótipo menos agressivo, e com receptores de estrogênio e progesterona positivos, podem fazer uso de tamoxifeno por 5 anos, a partir dos 35 anos. Esta estratégia demonstra uma redução de risco de até 68%. Diferentemente, pacientes com variantes patogênicas em *BRCAl* não possuem estratégias de quimioprevenção sugeridas devido seu fenótipo mais agressivo (SBM, 2023).

2.5. Testes Genéticos

Após considerar e listar os critérios clínicos avaliados e o histórico familiar da paciente, a definição de qual tipo de teste genético a ser realizado é fundamental para a detecção precisa e direcionada de variantes nos genes associados à HBOC. Nesta etapa pode-se considerar dois cenários: indivíduos que já tenham alguma mutação específica detectada na família, e indivíduos que apresentam critérios para a realização de um teste genético, mas nenhuma variante previamente identificada em seus familiares (ACS, 2023; LAL et al., 2017; LARSEN; HAIDLE; WHITWORTH, 2015; LIEDTKE; KOLBERG, 2017; LYNCH; VENNE; BERSE, 2015; NIH, 2023).

Os indivíduos com histórico familiar positivo para uma mutação conhecida são geralmente aconselhados a optarem pela realização de um teste que utiliza metodologias específicas àquela variante, como PCR em tempo real, *high resolution melt* (HRM) e sequenciamento de Sanger para

detecção de mutações de ponto, e *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) para deleções, inserções e rearranjos. Comumente, estes são utilizados também para avaliação de risco de HBOC, quando ainda não houve o diagnóstico de câncer e medidas de controle e profilaxia estão sendo estudadas. No Brasil, contudo, a maioria dos indivíduos é encaminhado ou busca por serviços de oncogenética quando a neoplasia já foi diagnosticada, e não em condições de rastreamento (ACHATZ et al., 2020; LYNCH; VENNE; BERSE, 2015).

Em outras circunstâncias, quando um paciente se encaixa nos critérios clínicos para testagem, mas não possui informações sobre qualquer teste genético prévio, pode ser oferecida a ele a possibilidade de realização de um painel de genes de alta, moderada ou até baixa penetrância para síndromes de predisposição hereditárias ao câncer. Comercialmente já existem painéis de 21 até 97 genes a serem sequenciados. Quando se procura pesquisar somente *BRCA1/2*, o sequenciamento de Sanger e MLPA também podem ser utilizados (LAL et al., 2017; LARSEN; HAIDLE; WHITWORTH, 2015; LIEDTKE; KOLBERG, 2017; LYNCH; VENNE; BERSE, 2015).

O processo citado acima está detalhado na Figura 4. Quando o paciente é encaminhado ao serviço de oncogenética, verifica-se se ele se encaixa nos critérios propostos para realização do teste. Depois, em um segundo momento, caso apresente histórico familiar positivo, procura-se descobrir se existe algum teste realizado e/ou alguma mutação previamente detectada nesta família. Em casos positivos, o paciente realiza um teste mais específico. Já nos casos em que não há informações sobre variantes segregando na família, são sugeridos e realizados testes mais amplos, que abrangem toda a região codificante de *BRCA1/2* ou painéis de NGS de múltiplos genes, conforme já citado anteriormente.

Os resultados obtidos, representados no ícone 4 na Figura 4, determinam o manejo clínico subsequente dos pacientes. Entre estes, existem três possíveis cenários: o primeiro, onde o teste específico à variante apresenta um resultado negativo ou inconclusivo e o indivíduo possui duas opções entre realizar um teste amplo ou seguir para o tratamento convencional estabelecido para as características histopatológicas do tumor; o segundo cenário, onde o teste específico apresenta um resultado positivo para a detecção da variante patogênica e o paciente é encaminhado para um tratamento direcionado com inibidores de PARP e medidas de controle; e o terceiro contexto, com a realização de um teste abrangente que apresenta um resultado negativo ou inconclusivo e o paciente é, novamente, encaminhado para um tratamento convencional.

Destaca-se, portanto, também na Figura 4 em vermelho, a proposta de avaliação das regiões não codificantes para os casos de testes negativos ou inconclusivos, podendo representar uma mudança no manejo clínico deste grupo de pacientes.

Conforme citado anteriormente, os testes genéticos ainda não são cobertos pelo SUS no Brasil, e somente a partir de 2014 passaram a ser oferecidos por redes privadas de saúde para pacientes com o diagnóstico de câncer e que preenchessem quase todos os critérios para análise. Deste modo, devido seu alto custo, e por serem oferecidos em sua maior parte em grandes centros de saúde, o número de brasileiros que possuem acesso a estes testes ainda é baixo, e o rastreamento precoce é quase inexistente. Instituições e órgãos governamentais frequentemente abordam o estabelecimento de políticas públicas voltadas para a realização dos testes genéticos e a importância da distribuição igualitária destes serviços nas diferentes regiões do país (ACHATZ et al., 2020; DA COSTA VIEIRA; FORMENTON; BERTOLINI, 2017; DE SOUZA TIMOTEO et al., 2018).

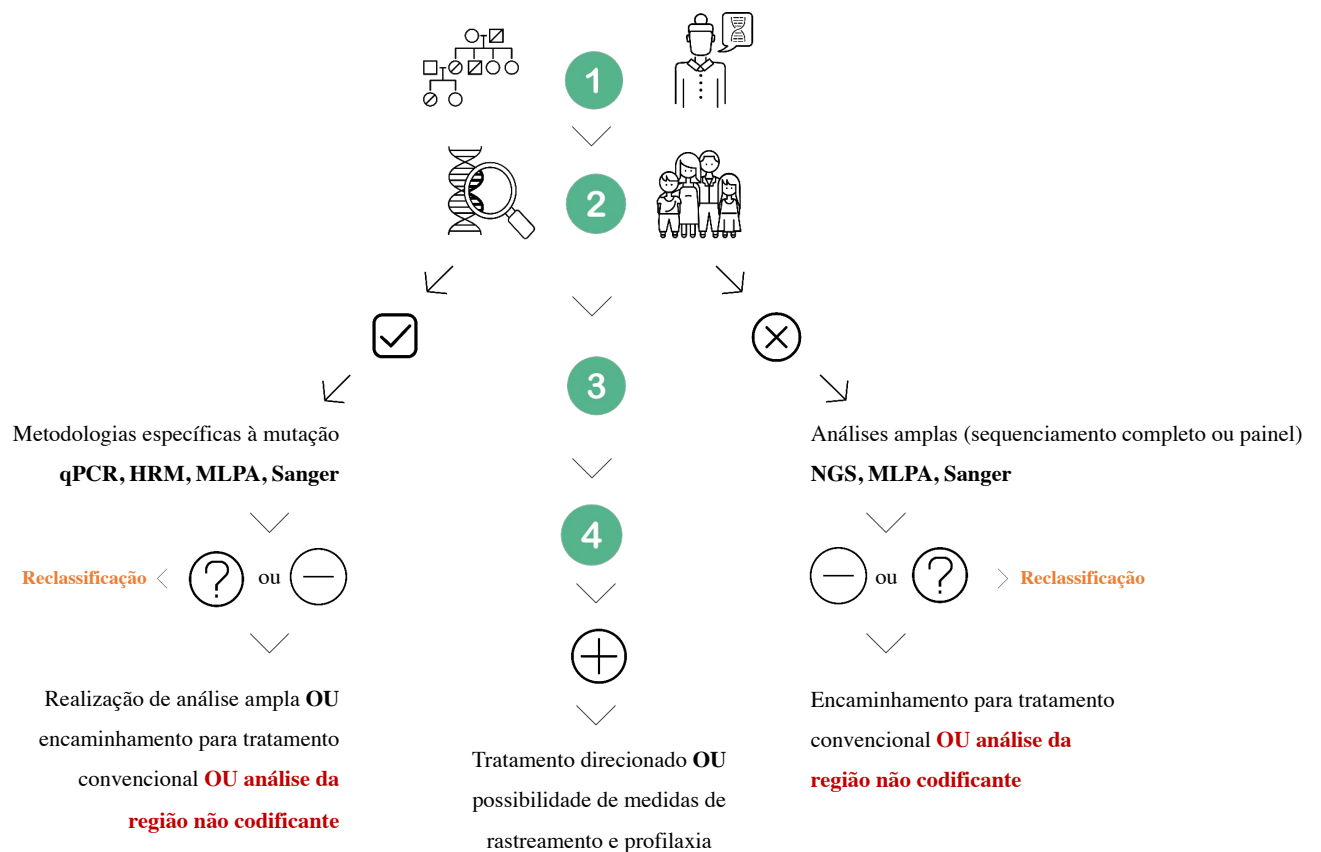


Figura 4. Avaliação e manejo de casos suspeitos de HBOC. Figura original.

Em contraste com outros países como Alemanha e Estados Unidos, onde existe uma série de painéis disponíveis e oferecidos aos indivíduos durante o aconselhamento genético de acordo com seu histórico familiar e tipo de câncer, o Brasil ainda dispõe de opções limitadas para análise dos genes de alta penetrância em casos suspeitos de síndromes de predisposição hereditárias ao

câncer. Além disso, existem poucas informações expressivas sobre os genes de moderada e baixa penetrância relacionados à HBOC no país. É significativo mencionar o trabalho realizado em 2018 por De Souza Timoteo e colaboradores que, empregando painéis customizados de 33 genes relacionados à predisposição hereditária de câncer mama e ovário, e outros 94 relacionados a outras neoplasias, identificou que um terço das variantes patogênicas ocorrem em genes de moderada penetrância (DE SOUZA TIMOTEO et al., 2018).

Atualmente não existem diretrizes específicas para orientar quanto à escolha do teste genético ou metodologia. Contudo, é importante ressaltar que com o avanço das técnicas de sequenciamento completo do genoma, a utilização de painéis de múltiplos genes se tornou mais comum devido seu custo-benefício no âmbito comercial. O NGS, todavia, resulta na geração de muitas informações relacionadas a muitos genes. Desta forma, existe também uma demanda e necessidade de interpretação correta das variantes detectadas, utilizando ferramentas de bioinformática e estudos funcionais, e reportando as mesmas em bancos de dados populacionais, de modo que o amplo resultado gerado não se torne um fator de confusão (LARSEN; HAIDLE; WHITWORTH, 2015; LIEDTKE; KOLBERG, 2017; LYNCH; VENNE; BERSE, 2015; WELSH et al., 2017).

As variantes encontradas nos testes genéticos são classificadas quanto à sua patogenicidade de acordo com critérios estabelecidos por diretrizes internacionais. A maioria dos laboratórios utiliza as normas do *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG), desenvolvidas em 2015 e que as categorizam como patogênicas (P), provavelmente patogênicas (PP), benignas (B) e provavelmente benignas (PB) conforme informações clínicas, funcionais e *in silico*, além de referências de bancos de dados populacionais. Contudo, pode-se utilizar também as diretrizes *Semiquantitative, Hierarchical Evidence-Based Rules for Locus Interpretation* (Sherloc), elaboradas em 2017 como uma espécie de refinamento do ACMG, especificando seus critérios pré-existentes, e do *Evidence-Based Network for Interpretation of Germline Mutant Alleles* (ENIGMA), publicado pela primeira vez em 2012 com normas direcionadas exclusivamente para os genes *BRCA1/2*. Este último é constantemente aperfeiçoado por seu comitê de criação, e a última atualização data do ano de 2021. É importante ressaltar que estas três diretrizes possuem critérios e sistemas diferentes de avaliação e classificação de variantes, podendo diferir entre seus resultados. Atualmente ainda não existe um consenso sobre qual guia utilizar em casos ou populações específicas. Este fato tem sido um constante tema de discussão entre instituições e corpos clínicos, visto diferentes níveis de informação clínica e experimental, tanto dos pacientes, quanto das variantes em questão, podendo influenciar fortemente na determinação de patogenicidade (GLOSS; DINGER, 2018; NYKAMP et al., 2017; SPURDLE et

al., 2012; RICHARDS et al., 2015).

Ainda, quando uma variante detectada está ausente dos bancos de dados populacionais e não se possui evidências clínicas, experimentais, funcionais e *in silico* para classificá-la, ela é apontada como uma VUS, ou seja, um resultado inconclusivo. As VUS devem ser constantemente reavaliadas, a fim de verificar uma possível mudança em sua categorização, uma vez que ao longo do tempo sua frequência e disponibilidade de informações podem mudar.

2.5.1. Resultados Inconclusivos e Importância de Reavaliação de Variantes em *BRCA1* e *BRCA2*

O percentual de pacientes que apresentam histórico familiar, fenótipo clínico e histopatológico compatíveis com HBOC, mas sem nenhuma variante patogênica detectada ou com um resultado inconclusivo ainda é bastante alto. Estima-se que em média 5-10% dos testes genéticos para *BRCA1/2* resultam em VUS, dependendo a etnia do indivíduo, podendo chegar a 17% e 21% em populações de origem americanos africanos e hispânicos, respectivamente. Na América Latina, um estudo realizado em 2021 por Herzog e colaboradores, considerando pacientes provenientes do Brasil, México, Peru, Porto Rico e Colômbia, encontrou uma taxa média de detecção de VUS em *BRCA1/2* de 14%, e no Brasil, em particular, de 12,2%. Destas variantes encontradas, é importante ressaltar que 57% delas não haviam sido reportadas no ClinVar, um dos mais importantes bancos de dados que relaciona variantes genéticas depositadas e fenótipos clínicos (ALEMAR et al., 2017; AZZOLLINI et al., 2016; BECK et al., 2020; HERZOG et al., 2021; MANCHANDA et al., 2018; VALENCIA et al., 2017).

Conforme previamente citado, a classificação das variantes detectadas nos testes genéticos segue critérios estabelecidos por diretrizes de comitês internacionais, considerando presença de avaliações funcionais e *in silico*, reporte em bancos de dados populacionais e frequência alélica, histórico familiar e pessoal, e estudos de segregação. Com a crescente demanda por testes genéticos abrangentes e painéis de múltiplos genes, a detecção de novas variantes, ainda sem informações epidemiológica e evidência clínica, vem aumentando exponencialmente. Pode-se justificar o fato de que as taxas de VUS são ainda maiores em países subdesenvolvidos devido à distribuição desigual de centros que realizam estes testes e que possuem recursos físicos, humanos e financeiros para realização de avaliações funcionais destas variantes detectadas e estudos de segregação nos próximos familiares. Além disso, estas populações são, geralmente, pouco estudadas quanto sua carga genética e não representadas adequadamente nos bancos de dados populacionais existentes. Desta forma, o processo de aferição de critérios estabelecidos por

instituições internacionais, mas principalmente, por países desenvolvidos ou em desenvolvimento, torna-se mais complexo.

Atualmente não há uma determinação sobre a regularidade de reavaliação de VUS e qual guia de classificação utilizar. Assim, a maioria das instituições segue um padrão próprio para verificar o surgimento de novas informações sobre as variantes na literatura e em bancos de dados. Estima-se que até 14,7% das VUS detectadas em *BRCA1/2* são reclassificadas em menos de dois anos, e que em média 20% delas são recategorizadas como benignas e apenas 1% como patogênicas. Este período, entre diagnóstico e reclassificação, impacta diretamente no manejo clínico e aconselhamento genético destes pacientes e de seus familiares, quando aplicável, considerando a necessidade de medidas de rastreamento, profilaxia ou de tratamento específico. Novamente, as VUS são referidas como um resultado negativo e inicialmente, seus portadores são direcionados aos procedimentos standardizados de acordo com o subtipo hormonal e histológico do tumor (CALÓ et al., 2010; CHERN et al., 2019; ECCLES et al., 2015; LINDOR et al., 2013; SANTOS et al., 2014; WELSH et al., 2017).

Pode-se mencionar ainda alguns trabalhos realizados a nível psicológico destes indivíduos, a partir da implicação emocional de pertencer a uma família HBOC positiva, experiência e expectativa de realização do teste genético - em busca de uma possível resposta para seu diagnóstico, e percepção de risco. A maioria destes associa HBOC com expressões citando morte prematura, isolamento social e planejamento da vida a curto prazo, porque supõem que a neoplasia pode se desenvolver e manifestar a qualquer momento. Comprova-se que os resultados inconclusivos ou negativos não representam um desfecho de caso ou alívio, mas sim um aumento nos níveis de estresse e ansiedade, em graus ainda mais altos do que nos indivíduos detectados com variantes patogênicas ou benignas. Estes consideram ainda que o risco continua elevado ou no mesmo nível já esperado para o desenvolvimento de câncer, e que carregam uma mutação que ainda não tenha sido de fato classificada ou identificada corretamente pelo teste (BAKOS et al., 2008; CULVER et al., 2013; HAROUN et al., 2011; RICHTER et al., 2013; STAFFORD et al., 2019; WELSH et al., 2017).

Desta forma, estudos avaliando o processo de reclassificação de VUS, assim como os critérios utilizados e diretrizes escolhidas em diferentes populações e em diferentes genes devem ser realizados para incentivar tanto uma maior regularidade, quanto na determinação de padrão de tempo para reavaliação futuramente, além de avaliar quais normas e especificações são mais tangíveis e plausíveis para etnias e grupos específicos, sempre visando uma maior agilidade na determinação do manejo dos pacientes.

2.5.2. Resultados Negativos

A probabilidade de detecção de variantes patogênicas nos genes *BRCA1/2* é de até 20%, dependendo quais critérios considerados para o paciente e a metodologia do teste genético realizado, seja um painel, sequenciamento completo ou *loci* específico, totalizando também, portanto, um índice de aproximadamente 40% diagnósticos negativos. Faz-se necessário estudar mecanismos e regiões regulatórias dos genes que estão comumente fora da área de cobertura das análises convencionais, a fim de elaborar e garantir um manejo clínico e terapêutico adequado para estas pacientes (ALEMAR et al., 2017; AZZOLLINI et al., 2016; BECK et al., 2020; MANCHANDA et al., 2018; VALENCIA et al., 2017).

Considerando este cenário, faz-se importante refletir, assim como demonstrado na Figura 4 previamente, sobre a metodologia utilizada no teste. Alguns pacientes, diante de uma análise para mutação específica negativa, optam pela realização de um painel de múltiplos genes por NGS, capaz de identificar variantes em outros oncogenes e supressores tumorais de moderada ou baixa penetrância para HBOC, como *TP53*, *ATM*, *BRIP1*, *PALB2*, *CHEK2*, *RAD51C*, entre outros. Variantes patogênicas nestes genes representam um risco relativo de 0,5 a 5 para o desenvolvimento de câncer de mama e/ou ovário. Estima-se que em cerca de 10% das pacientes que possuem um teste de mutação específica para *BRCA1/2* já identificada na família negativo, detectam a presença de variantes patogênicas através da realização de painéis de múltiplos genes (BRADBURY et al., 2020; CASTÉRA et al., 2018; DESMOND et al., 2015; KAPOOR et al., 2015; SHAO et al., 2020; SHIOVITZ; KORDE, 2015).

Atualmente ainda existem algumas ambiguidades quanto ao manejo e tratamento de pacientes *BRCA*. Não se pode afirmar que a não detecção de variantes ou a presença de VUS representam um risco menor de desenvolvimento de neoplasias em indivíduos provenientes de famílias HBOC positivas. Por este fato, cerca de 35% das mulheres que recebem um diagnóstico negativo ou inconclusivo acabam optando, mesmo assim, por medidas de profilaxia, como a mastectomia e/ou ooforectomia (CHERN et al., 2019; WELSH et al., 2017).

O tratamento com inibidores de PARP, oferecido aos pacientes com *BRCA1/2* positivo, está sendo estudado, em âmbito de pesquisa clínica, em pacientes sem variante detectada na região codificante, mas que apresentam metilação da região promotora e, conseqüentemente, diminuição da expressão gênica. Acredita-se que estes pacientes podem ser igualmente beneficiados. A hipermetilação da região promotora é um dos mecanismos de silenciamento epigenéticos mais estudados atualmente em relação à HBOC. Por este motivo, a identificação de variantes que

possam estar associadas com este processo é de extrema relevância (AZZOLLINI et al., 2016; BURKE et al., 2018; WONG et al., 2011; ZHANG; LONG, 2015).

2.6. Regiões Não Codificantes dos Genes *BRCA1* e *BRCA2*

Além dos testes genéticos, até pouco tempo atrás, estudos básicos experimentais e funcionais avaliavam somente a região codificante dos genes de interesse, pesquisando a associação direta entre as variantes exônicas encontradas e alterações estruturais da proteína. Com o desenvolvimento de projetos voltados à investigação do genoma completo e suas associações, demonstrou-se que a região não codificante, além de corresponder a 98% de todo o genoma, abriga cerca de 90% das variantes comumente encontradas. Desta forma, torna-se importante considerar e analisar a relevância clínica das alterações encontradas nestas áreas, assim como compreender sua contribuição nas síndromes de predisposição hereditária ao câncer (DOS SANTOS et al., 2018a, 2018b; LI et al., 2015).

Para ponderar e discutir sobre o impacto das variantes localizadas nas regiões não codificantes, é importante verificar em qual sub-região estas mutações se fazem presentes: promotora, 5' UTR, íntrons ou em 3' UTR. A estrutura gênica completa está demonstrada na Figura 5. Desta forma, faz-se relevante também entender e lembrar algumas etapas do processo de transcrição do DNA em RNA mensageiro (mRNA), a fim de entender possíveis consequências estruturais (GRIFFITHS et al., 2022; NUSSBAUM; MCINESS; WILLARD, 2016).

O início da transcrição é resultado da influência e ligação de proteínas que interagem com sequências específicas da região promotora. O alongamento e formação do transcrito primário seguem por toda a região codificadora do gene, a partir do códon ATG até encontrar a sequência conservada AAUAAA na extremidade 3', reconhecida por enzimas e clivada em cerca de 20 nucleotídeos adiante, determinando o final do processo. Conforme demonstrado na Figura 5, pode-se salientar ainda que o sítio de início da transcrição delimita o final da região promotora e início da região 5' UTR, assim como ao final da sequência conservada terminadora, encontra-se o início da região 3' UTR, seguido da cadeia de poliadenilação, abordados posteriormente (GRIFFITHS et al., 2022).

Desta forma, compreende-se que as variantes presentes na região não codificante podem influenciar em diferentes níveis, desde o DNA até a formação de sua proteína funcional, modificando interações complexas de regulação e estabilidade genômica. A identificação destas alterações e a forma como influenciam a expressão gênica são de extrema importância, visto que podem representar uma resposta aos pacientes com fenótipo clínico de HBOC, mas que não

apresentam nenhuma variante patogênica detectada na região codificante, que somam até 80% dos casos (DOS SANTOS et al., 2018a, 2018b; GLOSS; DINGER, 2018; LI et al., 2015; RITCHIE et al., 2014).

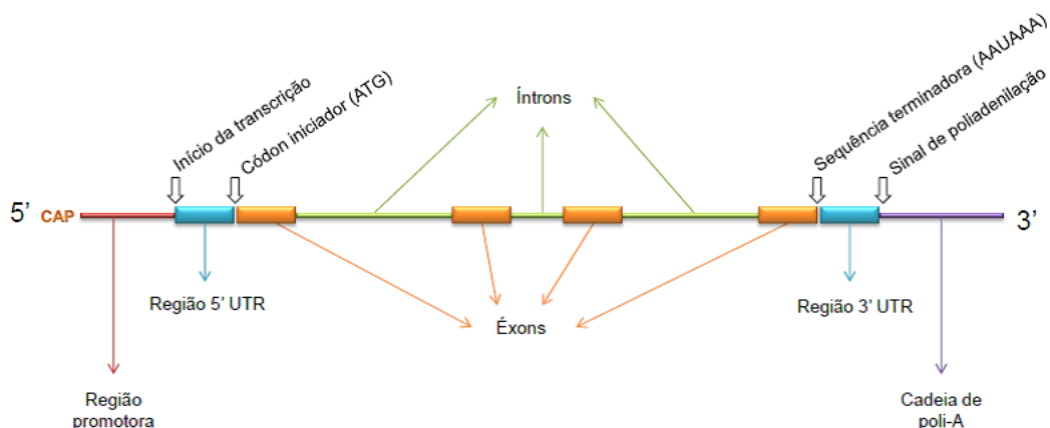


Figura 5. Estrutura gênica. Figura original.

2.6.1. Região 5' UTR, Promotora e Associação com Hipermetilação

A região promotora do gene consiste em uma sequência específica para a interação de fatores e elementos funcionais que garantem o início correto da transcrição do DNA em RNA, a partir da fita 3'. Em muitos trabalhos, esta área está descrita em conjunto com a região 5' UTR, que se origina então, a partir do sítio de início da transcrição. Esta é delimitada em sua porção final pelo códon iniciador ATG, que marca também o começo do primeiro éxon da região codificadora, conforme demonstrado na Figura 5 (GRIFFITHS et al., 2022; NUSSBAUM; MCINESS; WILLARD, 2016).

Após a transcrição, acrescenta-se ao transcrito, em sua extremidade 5', um revestimento denominado CAP, composto por um resíduo de 7-metilguanossina que interage com os grupamentos fosfato da fita. A função deste revestimento é, basicamente, proteger a sequência de uma possível degradação prematura, antes de dirigir-se à tradução. Sua localização está demonstrada na Figura 6, no ícone 1.



Figura 6. Mecanismos de regulação pós-transcricional do gene: adição do revestimento CAP e cadeia de poli-A. Adaptada de NUSSBAUM; MCINESS; WILLARD, 2016, p. 60.

As regiões promotoras e 5' UTR são compostas por sequências conservadas, contendo elementos funcionais que atuam como acentuadores ou silenciadores da transcrição, a partir da ligação fatores regulados de acordo com o tecido no qual o gene em questão está sendo expresso. Deste modo, a presença de uma variante patogênica ou provavelmente patogênica pode perturbar a interação entre o sítio e fator de transcrição, resultando em uma redução acentuada ou até na repressão completa da transcrição, alteração no consenso da tradução, e conseqüentemente, na diminuição da expressão gênica (DE SILVA; TENNEKON; KARUNANAYAKE, 2019; GRIFFITHS et al., 2022; LAL et al., 2017; NUSSBAUM; MCINESS; WILLARD, 2016).

Na maioria dos genes, as regiões promotoras, 5' UTR e o primeiro éxon possuem uma grande proporção de dinucleotídeos de citosina e guanina em sua sequência, formando as ilhas CpG que também atuam como ligantes de fatores de transcrição. Nesta região, diferentemente de outros locais do genoma, as ilhas CpG devem ser mantidas hipometiladas para que estes fatores consigam se ligar devidamente e iniciar a transcrição. Recentes estudos citam a hipermetilação destas ilhas como um mecanismo epigenético de regulação negativa, que resulta em silenciamento e perda de função gênica (ESTELLER, 2002; EVANS et al., 2018; PFEIFER, 2018).

Algumas pesquisas já demonstraram que a hipermetilação da região promotora dos genes *BRCA1/2* está significativamente relacionado com o fenótipo clínico e histopatológico de HBOC, mesmo em casos em que nenhuma mutação tenha sido detectada. Atualmente existe apenas uma variante, descrita na literatura pela primeira vez em 2018, presente na região 5' UTR de *BRCA1* e que foi associada funcionalmente com a hipermetilação da região promotora e diminuição da expressão gênica. A variante c.-107A>T foi identificada pela primeira vez em duas famílias inglesas, e a associação da mesma com o mecanismo epigenético de silenciamento foi encontrada em diferentes amostras de tecido tumoral, mucosa oral, cabelo e sangue dos indivíduos. Este trabalho também realizou análise de segregação em outros membros das famílias, evidenciando seu caráter patogênico. Atualmente, a variante está classificada como patogênica pelo ClinVar e provavelmente patogênica pelo VarSome, e foi citada em alguns estudos exploratórios realizados em populações de origem alemã e holandesa, onde não foi encontrada. No Brasil, um estudo realizado em 2019 com 95 pacientes provenientes do estado de São Paulo também não detectou

a mesma. De qualquer modo, ainda é importante verificar sua presença em outras populações e etnias, e em coortes maiores (CARVALHO, 2019; DE JONG et al., 2023; EVANS et al., 2018; LANER et al., 2020).

Desta forma, faz-se necessário também avaliar a importância da inclusão das regiões promotora e 5' UTR nos testes genéticos para a descoberta de novas variantes em nível experimental e clínico, podendo representar um resultado conclusivo para tantos pacientes com resultado negativo.

2.6.2 Região Intrônica e Variantes de Processamento de RNA

Cerca de 93-94% dos transcritos gênicos são recompostos pelo processamento de RNA, também denominado *splicing*. Este mecanismo de regulação pós-transcricional contribui ativamente para a diversidade do proteoma, garantindo diferentes padrões de expressão gênica e função em células e tecidos específicos, de modo que um gene seja capaz de codificar diferentes proteínas. Este processo consiste, basicamente, na remoção dos íntrons da sequência e união dos éxons, que passam a formar a região codificadora, conforme demonstrado na Figura 7 (GELLI et al., 2019; GRIFFITHS et al., 2022; LI et al., 2019b; SANZ et al., 2010).

O processamento de RNA é regulado precisamente pelas sequências consenso nas extremidades 5' e 3', que atuam como promotoras ou silenciadoras do processo. Os pares de base localizados nas extremidades dos éxons e íntrons formam os sítios de *splicing* e são conservados para que o mecanismo inicie corretamente. Estão envolvidas também algumas proteínas de ligação para fatores e/ou elementos teciduais específicos. Deste modo, antes do transcrito seguir para a tradução, portanto, os íntrons são retirados da sequência, não estando relacionados à matriz de leitura (GRIFFITHS et al., 2022; NUSSBAUM; MCINESS; WILLARD, 2016).

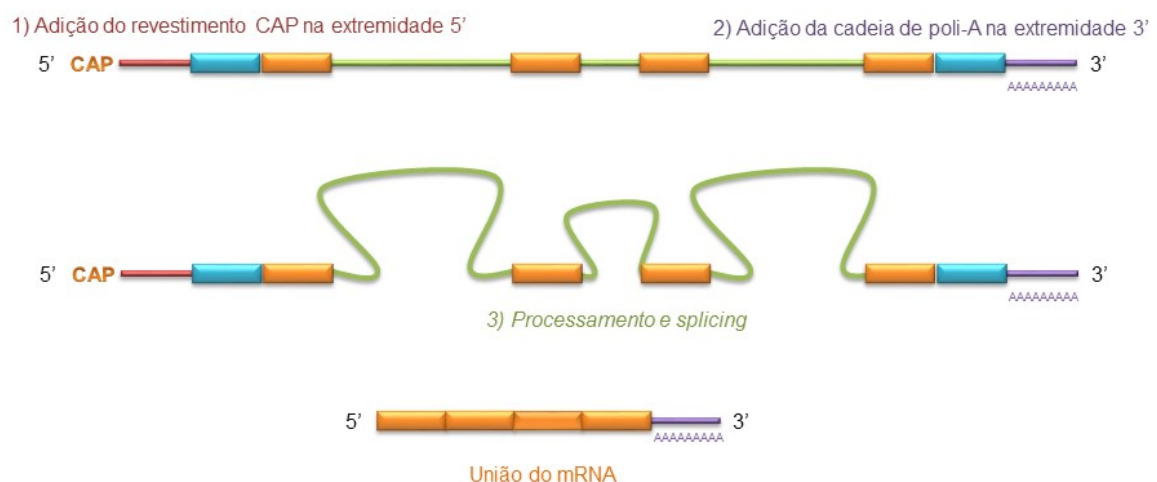


Figura 7. Mecanismos de regulação pós-transcricional do gene: processamento de RNA. Adaptada de NUSSBAUM; MCINESS; WILLARD, 2016, p. 60.

Mutações ocorridas em bases essenciais de sítios aceptores ou doadores de processamento, compostos pelos dinucleotídeos de guanina e timina (GT), e de adeninas e guaninas (AG), respectivamente, correspondem a um dos principais mecanismos de inativação gênica citados por estudos funcionais presentes na literatura. A presença de variantes nestes locais, excepcionalmente, influencia negativamente no reconhecimento do éxon pelos complexos silenciadores ou promotores de processamento já previamente citados. Estes complexos são formados por proteínas-fatores compostas por sequências curtas de cerca de 6 a 8 nucleotídeos, responsáveis por promover ou reprimir a inclusão do éxon no transcrito de mRNA maduro. Portanto, qualquer modificação neste processo pode resultar em uma isoforma proteica disfuncional (ACEDO et al., 2012; BUSCH; HERTEL, 2012).

Ainda, é importante ressaltar que variantes presentes em áreas intrônicas distantes e afastadas das extremidades dos éxons não são detectadas em testes genéticos convencionais. Estas podem estar relacionadas com alterações nas junções éxon-íntron, como a não remoção correta dos íntrons e/ou exclusão de éxons codificantes do transcrito de mRNA, tornando-o disfuncional e inexato quanto seu tamanho (ACEDO et al., 2012; BUSCH; HERTEL, 2012).

O processamento de RNA, portanto, consiste em um mecanismo estritamente regulado para que o produto final de mRNA não seja deteriorado. A presença de variantes nas sequências consenso e nas extremidades dos íntrons podem modificar seus sítios de início, e prejudicar a recombinação e remoção adequada dos mesmos. Consequentemente, a proteína gerada a partir deste processo será de menor tamanho, além de disfuncional ou silenciada (GELLI et al., 2019; GRIFFITHS et al., 2022; LI et al., 2019b; NUSSBAUM; MCINESS; WILLARD, 2016; SANZ et al., 2010).

O gene *BRCA1*, especialmente, pode ser recombinado alternativamente diversas vezes, dependendo em qual tecido e fase da vida está sendo expresso, podendo gerar dois transcritos distintos, a partir deste mecanismo. Os éxons 1a e 1b possuem regiões promotora, 5' UTR e sítios de início de transcrição distintos. Compreende-se que o transcrito contendo o éxon 1a é expresso em maior quantidade nas glândulas mamárias, enquanto o éxon 1b é expresso na placenta. Funcionalmente, demonstra-se que além de ser expresso em casos de câncer de mama, a capacidade e eficiência de tradução do transcrito composto pelo éxon 1b é cerca de dez vezes menor do que do transcrito contendo o éxon 1a, fato que contribui diretamente para a constituição de uma proteína disfuncional ou silenciada, conforme citado anteriormente. É importante ressaltar

que o processamento pode, portanto, ocorrer normalmente ou de forma sintética, sendo resultado de uma mutação germinativa e presente em células neoplásicas, na maioria das vezes (DOS SANTOS et al., 2018a, 2018b; LI et al., 2019b).

2.6.3 Região 3' UTR e Ligação de microRNAs

O transcrito de mRNA possui uma região com cerca de 150 a 200 nucleotídeos entre a sequência de terminação e a cadeia de poli-A, determinada como 3' UTR, conforme demonstrado na Figura 5. Esta área, junto da porção terminadora, é responsável pela regulação da clivagem no final da fita, e devida adição da cadeia de poli-A, garantindo uma maior estabilidade para passar ao processo de tradução. Sua localização e mecanismo estão demonstrados no ícone 2 da Figura 6. Desta forma, mutações nesta área podem interferir na terminação e no mecanismo de poliadenilação do transcrito, gerando mRNAs diminuídos e disfuncionais (GRIFFITHS et al., 2022; NUSSBAUM; MCINESS; WILLARD, 2016).

Cerca de 60% dos transcritos primários de mRNA são regulados por microRNAs (miRNAs ou miRs), que consistem em pequenas sequências compostas por 19 a 25 pares de base de RNA não codificador de fita simples. Os miRNAs se ligam às sequências alvo do mRNA através de sítios localizados na região 3' UTR e regulam negativamente o transcrito, degradando-o e inibindo sua tradução em proteína. Assim, a ligação de um miRNA na região 3' UTR de genes supressores tumorais resulta em um impacto semelhante a uma mutação de perda de função (BHAT; MAJID; HASSAN, 2019; BRINCAS et al., 2019; CHANG; SHARAN, 2012; LEE et al., 2009; PESSOA-PEREIRA et al., 2020; SETHI; SETHI; BLUTH, 2018).

Estudos indicam que a ligação de miRNAs ao mRNA está associada também à progressão de doença e metástases, dependendo do seu nível de expressão e a quais genes se ligam. Contudo, existem poucos trabalhos relacionando miRNAs e variantes patogênicas em *BRCA1/2*, e conseqüentemente HBOC. SNPs funcionais em 3' UTR, que resultam na criação de sítios de ligação, continuam pouco explorados e caracterizados por bancos de dados, mas poderiam auxiliar como marcadores moleculares de diagnóstico e servir como modelo de predição para manejo terapêutico de muitos pacientes.

3. MARCO CONCEITUAL

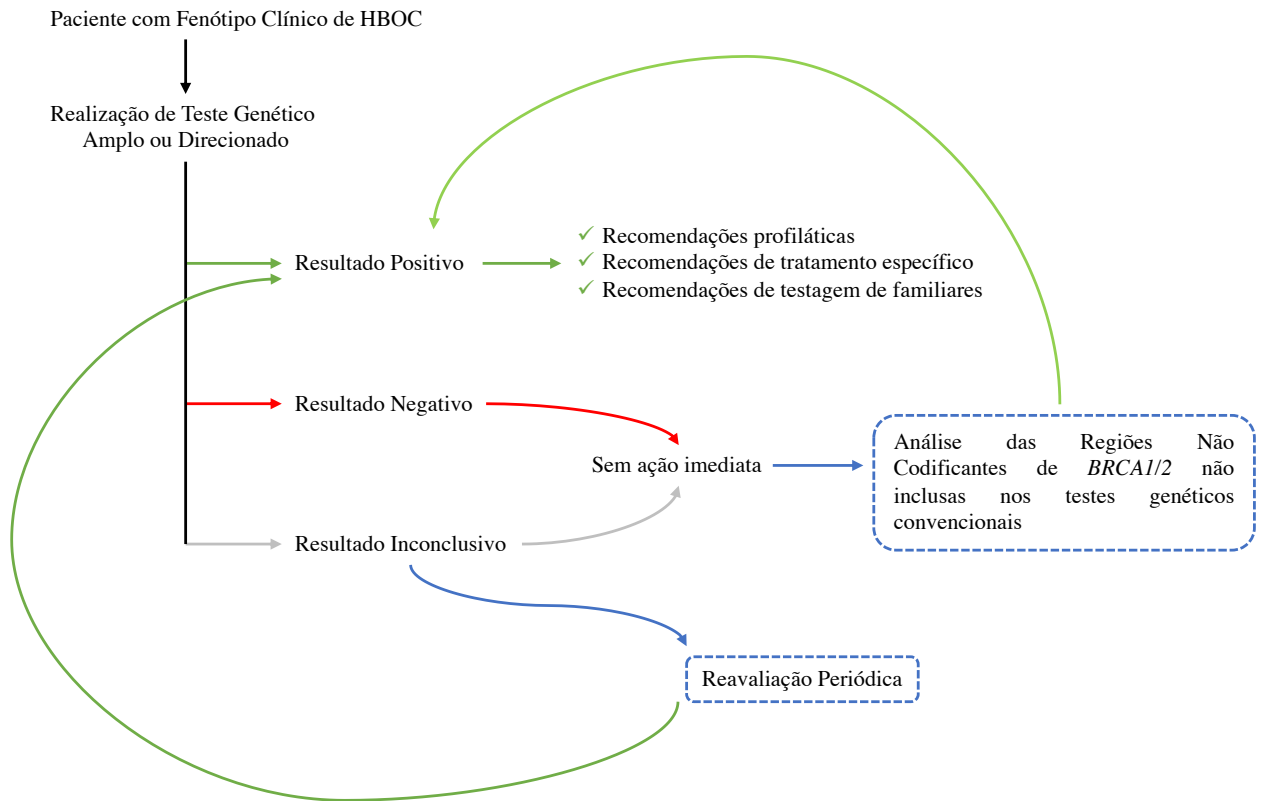


Figura 8. Marco conceitual da proposta do trabalho. Figura original.

4. JUSTIFICATIVA

Os avanços na medicina de precisão passaram a permitir, através do sequenciamento de nova geração (NGS, de *Next Generation Sequencing*), análises genéticas mais abrangentes, com a utilização e realização de painéis de múltiplos genes, incluindo *BRCA1/2*. Esta ferramenta resultou na geração de novas e relevantes informações sobre as variantes detectadas, além da compreensão de interações genéticas das síndromes de predisposição hereditárias ao câncer. Com o NGS, a detecção de variantes em *BRCA1/2* ampliou-se para 20%, visto que esta taxa antes, com a utilização de metodologias específicas às variantes, era ainda menor (ALEMAR et al., 2017; AZZOLLINI et al., 2016; BECK et al., 2020; MANCHANDA et al., 2018; VALENCIA et al., 2017).

Desta forma, um número significativo de pacientes, que somam até 60% destes, aproximadamente, denominado por alguns trabalhos como *BRCAx* ou *BRCAness*, que, apesar de apresentar características fenotípicas de HBOC e histórico familiar positivo para as neoplasias de mama e/ou ovário, apresentam resultados negativos ou inconclusivos para a detecção de variantes patogênicas através dos testes genéticos nestes genes (ALEMAR et al., 2017; AZZOLLINI et al., 2016; BECK et al., 2020; EASTON et al., 2015; MANCHANDA et al., 2018; VALENCIA et al., 2017; WHO, 2023).

Atualmente, as políticas públicas desenvolvidas para os pacientes com variantes patogênicas em *BRCA1/2* e outros genes estão bem estabelecidas, incluindo monitoramento e rastreamento regular, procedimentos de intervenção e profilaxia para diminuição de risco e acesso a tratamentos específicos (FORBES et al., 2019; MORGAN et al., 2018; WHO, 2023).

Por outro lado, o manejo clínico destes indivíduos apresenta divergências entre países e instituições de saúde. Estudos recentes ressaltam que pouco se discute efetivamente sobre aconselhar corretamente e definir o tratamento e seguimento destes pacientes. Além disso, argumenta-se sobre o impacto psicológico dos resultados inconclusivos e negativos ao não representar um alívio, mas sim um aumento nos níveis de ansiedade com a incerteza de que talvez ainda carreguem uma variante que não tenha sido classificada ou identificada corretamente (BAKOS et al., 2007; CHERN et al., 2019; CULVER et al., 2013; ECCLES et al., 2015; FORBES et al., 2019; RICHTER et al., 2013; STAFFORD et al., 2018; WELSH et al., 2017).

Considerando estas circunstâncias, portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de estratégias de reavaliação e reclassificação regular de VUS, buscando definir qual guia de categorização de variantes e seus critérios são mais adequados para utilizar frente uma população específica, e também diminuindo significativamente o tempo entre diagnóstico e reclassificação.

Já no que se refere aos pacientes com resultados negativos, faz-se considerável a análise de outras regiões gênicas em *BRCA1/2* ou outros genes de alta e moderada penetrância que podem estar igualmente associados com HBOC. Observando que as regiões não codificantes representam 98% do genoma e que estas podem abrigar até 90% de todas as variantes comumente encontradas, as áreas intrônicas, promotora, 5' UTR e 3' UTR podem se tornar alvo de novas avaliações, visto sua relação com mecanismos de regulação da expressão gênica e alterações epigenéticas (AZZOLLINI et al., 2016; DOS SANTOS et al., 2018a, 2018b; CHERN et al., 2019; GRIFFITHS et al., 2022; WELSH et al., 2017).

Atualmente, a reavaliação periódica e reclassificação de VUS já é discutida na literatura e implementada na prática clínica em diferentes formatos. Contudo, a identificação, elucidação e estimativa de novas variantes relacionadas nas regiões não codificantes de *BRCA1/2* podem representar uma nova linha de pesquisa e diagnóstico no futuro. Este fato pode significar também, após etapas de validação e implementação, uma mudança de paradigma no manejo e seguimento das pacientes com resultados negativos e inconclusivos, tendo um impacto direto e positivo na taxa de sobrevida e qualidade de vida das mesmas.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Primário

Explorar mecanismos moleculares possivelmente associados com HBOC em pacientes que apresentam fenótipo clínico, mas resultados de avaliações genéticas de *BRCA1/2* negativa ou inconclusiva.

5.2. Objetivos Secundários

Caracterizar pacientes com suspeita de HBOC quanto à presença de VUS em *BRCA1* e/ou *BRCA2*.

Comparar os guias de classificação de variantes quanto seus critérios e metodologias propostas durante o processo de reclassificação de VUS detectadas em *BRCA1* e/ou *BRCA2*.

Avaliar por análises *in silico* e *in vitro* alterações em regiões não codificantes dos genes *BRCA1* e *BRCA2* que possam estar relacionadas com HBOC.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A. C. CAMARGO CANCER CENTER. **Mama**. Disponível em: <<https://accamargo.org.br/sobre-o-cancer/tipos-de-cancer/mama>>.

ACEDO, A. et al. Comprehensive splicing functional analysis of DNA variants of the *BRCA2* gene by hybrid minigenes. **Breast Cancer Research**, v. 14, n. 3, p. 1-12, 2012.

ACHATZ, M. I. et al. Recommendations for Advancing the Diagnosis and Management of Hereditary Breast and Ovarian Cancer in Brazil. **JCO Global Oncology**, v. 6, p. 439-452, 2020.

ADAM, M. P. et al. **GeneReviews**. Seattle: University of Washington, 1998-2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1116/>>.

AGÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE SUPLEMENTAR (ANS). **Anexo II Diretrizes de Utilização para Cobertura de Procedimentos na Saúde Suplementar**. Rol de Procedimentos e Eventos em Saúde, 2021.

ALKABBAN, F. M.; FERGUSON, T. **Breast Cancer**. 1. Ed. Florida, USA: StatPearls, 2022.

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.

AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **Cancer Facts for Women**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/healthy/cancer-facts/cancer-facts-for-women.html>>.

AZZOLLINI, J. et al. Mutation detection rates associated with specific selection criteria for *BRCA1/2* testing in 1854 high-risk families: A monocentric Italian study. **European Journal of Internal Medicine**, v. 32, p. 65-71, 2016.

BAKOS, A. D. et al. BRCA mutation-negative women from hereditary breast and ovarian cancer families: A qualitative study of the BRCA-negative experience. **Health Expectations**, v. 11, n. 3, p. 220–231, 2008.

BECK, A. C. et al. Rate of *BRCA* mutation in patients tested under NCCN genetic testing criteria. **American Journal of Surgery**, v. 219, n. 1, p. 145–149, 2020.

BHAT, S. A.; MAJID, S.; HASSAN, T. MicroRNAs and its emerging role as breast cancer diagnostic marker- A review. **Advances in Biomarker Sciences and Technology**, v. 1, p. 1–8, 2019.

BRADBURY, A. R. et al. Longitudinal outcomes with cancer multigene panel testing in previously tested *BRCA1/2* negative patients. **Clinical Genetics**, v. 97, n. 4, p. 601–609, 2020.

BRINCAS, H. M. et al. A genetic variant in microrna-146a is associated with sporadic breast cancer in a southern brazilian population. **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, n. 4, 2019.

BURKE, L. J. et al. *BRCA1* and *BRCA2* 5' Noncoding Region Variants Identified in Breast Cancer Patients Alter Promoter Activity and Protein Binding. **Human Mutation**, v. 39, n. 12, p. 2025-2039, 2018.

BUSCH, A.; HERTEL, K. J. Evolution of SR Protein and HnRP Splicing Regulatory Factors. **Wiley Interdisciplinary Reviews RNA**, v. 3, n. 1, p. 12-12, 2012.

CALÒ, V. et al. The clinical significance of unknown sequence variants in BRCA genes. **Cancers**, v. 2, n. 3, p. 1644–1660, 2010.

CARVALHO, S. C. S. **Caracterização Molecular da Síndrome Hereditária do Câncer de Mama e/ou Ovário**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2019.

CASTÉRA, L. et al. Landscape of Pathogenic Variations in a Panel of 34 Genes and Cancer Risk Estimation from 5131 HBOC Families. **Genetics in Medicine**, v. 20, n. 12, p. 1677-1686, 2018.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Basic Information About Ovarian Cancer**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/cancer/ovarian/basic_info/index.htm>.

CHANG, S.; SHARAN, S. K. Epigenetic control of an oncogenic microRNA, miR-155, by *BRCA1*. **Oncotarget**, v. 3, n. 1, p. 5–6, 2012.

CHAVARRI-GUERRA, Y.; BLAZER, K. R.; WEITZEL, J. N. Genetic Cancer Risk Assessment for Breast Cancer in Latin America. **Revista de Investigación Clínica**, v. 69, n. 2, p. 94-102, 2017.

CHERN, J. Y. et al. The influence of BRCA variants of unknown significance on cancer risk management decision-making. **Journal of Gynecologic Oncology**, v. 30, n. 4, p. 1–10, 2019.

COMISSÃO NACIONAL DE INCORPORAÇÃO DE TECNOLOGIAS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS) (CONITEC). Ministério da Saúde. **Atualizando o Tratamento Para Pacientes com Câncer de Ovário no SUS**. Brasília, 2019.

CULVER, J. et al. Variants of uncertain significance in BRCA testing: Evaluation of surgical decisions, risk perception, and cancer distress. **Clinical Genetics**, v. 84, n. 855, p. 464–472, 2013.

DA COSTA VIEIRA, R. A.; FORMENTON, A.; BERTOLINI, S. R. Breast cancer screening in Brazil. Barriers related to the health system. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 5, p. 466–474, 2017.

DE JONG, V. M. T. et al. Identifying the *BRCA1* c.-107A > T variant in Dutch patients with a tumor *BRCA1* promoter methylation. **Familial Cancer**, v. 22, n. 1, p. 151-154, 2023.

DESMOND, A. et al. Clinical Actionability of Multigene Panel Testing for Hereditary and Ovarian Cancer Risk Assessment. **JAMA Open Network**, v. 1, n. 7, p. 943-951, 2015.

- DOS SANTOS, E. S. et al. Assessment of the functional impact of germline *BRCA1/2* variants located in non-coding regions in families with breast and/or ovarian cancer predisposition. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 168, n. 2, p. 311–325, 2018a.
- DOS SANTOS, E. S. et al. Non-coding variants in *BRCA1* and *BRCA2* genes: Potential impact on breast and ovarian cancer predisposition. **Cancers**, v. 10, n. 11, p. 1–21, 2018b.
- DOS SANTOS SILVA, I. Políticas de controle do câncer de mama no Brasil: Quais são os próximos passos? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 6, p. 1-4, 2018.
- EASTON, D. F. et al. Gene-Panel Sequencing and the Prediction of Breast-Cancer Risk. **The New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 23, p. 2243-2257, 2015.
- ECCLES, B. K. et al. Understanding of BRCA VUS genetic results by breast cancer specialists. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2015.
- EVANS, D. G. R. et al. A Dominantly Inherited 5' UTR Variant Causing Methylation-Associated Silencing of *BRCA1* as a Cause of Breast and Ovarian Cancer. **American Journal of Human Genetics**, v. 103, n. 2, p. 213–220, 2018.
- DE SILVA, S.; TENNEKOON, K. H.; KARUNANAYAKE, E. H. Overview of the genetic basis toward early detection of breast cancer. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, v. 11, p. 71–80, 2019.
- DE SOUZA TIMOTEO, A. R. et al. A portrait of germline mutation in Brazilian at-risk for hereditary breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 172, n. 3, p. 637–646, 2018.
- 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. 441-453, 2015.
- ESTELLER, M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: A booming present, a brighter future. **Oncogene**, v. 21, n. 35 REV. ISS. 3, p. 5427-5440, 2002.
- FAZBEM. Programa de cuidado e apoio ao paciente. **Câncer de mama: diagnóstico, estadiamentos e subtipos histológicos**. Disponível em: <<https://www.programafazbem.com.br/blog/post/cancer-de-mama-diagnostico-estadiamento-e-subtipos-moleculares>>.
- FORBES, C. et al. A systematic review of international guidelines and recommendations for the genetic screening, diagnosis, genetic counseling, and treatment of *BRCA*-mutated breast cancer. **Cancer Management and Research**, v. 11, p. 2321–2337, 2019.
- GEENEN, J. J. J. et al. PARP Inhibitors in the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 57, n. 4, p. 427–437, 2018.
- GELLI, E. et al. Usefulness and limitations of comprehensive characterization of mRNA splicing profiles in the definition of the clinical relevance of *BRCA1/2* variants of uncertain significance. **Cancers**, v. 11, n. 3, p. 1–22, 2019.

GENECARDS. **BRCA1**. Disponível em: <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BRCA1>>.

GENECARDS. **BRCA2**. Disponível em: <<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BRCA2&keywords=brca2>>.

GLOSS, B. S.; DINGER, M. E. Realizing the significance of noncoding functionality in clinical genomics. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 50, n. 8, 2018.

GREENBERG, S. et al. Population prevalence of individuals meeting criteria for hereditary breast and ovarian cancer testing. **Cancer Medicine**, v. 8, n. 15, p. 6789-6798, 2019.

GRIFFITHS, A. J. F. et al. **Introdução à Genética**. 12. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2022.

HAROUN, I. et al. Reasons for Risk-Reducing Mastectomy Versus MRI-screening in a Cohort of Women at High Hereditary Risk of Breast Cancer. **Breast**, v. 20, n. 3, p. 254-258, 2011.

HERZOG, J. S. et al. Genetic epidemiology of *BRCA1*- and *BRCA2*-associated cancer across Latin America. **npj Breast Cancer**, v. 19, n. 7, p. 101-107, 2021.

HOPPE, M. M. et al. Biomarkers for Homologous Recombination Deficiency in Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 110, n. 7, p. 704-713, 2018.

INSTITUTO DA MAMA DO RIO GRANDE DO SUL (IMAMA). **O Diagnóstico do Câncer de Mama**. Disponível em: <<https://imama.org.br/diagnostico/>>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Ministério da Saúde. **Câncer de Ovário**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Ministério da Saúde. **Diretrizes para a Detecção Precoce do Câncer de Mama no Brasil**. Rio de Janeiro, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Ministério da Saúde. **Incidência do Câncer de Mama no Brasil**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/gestor-e-profissional-de-saude/controlado-cancer-de-mama/dados-e-numeros/incidencia>>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Ministério da Saúde. **Estimativa de Casos de Câncer de Mama no Brasil**. Disponível em: <<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/estado-capital/brasil>>.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). **Brazil Fact Sheet**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/76-brazil-fact-sheets.pdf>>.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). **Breast Fact Sheet**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/20-Breast-fact-sheet.pdf>>.

- HOLSTEGE, H. et al. High incidence of protein-truncating *TP53* mutations in *BRCA1*-related breast cancer. **Cancer Research**, v. 69, n. 8, p. 3625–3633, 2009.
- KAPOOR, N. S. et al. Multigene Panel Testing Detects Equal Rates of Pathogenic *BRCA1/2* Mutations and has a Higher Diagnostic Yield Compared to Limited *BRCA1/2* Analysis Alone in Patients at Risk for Hereditary Breast Cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 22, n. 10, p. 3282–3288, 2015.
- KEMP, Z. et al. Evaluation of Cancer-Based Criteria for Use in Mainstream *BRCA1* and *BRCA2* Genetic Testing in Patients With Breast Cancer. **JAMA Network Open**, v. 2, n. 5, p. e194428, 2019.
- KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 4, p. 820–823, 1971.
- KOIKE FOLGUEIRA, M. A. A. et al. How Should Genetic Counseling for Ovarian Cancer Be Implemented in a Middle-Income Country? An Insight Based on the Brazilian Scenario. **Journal of Global Oncology**, v. 4, p. 1-3, 2018.
- KUCHENBAECKER, K. B. et al. Risks of breast, ovarian, and contralateral breast cancer for *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. **JAMA Open Network**, v. 317, n. 23, p. 2402–2416, 2017.
- LA VECCHIA, C. Ovarian cancer: Epidemiology and risk factors. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 26, n. 1, p. 55–62, 2017.
- LAL, S. et al. Molecular signatures in breast cancer. **Methods**, v. 131, p. 135–146, 2017.
- LANER, A. et al. Analysis of 3297 individuals suggests that the pathogenic germline 5'-UTR variant *BRCA1* c.-107A > T is not common in south-east German. **Familial Cancer**, v. 19, n. 3, p. 211–213, 2020.
- LARSEN HAIDLE, J.; WHITWORTH, P. Contemporary Challenges in Genetic Testing for Breast Cancer: A Collaboration Opportunity for Genetic Counselors and Breast Surgeons. **Annals of Surgical Oncology**, v. 22, n. 10, p. 3203–3207, 2015.
- LEE, C. H. et al. MicroRNA profiling of *BRCA1/2* mutation-carrying and non-mutation-carrying high-grade serous carcinomas of ovary. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.
- LI, A. et al. *BRCA* germline mutations in an unselected nationwide cohort of Chinese patients with ovarian cancer and healthy controls. **Gynecologic Oncology**, v. 151, n. 1, p. 145–152, 2018.
- LI, D. et al. *BRCA1* - No matter how you splice it. **Cancer Research**, v. 79, n. 9, p.2091–2098, 2019a.
- LI, J. et al. Mining the coding and non-coding genome for cancer drivers. **Cancer Letters**, v. 369, n. 2, p. 307-315, 2015.
- LI, J. et al. Pathways and assays for DNA double-strand break repair by homologous recombination. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 51, n. 9, p. 879-889, 2019b.

LIEDTKE, C.; KOLBERG, H. C. Breast cancer and genomic testing. **British Journal of Surgery**, v. 104, n. 7, p. 799–801, 2017.

LINDOR, N. M. et al. *BRCA1/2* Sequence Variants of Uncertain Significance: A Primer for Providers to Assist in Discussions and in Medical Management. **The Oncologist**, v. 18, n. 5, p. 518-524, 2013.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. PARP Inhibitors: The First Synthetic Lethal Targeted Therapy Europe PMC Funders Group. **Science**, v. 355, n. 6330, p. 1152–1158, 2017.

LYNCH, J. A.; VENNE, V.; BERSE, B. Genetic tests to identify risk for breast cancer. **Seminars in Oncology Nursing**, v. 31, n. 2, p. 100–107, 2015.

MANCHANDA, R. et al. Current Detection Rates and Time-To-Detection of All Identifiable BRCA Carriers in the Greater London Population. **Journal of Medical Genetics**, v. 55, n. 8, p. 538-545, 2018.

MAYROWITZ, H. N. **Breast Cancer**. 1. Ed. Brisbane, AUS: Exon Publications, 2022.

MIKI, Y. et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. **Science**, v. 266, n. 5182, p. 66–71, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas de Neoplasia Maligna Epitelial de Ovário**. Portaria Conjunta n. 1 de 07 de Janeiro de 2019. Brasília, 2019.

MORGAN, R. et al. Risk management decisions in women with *BRCA1* and *BRCA2* mutations. **American Journal of Surgery**, v. 215, n. 5, p. 899–903, 2018.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK (NCCN). **Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian, and Pancreatic**. Disponível em: <https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_bop.pdf>.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). National Cancer Institute. **Cancer Stat Facts: Female Breast Cancer Subtypes**. Disponível em: <<https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast-subtypes.html>>.

NATIONAL HEALTH SYSTEM (NHS). **Causes of Breast Cancer in Women**. Disponível em: <<https://www.nhs.uk/conditions/breast-cancer/causes/>>.

NATIONAL HEALTH SYSTEM (NHS). **Overview of Ovarian Cancer**. Disponível em: <<https://www.nhs.uk/conditions/ovarian-cancer/>>.

NUSSBAUM, R. L.; MCINESS, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson Genética Médica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

NYKAMP, K. et al. Sherlock: A comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. **Genetics in Medicine**, v. 19, n. 10, p. 1105–1117, 2017.

O’KANE, G. M.; CONNOR, A. A.; GALLINGER, S. Characterization, Detection, and Treatment Approaches for Homologous Recombination Deficiency in Cancer. **Trends in Molecular Medicine**, v. 23, n. 12, p. 1121-1137, 2017.

- OLIVER, J. et al. Latin American Study of Hereditary Breast and Ovarian Cancer LACAM: A Genomic Epidemiology Approach. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1-13, 2019.
- 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, 2016.
- PESSOA-PEREIRA, D. et al. MiRNA expression profiling of hereditary breast tumors from *BRCA1*- A and *BRCA2*-germline mutation carriers in Brazil. **BMC Cancer**, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2020.
- PFEIFER, G. P. Defining driver DNA methylation changes in human cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, p. 1–13, 2018.
- PRAKASH, R. et al. Homologous Recombination and Human Health: The Roles of *BRCA1*, *BRCA2*, and Associated Proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 4, p. a016600, 2015.
- RICHARDS S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 405-424, 2015.
- RICHTER, S. et al. Variants of unknown significance in BRCA testing impact on risk perception, worry, prevention and counseling. **Annals of Oncology**, v. 24, p. 869–874, 2013.
- RITCHIE, G. R. S. et al. Functional annotation of noncoding sequence variants. **Nature Methods**, v. 11, n. 3, p. 294–296, 2014.
- SANTOS, C. et al. Pathogenicity evaluation of *BRCA1* and *BRCA2* unclassified variants identified in portuguese breast/ovarian cancer families. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 16, n. 3, p. 324–334, 2014.
- SANZ, D. J. et al. A high proportion of DNA variants of *BRCA1* and *BRCA2* is associated with aberrant splicing in breast/ovarian cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 6, p. 1957–1967, 2010.
- SCULLY, R. E. Ovarian Tumors: A Review. **American Journal of Pathology**, v. 87, n. 3, p. 686-720, 1977.
- SETHI, S.; SETHI, S.; BLUTH, M. H. Clinical Implication of MicroRNAs in Molecular Pathology: An Update for 2018. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 38, n. 2, p. 237–251, 2018.
- SHAO, D. et al. Prevalence of hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC) predisposition gene mutations among 882 HBOC high-risk Chinese individuals. **Wiley Cancer Science**, v. 1, v. 111, p. 647-657, 2020.
- SHEIKH, A. et al. The spectrum of genetic mutations in breast cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 6, p. 2177–2185, 2015.

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MASTOLOGIA (SBM). **Carcinomas Invasores de Mama**. Disponível em: <<https://www.spmastologia.com.br/tipos-cancer-de-mama/carcinomas-invasores-da-mama>>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MASTOLOGIA (SBM). **Conduta na paciente BRCA mutada**. Disponível em: <<https://sbmrio.org.br/noticias/conduta-na-paciente-brca-mutada/>>.

SPURDLE, A. B. et al. ENIGMA – evidence-based network for the interpretation of germline mutant alleles: an international initiative to evaluate risk and clinical significance associated with sequence variation in *BRCA1* and *BRCA2* genes. **Human Mutation**, v. 33, n. 1, p. 2-7, 2012.

STAFFORD, L. et al. Experiences and interpretations of *BRCA1/2* testing among women affected by breast or ovarian cancer who received a negative result. **Journal of Community Genetics**, v. 10, n. 4, p. 501–514, 2019.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TAYLOR, K. N.; ESKANDER, R. N. PARP inhibitors in epithelial ovarian cancer. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 13, p. 145–158, 2017.

VALENCIA, O. M. et al. The role of genetic testing in patients with breast cancer a review. **JAMA Surgery**, v. 152, n. 6, p. 589–594, 2017.

VAROL, U. et al. *BRCA* genes: *BRCA1* and *BRCA2*. **Journal of Balkan Union of Oncology**, v. 23, n. 4, p. 862–866, 2018.

WELSH, J. L. et al. Clinical Decision-Making in Patients with Variant of Uncertain Significance in *BRCA1* or *BRCA2* Genes. **Annals of Surgical Oncology**, v. 24, n. 10, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Breast Cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>>.

WONG, E. M. et al. Constitutional Methylation of the *BRCA1* Promoter is Specifically Associated With *BRCA1* Mutation-Associated Pathology in Early-Onset Breast Cancer. **Cancer Prevention Research**, v. 3, n. 1, p. 23-33, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Cancer Key Facts**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>.

WOOSTER, R. et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. **Letters to Nature**, v. 378, n. 21/28, 1995.

WRIGHT, W. D.; SHAH, S. S.; HEYER, W. D. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 27, p. 10524-10535, 2018.

ZHANG, L.; LONG, X. Association of *BRCA1* promoter methylation with sporadic breast cancers: Evidence from 40 studies. **Scientific Reports Nature**, v. 5, n. 17869, p. 1-12, 2015.

7. ARTIGOS

7.1 Artigo publicado

Challenges in periodic revision of genetic testing results: comparison of the main classification guidelines and report of a retrospective analysis involving *BRCA1/BRCA2* Variants of Uncertain Significance.

Running title: Reassessment of *BRCA1/2* VUS

Tiago Finger Andreis^{1,2*}, Kayana Isabel Weber de Souza^{1,3*}, Igor Araujo Vieira^{1,4*}, Bárbara Alemar¹, Marialva Sinigaglia,⁵ Yasminne Marinho de Araújo Rocha¹, Osvaldo Artigalás⁶, Camila Bittar^{1,6}, Cristina Brinckmann Oliveira Netto⁷, Patricia Ashton-Prolla^{1,2,3,7**}, Clévia Rosset^{1,2,8**, #}

¹ Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Medicina (PPGCM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁴ Escola de Saúde, Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS), São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁵ Instituto do Câncer Infantil (ICI), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁶ Hospital Moinhos de Vento (HMV), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁷ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁸ Unidade de Pesquisa Laboratorial (UPL) – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Kayana Isabel Weber de Souza and Tiago Finger Andreis have contributed equally to this work and should be considered co-first authors.

** Clévia Rosset and Patricia Ashton-Prolla should be considered co-last authors.

Correspondence to: Clévia Rosset, PhD

Rua Ramiro Barcelos 2350. CEP: 90035-903 - Porto Alegre - RS - Brazil. Hospital de Clínicas de Porto Alegre. e-mail: crosset@hcpa.edu.br. Tel +55 51 3359 7661

Acknowledgments:

We would like to thank Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) of Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial and organizational support.

Conflicts of Interest:

The authors state that they have no interests which might be perceived as posing a conflict or bias.

Data Availability Statement:

All clinically relevant or potentially relevant results generated during this study are included in this article (and its supplementary information files). Additional information is available from the corresponding author upon request.

Abstract

In the context of cancer predisposition syndromes, it is widely known that the correct interpretation of germline variants identified in multigene panel testing is essential for adequate genetic counseling and clinical decision making, in which variants of uncertain significance (VUS) are not considered actionable findings. Thus, their periodic re-evaluation using appropriate guidelines is notably important. In the present study, we compared the performance of the main variant classification guidelines (ACMG, Sherloc and ENIGMA) in variant reassessment, using as input a *BRCA1/2* VUS case series (retrospective analysis) from Brazil, an ethnically diverse and admixed country with substantial challenges in VUS reclassification. As main findings, two of the 15 VUS analyzed were reclassified as likely pathogenic by the 3 guidelines, *BRCA1* c.4987-3C>G (rs397509213) and *BRCA2* c.7868A>G (rs80359012). Moreover, challenges in variant classification and reassessment are described and additional *in silico* data about structural impact of the variant *BRCA2* c.7868A>G are provided. We hypothesize that the establishment of a framework to reassess VUS could improve this process in health centers that have not yet implemented this practice. Results of this study underscore that periodic monitoring of the functional, clinical, and bioinformatics data of a VUS by a multidisciplinary team are of utmost importance in clinical practice. When there is a specific guideline for a given gene, such as ENIGMA for *BRCA1/2*, it should be considered the first option for variant assessment. Finally, recruitment of VUS carriers and their relatives to participate in variant segregation studies and publication of VUS reclassification results in the international scientific literature should be encouraged.

Keywords: *BRCA1*, *BRCA2*, Brazilian population, genetic testing results, variant classification guidelines, variant of uncertain significance, variant reassessment.

Introduction

In recent years, the demand for genetic testing has increased significantly due to more affordable costs and increased awareness among healthcare professionals. As a result, the scientific community generated a large amount of DNA sequence data in a very short period of time^{1,2}. In contrast, the development of variant interpretation and classification pipelines, functional studies and accurate bioinformatics tools to evaluate novel variants evolved at a slower pace. In the context of cancer predisposition syndromes, individual access to multigene gene panel testing

(MGPT) has also increased in the last years, and the correct interpretation of the identified variants has proven essential for appropriate genetic counseling and clinical decision making³. In the current clinical practice scenario, the detection of a variant of uncertain significance (VUS) is interpreted as an inconclusive result and no concrete recommendations on specific therapeutic and/or prophylaxis options are given. The periodic reevaluation of a VUS may result in its reclassification to pathogenic/likely pathogenic (and therefore actionable), to benign/likely benign or it may remain as a VUS due to lack of sufficient evidence for reclassification. Periodic reassessment of a VUS should be standard of care for every carrier patient as it can significantly alleviate patient anxiety and optimize clinical management⁴⁻¹⁰.

The most remarkable attempt to establish a general standard classification of genetic variants is the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) guideline published in 2015, which classifies general variants as pathogenic (P), likely pathogenic (LP), benign (B), likely benign (LB) or VUS. In 2017, the ACMG guideline was refined by the Sherloc guideline^{11,12}. The ENIGMA (Evidence-based Network for the Interpretation of Germline Mutant Alleles)¹³ consortium initiative is complementary and focuses only on determining the clinical significance of sequence variants in the *BRCA1* and *BRCA2* (*BRCA1/2*) genes, with constant updating of data considering *BRCA1/2* specific DNA sequence and/or amino acid residue data¹⁴.

BRCA1/2 are the main genes associated with hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome and germline pathogenic/likely pathogenic (P/LP) variants in these genes have usually a very high penetrance for the disease phenotype¹⁵. Overall, it is estimated that at least 10% and 15% of female breast cancer and ovarian cancer patients are carriers of germline *BRCA1/2* P/LP variants¹⁶⁻¹⁸. Recent studies evaluating *BRCA1/2* report on the challenges in classifying its variants properly and a significant number remain as VUS, especially in less studied populations¹⁹. Thus, although the overall VUS frequency in patients with *BRCA1/2* is approximately 5-10%, in African-Americans and Hispanics it may reach 17% and 21%, respectively²⁰⁻²⁹. In Brazil, a country of continental dimensions known for its diverse and admixed population structure, the rate of VUS in *BRCA1/2* has been reported to be as high as 12.2%³⁰. Considering the importance of precise *BRCA1/2* variant classification as well as the high occurrence of VUS in these genes, we aimed to compare the performance of the main variant classification guidelines (ACMG/Sherloc and ENIGMA) in variant reassessment, using as input a *BRCA1/2* VUS case series from Brazil.

Methodology

Variant classification guidelines and BRCA1/BRCA2 VUS retrospective analysis

We compared three variant classification guidelines in this work: ACMG, Sherloc and ENIGMA. In order to collect data to use as input in the three classification systems and explore the challenges in periodic variant revision, we evaluated personal clinical history, self-reported family history of cancer and previous personal and family genetic testing results from medical records of a *BRCA1/2* VUS case series. The VUS included in this study were selected through retrospective analysis of multigene panel testing (MGPT) results, including *BRCA1/2* analysis. A total of 357 patients with a suggestive clinical phenotype of HBOC³¹ assisted in a public general hospital (Hospital de Clínicas de Porto Alegre) and six private cancer genetics clinics in Porto Alegre, Brazil, between April 2014 and December 2017 had their MGPT results analyzed. The study was approved by the research ethics committee of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (approval number 2014-0630) and all participants provided informed consent to participate in the study. All probands underwent pre- and post-test genetic counseling.

MGPT was conducted in three commercial laboratories and panel size varied (6-86 genes, all tests included *BRCA1* and *BRCA2*). Transcript sequences NM_007294.3 for *BRCA1* and NM_000059.3 for *BRCA2* were used for variant annotation in all laboratories. *BRCA1/2* variants identified were classified into five categories according to the ACMG recommendations (B, LB, P, LP, and VUS) at the moment of testing. All *BRCA1/2* VUS carriers identified in this case series were reanalyzed. Variants detected before May 2015, although ascertained before the ACMG guideline publication, were classified according to the same criteria proposed by ACMG.

Data compilation as input for the variant classification guidelines

Considering that each classification system has distinct specifications for data retrieval, such as population databases, *in silico* predictors and clinical criteria, we followed the recommendations according to each guideline. There are no precise recommendations to search for *in-vitro* and *in-vivo* functional studies. Thus, we performed a literature review in Pubmed using the variant HGVS nomenclature as a search term, and looked for citations and functional evidence in ClinVar and LitVar^{32, 33}. Additionally, annotations for *BRCA1/2* variants deposited in ClinVar were used to check for the presence of a different variant in the same nucleotide or amino acid position of the analyzed VUS and to verify if the genomic region is a mutational hotspot without benign variation³². We finally checked for the presence of additional unrelated reports described by other laboratories when the condition (HBOC or Breast-ovarian cancer, familial) and the assertion

criteria were provided. Other functional and clinical criteria investigated in variant classification, including variant effect and observations in affected and unaffected individuals, were further analyzed according to the recommendations from each guideline.

After compiling these data, the VUS were first classified according to ACMG 2015 guidelines. Second, we used the Sherlock framework to reanalyze variants^{11,12}. Lastly, we applied the ENIGMA consortium pipeline, specific for *BRCA1/2* variants. Data from the three reassessment strategies were compared to verify their classification results. The results were also compared to the ClinVar and VarSome ACMG classifications (last verification of all variants in April 12, 2022)^{33, 34}. Additionally, the Alamut Visual software (*2014-2020 Interactive Biosoftware*) was also used for visualization of *in silico* algorithm results.

Structural visualization of predicted pathogenic variants

In order to help in the visualization of *BRCA1/2* variant pathogenicity for some VUS, we performed additional analyses that were not described in ACMG/Sherloc and ENIGMA. We used the three dimensional (3D) structure of the mouse BRCA2-DSS1 domain (PDB ID 1MIU) and the UCSF Chimera 1.16 software³⁵ for molecular graphics visualization of the variants in this region. Other 3D structures of BRCA1 and BRCA2 domains are absent or incomplete, and for this reason we could not inspect all variants using this strategy. Moreover, the sequence of the human BRCA2 protein (Uniprot ID, P51587) 2609-2732 amino acid region was aligned with orthologous cat (Uniprot ID, Q86458), mouse (Uniprot ID, P97929), rat (Uniprot ID, Q35923) and chicken (Uniprot ID, Q8UW79) using ClustalW.

Results

The retrospective analysis of MGPT results identified at least one VUS in 185/357 probands (51.7%). In total, 16/357 probands (4.7%) had a variant in *BRCA1* and 30/357 (8.4%) in *BRCA2*. Of these, 4/357 (1.1%) unrelated probands carried different germline VUS in *BRCA1* and 12/357 (3.3%) unrelated probands carried 11 distinct germline VUS in *BRCA2* (two unrelated probands presented the same *BRCA2* VUS). The complete list of the sequenced genes in each of the 16 probands included in this study is shown in Supplementary Table 1. The 15 unique *BRCA1/2* VUS identified in these 16 probands were used as input to evaluate ACMG, Sherlock and ENIGMA classification pipelines (Figure 1, upper panel).

In order to exemplify the use of variant type, personal and family clinical data, variant segregation and co-occurrence of other variants in the classification process, we retrospectively collected the

type of *BRCA1/2* VUS and clinical data in our case series, as summarized in Table 1. This table also details other variants found in MGPT for each individual, as well as personal and family history of cancer. Three of the 16 selected patients had a heterozygous pathogenic variant in addition to the *BRCA1/2* VUS: one in *MUTYH* and two in *BRCA2* (highlighted in Table 1). Segregation of the detected variants in affected and non-affected family members was evaluated by review of the medical records and none of the 16 individuals included in this study had segregation analysis reported.

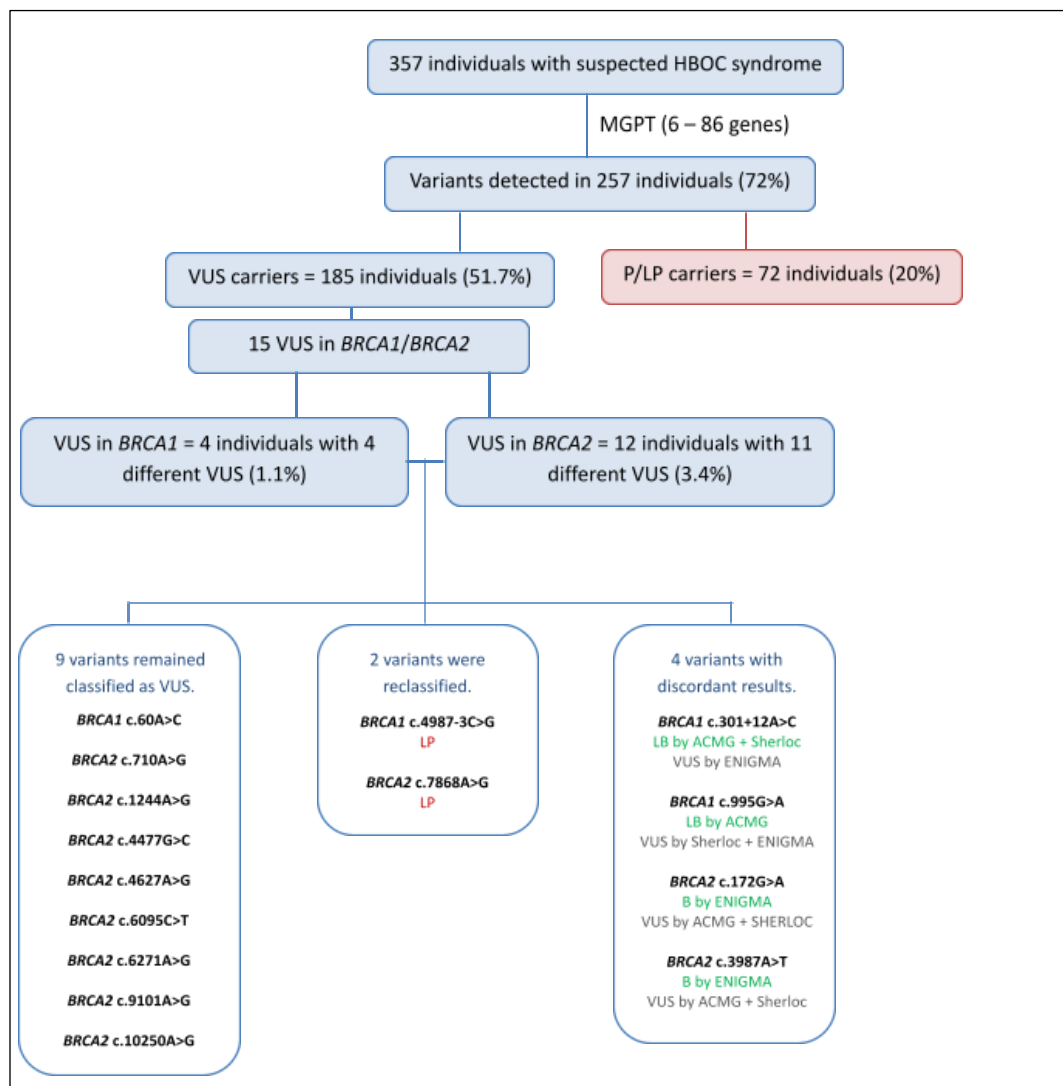


Figure 1. Schematic representation of the genetic variant reassessment process conducted in this study. *Different multi-gene panel testing was conducted for each individual depending on the laboratory and patient characteristics. P: Pathogenic; LP: Likely Pathogenic; B: Benign; LB: Likely Benign; VUS: Variant of Uncertain Significance.

Proband ID	Age at diagnosis (ys), 1 st cancer	Cancer type	Other cancer (age at diagnosis, ys)	Family history of cancer	Other variants detected (classification)	Variant detected in <i>BRCA1/2</i>	
						HGVS c.	HGVS p.
1	40	Breast	NA	Breast (4), melanoma (1), ovarian (1)	<i>ATM</i> (VUS), <i>RAD51C</i> (VUS)	<i>BRCA1</i> c.60A>C	p.(Lys20Asn)
2	NA	NA	NA	Breast (3), melanoma (1), renal (1)	No	<i>BRCA1</i> c.301+12A>C	-
3	50	Breast	Breast (50)	Breast (2), lung (1), colorectal (1)	No	<i>BRCA1</i> c.995G>A	p.(Arg332Gln)
4	39	Breast	NA	Pancreatic (1), gynecologic NOS (1)	<i>ATM</i> (VUS)	<i>BRCA1</i> c.4987-3C>G	-
5	39	Breast	Melanoma (38)	Breast (4), bone (1), leukemia (1)	<i>BRCA2</i> (P)	<i>BRCA2</i> c.172G>A	p.(Glu58Lys)
6	39	Breast	NA	Breast (2), thyroid (1)	<i>MUTYH</i> (P), <i>MSH6</i> (VUS)	<i>BRCA2</i> c.710A>G	p.(Asp237Gly)
7	NA	NA	NA	Breast (3), ovarian (2), gastric (1), CNS (1)	No	<i>BRCA2</i> c.1244A>G	p.(His415Arg)
8	NA	NA	NA	Breast (3), ovarian (1), pancreatic (1)	<i>BRCA2</i> (P)	<i>BRCA2</i> c.3987A>T	p.(Arg1329Ser)
9	42	Breast	NA	Breast (1), gastric (1), lung (1)	No	<i>BRCA2</i> c.4477G>C	p.(Glu1493Gln)
10	51	Breast	NA	Breast (2), prostate (1), melanoma (1), testicle (1), colorectal (2), lung (2), gastric (1), chondrosarcoma (1)	No	<i>BRCA2</i> c.4627A>G	p.(Lys1543Glu)
11	40	Breast	Colorectal (56)	Breast (2), gastric (1), glioblastoma (1)	<i>ALK</i> (VUS), <i>DICER</i> (VUS), <i>SUFU</i> (VUS)	<i>BRCA2</i> c.6095C>T	p.(Ala2032Val)
12	27	Breast	NA	Colorectal (1), lung (1), esophagus (1)	<i>ATM</i> (VUS)	<i>BRCA2</i> c.6095C>T	p.(Ala2032Val)
13	74	Ovarian	NA	Breast (1), gynecologic NOS (1), skin (1), prostate (1)	No	<i>BRCA2</i> c.6271A>G	p.(Ser2091Gly)
14	33	Breast	NA	Breast (5), pancreatic (1), prostate (1)	<i>APC</i> (VUS), <i>NF1</i> (VUS), <i>SDHD</i> (VUS)	<i>BRCA2</i> c.7868A>G	p.(His2623Arg)
15	47	Breast	Breast (47)	Breast (8), prostate (1), pancreatic (1), colorectal (3), bladder (1)	No	<i>BRCA2</i> c.9101A>G	p.(Gln3034Arg)
16	75	Breast	Colorectal (78)	Breast (3), pancreatic (1)	<i>ATM</i> (VUS)	<i>BRCA2</i> c.10250A>G	p.(Tyr3417Cys)

NA: Patient without first or second diagnosis of cancer at the time of assessment.

Table 1. Characterization of the probands carrying germline VUS in *BRCA1* and *BRCA2* included in this study.

We subsequently analyzed and compared the next points requested by the classification systems: the minor allele frequency (MAF), *in silico* prediction of variant effect and existence of functional studies (Figure 2). In addition to the recommended population databases, trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) and Online Archive of Brazilian Mutations (ABraOM) were also queried. Likewise, the selection of *in silico* algorithms for missense and splicing prediction was conducted as requested by each guideline. The characteristics among the three analyzed pipelines were compared in Figure 2, specifying the differentially algorithms used³²⁻⁴⁰. When analyzing our case series, none of the *BRCA1/BRCA2* VUS had a polymorphic population frequency (1% or greater) in the verified databases (Supplementary Table 2). *In silico* predictions exhibited contradictory results. As previously mentioned, there are no recommendations in the studied guidelines to search for *in-vitro* and *in-vivo* functional studies and thus we performed a literature search. No functional, *in silico* or exploratory studies were found referring to two of the fifteen VUS (13.3%), *BRCA2* c.3987A>T (rs786203361) and c.6095C>T (rs786202701). In contrast, nine studies (23.1%) were found citing the *BRCA1* c.995G>A (rs80357464) variant.

After comparing the three guidelines and gathering data to apply the classification criteria in our case series, we proceeded to the final variant reclassification assessments (Figure 1, lower panel). Two of the fifteen VUS (13.3%) were reclassified to actionable LP variants, 4/15 VUS (26.7%) were discordant about their reclassification results, illustrating the variability that results from using the 3 guidelines. The other 9 variants (60%) remained classified as VUS when using ACMG, Sherloc and ENIGMA criteria. Table 2 compares the final classification criteria applied in each of the 3 classification systems for the 15 different *BRCA1/2* VUS analyzed, together with ClinVar's last evaluation, review status and VarSome allocation. ClinVar and VarSome were not used in our classification process. Nine of the fifteen VUS (60%) had two stars in the ClinVar review status system, with criteria provided by multiple submitters and no conflicts of interpretation, while the other 6 VUS (40%) received only one star, ranked as conflicting interpretations or criteria provided by a single submitter.

Figure 3 depicts the number of variants reclassified in each category according to the three guidelines as well as the comparison of two ACMG independent analyses (VarSome and ours). As main findings, 4/15 VUS (26.6%) were discordant about their reclassification results, showing the variability among the guidelines used: *BRCA1* c.301+12A>C (rs863224757) (uncertain by the ENIGMA and likely benign by ACMG/Sherloc); *BRCA1* c.995G>A (probably benign by ACMG and uncertain by ENIGMA and Sherloc); *BRCA2* c.172G>A (rs397507603) and c.3987A>T (benign by ENIGMA and uncertain by ACMG/Sherloc).

	ACMG, 2015	Sherloc, 2017	ENIGMA, 2017
Suggested Protein Features Predictors	⊘	SIFT, PolyPhen-2 and AlignGVGD	Align-Prior
Suggested Splicing Features Predictors	⊘	MaxEntScan, SpliceSiteFinder-Like, NNSPLICE and Human Splice	MaxEntScan
Suggested Populational Databases	⊘	The Exome Aggregation Consortium (ExAC)	1000 Genomes Project, ExAC, The Cancer Genome Atlas, Genome Aggregation Database, Fabulous Ladies Over Seventy
<i>BRCA1/2</i> important domains	⊘	⊘	Provides tables with specific conserved and clinically important domains of <i>BRCA1/2</i>
<i>BRCA1/2</i> Specific Amino Acid Changes	⊘	⊘	Provides tables with specific and clinically important Amino Acid changes of <i>BRCA1/2</i>
Splice Site Changes	Variants occurring in the ± 1 or ± 2 position are an evidence of pathogenicity	Specific nucleotide donor and acceptor sites as pathogenic evidence	Variants occurring in the ± 1 or ± 2 position as pathogenic evidence. Provides tables with the most important sites
Co-Occurrence of a Pathogenic Variant in <i>BRCA1/2</i>	⊘	Co-occurrence with a pathogenic variant is considered benign evidence	Co-occurrence with a pathogenic variant is considered benign evidence
Co-Occurrence of Pathogenic Variants in other genes (not <i>BRCA1/2</i>)	Co-occurrence with a pathogenic a variant as benign evidence	Co-occurrence with a pathogenic a variant as benign evidence	⊘
Compiled Functional Data	⊘	⊘	Provides tables with functional evidence criteria of <i>BRCA1/2</i> variants to be
Multifactorial Model	⊘	⊘	Establishment of a multifactorial likelihood model to calculate the pathogenic probability, clinical and functional information

Figure 2. Comparison of the remarkable characteristics of the guidelines used in this study: ACMG and its refinement Sherloc, and ENIGMA.

Variant, rs	Date of genetic testing result	Last ClinVar evaluation* (query in April 12, 2022)	ACMG independent classification and criteria by VarSome** (April 12, 2022)	ACMG - our reclassification (May 14, 2021)	Sherloc reclassification and criteria (May 14, 2021)	ENIGMA reclassification and criteria (May 14, 2021)
<i>BRCA1</i> (c.60A>C) rs202168814	Jul 24, 2017	VUS (Jan 18, 2021) ²	Likely benign (BP6, BP7)	VUS (PP4)	VUS (EV101, EV0080, EV0034, EV0109)	VUS (Class 3 – items 3 and 5)
<i>BRCA1</i> (c.301+12A>C) rs863224757	Oct 31, 2014	Likely benign (Dec 06, 2020) ²	Likely benign (BP6, BP4)	Likely benign (PP4, BP4, BP6)	Likely benign (EV0053, EV0101, EV0103, EV0211, EV0191)	VUS (Class 3 – item 3)
<i>BRCA1</i> (c.995G>A) rs80357464	Nov 04, 2017	Conflicting interpretations of pathogenicity: VUS & Likely benign (Dec 02, 2020) ¹	VUS (PM2, BP4)	Likely benign (PP4, BP4, BP6)	VUS (EV0101, EV0080, EV0115, EV0126, EV0125)	VUS (Class 3 – item 3)
<i>BRCA1</i> (c.4987-3C>G) rs397509213	Jul 14, 2015	VUS (Jul 25, 2018) ²	Likely pathogenic (PM4, PM2, PP3)	Likely pathogenic (PS3, PM2, PP3, PP4)	Likely pathogenic (EV0135, EV0081, EV0026, EV0187)	Likely pathogenic (Class 4 – item 3)
<i>BRCA2</i> (c.172G>A) rs397507603	Jun 05, 2017	VUS (Jan 23, 2022) ²	VUS (PM2, PP3)	VUS (PP4)	VUS (EV0101, EV0080, EV0060, EV0109)	Benign (Class 1 – item 4)
<i>BRCA2</i> (c.710A>G) rs730881506	Dec 15, 2014	VUS (Jul 28, 2020) ²	VUS (PM2, BP4)	VUS (PM2, PP4, BP4)	VUS (EV0135, EV0211, EV0115, EV0126)	VUS (Class 3 – item 3)
<i>BRCA2</i> (c.1244A>G) rs80358417	Aug 01, 2016	Conflicting interpretations of pathogenicity: VUS & Likely benign (Apr 19, 2021) ¹	VUS (PM2, BP4)	VUS (PP4, BP6)	VUS (EV0101, EV0211, EV0109)	VUS (Class 3 – items 3 and 5)
<i>BRCA2</i> (c.3987A>T) rs786203361	May 16, 2017	Conflicting interpretations of pathogenicity: VUS & Likely benign (Jan 20, 2021) ¹	VUS (PM2, BP4)	VUS (PP4)	VUS (EV0101, EV0211, EV0115, EV0060, EV0126)	Benign (Class 1 – item 4)
<i>BRCA2</i> (c.4477G>C) rs398122782	May 31, 2016	VUS (Mar 23, 2016) ¹	VUS (PM2)	VUS (PP4, PM2)	VUS (EV0135, EV0081, EV0115, EV0109)	VUS (Class 3 – items 3 and 5)
<i>BRCA2</i> (c.4627A>G) rs786204239	Feb 01, 2015	VUS (Feb 28, 2020) ²	VUS (PM2)	VUS (PP4)	VUS (EV0135, EV0081, EV0109)	VUS (Class 3 – items 3 and 5)

Variant, rs	Date of genetic testing result	Last ClinVar evaluation* (query in April 12, 2022)	ACMG independent classification and criteria by VarSome** (April 12, 2022)	ACMG - our reclassification (May 14, 2021)	Sherloc reclassification and criteria (May 14, 2021)	ENIGMA reclassification and criteria (May 14, 2021)
<i>BRCA2</i> (c.6095C>T) rs786202701	Mar 20, 2017	Conflicting interpretations of pathogenicity: VUS & Likely benign (Jun 3, 2021) ¹	Likely benign (BP3, BP4, PM2)	VUS (PP4, BP4)	VUS (EV0101, EV0080, EV0115, EV0126, EV0125)	VUS (Class 3 – items 3 and 5)
<i>BRCA2</i> (c.6271A>G) rs398122550	Oct 28, 2015	VUS (Oct 26, 2020) ²	VUS (PM2, BP4)	VUS (PP4, BP6)	VUS (EV0135, EV0211, EV0115, EV0109)	VUS (Class 3 – items 3 and 5)
<i>BRCA2</i> (c.7868A>G) rs80359012	Jun 26, 2017	Likely pathogenic & Pathogenic (Mar 8, 2021) ²	Pathogenic (PM2, PP5, PM1, PP3)	Likely pathogenic (PS3, PM2, PP4, PP5)	Likely pathogenic (EV0135, EV0081, EV0115, EV0023, EV0122, EV0121)	Likely pathogenic (Class 4 – item 1)
<i>BRCA2</i> (c.9101A>G) rs80359164	Oct 20, 2016	VUS (Apr 11, 2021) ²	VUS (PM2, BP4)	VUS (PP4, BP4)	VUS (EV0101, EV0081, EV0115, EV0126, EV0127)	VUS (Class 3 – items 3 and 5)
<i>BRCA2</i> (c.10250A>G) rs730881600	Oct 06, 2016	Conflicting interpretations of pathogenicity: VUS & Likely benign (Jul 30, 2020) ¹	VUS (PM2, BP4)	VUS (PM2, PP4, BP6)	VUS (EV0135, EV0211, EV0115, EV0109)	VUS (Class 3 – items 3 and 5)

* ClinVar review status suggests categorizations made by laboratories using a four star system to represent the level of information supporting the overall interpretation; 1 = criteria provided by a single submitter or conflicting interpretations; 2 = criteria provided by multiple submitters, no conflicts; 3 = reviewed by expert panel; 4 = practice guideline. For more details, please refer to: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/docs/review_status/>.

**VarSome Human Genomic Community ACMG Classification. For more details, please refer to: <<https://varsome.com/>>.

Table 2. Reassessment of the fifteen variants of unknown significance in *BRCA1/2* genes identified in our case series.

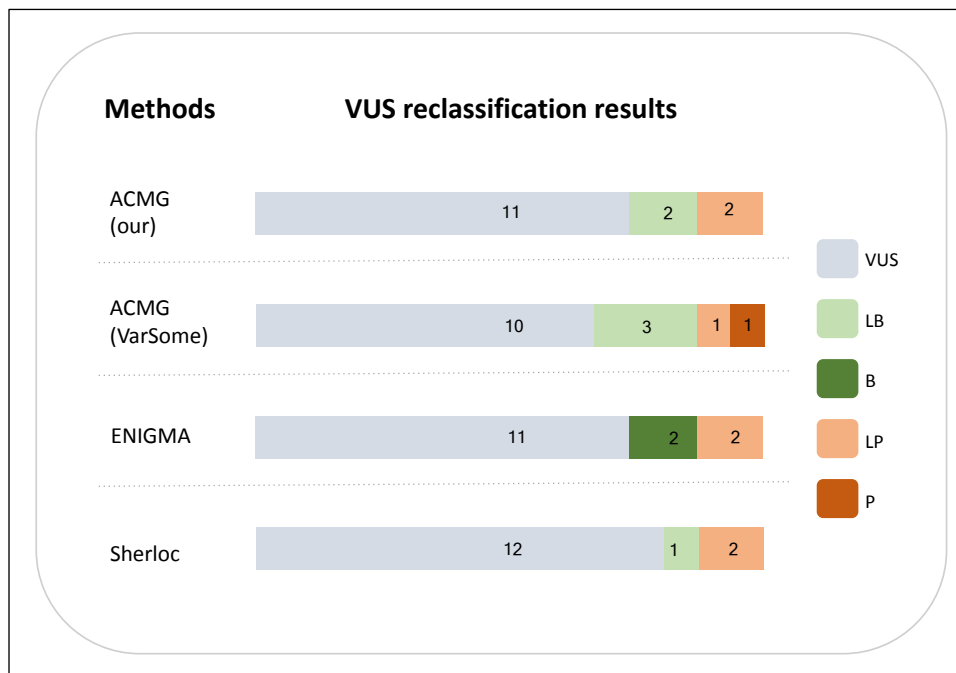


Figure 3. Reanalysis results of *BRCA1/2* VUS according to the different guidelines, showing the number of variants stratified by categories of reclassification using ACMG, ENIGMA and Sherlock workflows. Comparison of the ACMG variant final classification by two independent analysis (VarSome and our classification) is also depicted. VUS: Variant of Unknown Significance; LP: Likely Pathogenic; P: Pathogenic; LB: Likely Benign; B: Benign.

Two of the fifteen VUS (13.3%) were upgraded in our classification when comparing to initial genetic testing result: *BRCA1* c.4987-3C>G (rs397509213) and *BRCA2* c.7868A>G (rs80359012) were reclassified as likely pathogenic by ACMG/Sherloc and ENIGMA analyses. Differently, *BRCA2* c.7868A>G was reclassified as pathogenic by ACMG-based VarSome classification, highlighting the subjective nature of some criteria in this guideline (Supplementary Table 3). Also, we were able to visualize this variant in the 3D structure of BRCA2. We identified the mutated residue H2544 (human H2623) in the 3D structure of the mouse BRCA2-DSS1 complex and assessed the impact of the alteration on the local protein structure⁴¹ (Figure 4). The residue is located on the face of the helix HD α 9 that interacts with OB1 and DSS1 domains. H2544 (human H2623) is involved in hydrogen bond contacts with Y2624 (human Y2726, OB1 domain) and R2659 (human R2659, Helical domain). R2580 (human R2659) is involved in hydrogen bonds contacts with G2645 (human G2724, OB1 domain). This network of hydrogen-bonds seems to be crucial to the integrity of the helical-OB1 interface. Specific portions of the helical domain (α 9 and α 10) that pack with the OB1 domain contain some of the best-conserved segments of the

entire BRCA2 DNA/DSS1 binding domain (Figure 4)⁴¹ and this evidence adds to support reclassification of this VUS into an actionable variant.

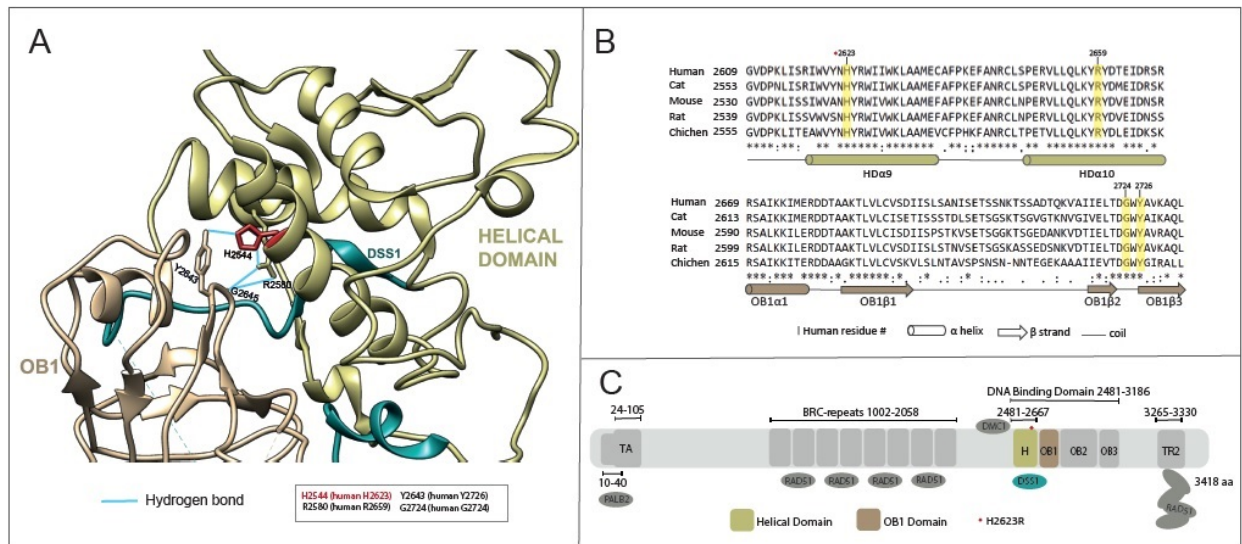


Figure 4. Structural assessment of the predicted pathogenic variant H2623R. A) The 3D structure of the mouse BRCA2-DSS1 complex. Y2643 (human Y2776) and R2580 (human R659) are involved in the establishment of hydrogen bonds with H2544 (human H2623). B) Amino acid sequence alignment of the relevant regions of the BRCA2 COOH-terminal domain binds to DSS1 and ssDNA. Yellow boxes indicate residues involved in hydrogen bonds with H2623. C) Schematic diagram of gene structure of *BRCA2*. The pathogenic variant H2623R is highlighted in red and the Helical Domain and OB1 Domain in gold and brown respectively. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Finally, Table 3 cites the possible inherent errors associated with the variant classification process and suggestions to manage and avoid these inaccuracies. We observed that these points are the most critical and subjective during the reclassification process. We organized the table according to evidence type and category (rule sets) for the variant classification guidelines ACMG/Sherloc and ENIGMA.

Discussion

In the present study, three currently well-known variant classification guidelines were compared, focusing in the context of cancer predisposition syndromes, precisely HBOC. The first impression

perceived when using the three guidelines is the difference among their arrangements, criteria distribution and how they are summed up to achieve a final classification. In the ACMG pipeline, the amount of evidence immediately provides the final classification; in Sherlock, there is a scoring system that considers different values for each piece of evidence before final classification; and ENIGMA has a set of statements which can be added or excluded in order to meet a variant class. In the three analyzed systems, the characterization of variant type and clinical data of the probands are important points for variant classification. Both ACMG and Sherlock have similar approaches to weigh variant types, effects (missense, nonsense, frameshift, others) and location in a mutational hotspot. Sherlock also specifies the presence of intronic variants in conserved donor and acceptor sites as strong evidence for pathogenicity. Differently, ENIGMA brings a set of *BRCA1/2* conserved and clinically important amino acid residues. Regarding the personal clinical data, the three guidelines recommend the association of the variant detected with disease-specific phenotype. Family history of the disease and segregation of the variant of interest are other important criteria to be considered. Only Sherlock defines the minimal number of analyzed individuals and/or families that are necessary to assign evidence level related to segregation. Additionally, each guideline has specific instructions regarding variant co-occurrence with the VUS: in ACMG, the presence of a pathogenic variant in a highly penetrant dominant gene *in trans* or *in cis* is benign evidence in affected patients; in contrast, Sherlock reports different criteria for affected and unaffected patients considering variant co-occurrence in the same or other genes along with clinical data, such as symptom onset and phenotype severity; and ENIGMA solely takes into account the co-occurrence in *trans* with variants in the same gene, specifically *BRCA1/2*.

We observed that patient, family and variant information required by the guidelines are not always complete and readily available for variant analysis. The lack of information could result in confusion, use of inadequate tools/data in the process and a much longer period of time for reclassification of the variant in question. In most of the studies found in the literature, VUS are commonly reclassified as benign/likely benign variants. For instance, Welsh and colleagues (2017) demonstrated that 20% of their *BRCA1/2* detected VUS were reclassified as benign and only 1% as pathogenic using the ENIGMA consortium rules⁴. Several studies conducted in high-income countries show that new evidence regarding variant characteristics allows 7.7% to 14.7% of *BRCA1/2* VUS reclassification in less than 2 years after their identification⁴²⁻⁴⁴. In our study, held in a middle-income country, with an admixed population that has only recently been more systematically studied for *BRCA1* and *BRCA2* germline variants, the average time between report and reanalysis of the variants was higher (3.3 years). For individuals and families where genetic

Evidence Type	Category	Guideline Considered					
		ACMG, 2015		Sherloc, 2017		ENIGMA, 2017	
		Inherent errors	Management suggestions	Inherent errors	Management suggestions	Inherent errors	Management suggestions
Clinical	Population Frequency	<ul style="list-style-type: none"> Specific populational databases suggested by the guideline. Execution personal-dependent errors might be associated. 	<ul style="list-style-type: none"> Record of the carried-out processes and pairs revision by the clinical team. If using more than one guideline compare the obtained prediction results. Encourage family members to perform segregation studies and participate whenever it's possible. 	<ul style="list-style-type: none"> Specific populational databases suggested by the guideline. Execution personal-dependent errors might be associated. Encourage family members to perform segregation studies and participate whenever it's possible. 	<ul style="list-style-type: none"> Record of the carried-out processes and pairs revision by the clinical team. If using more than one guideline compare the obtained prediction results. 	<ul style="list-style-type: none"> Specific populational databases suggested by the guideline. Execution personal-dependent errors might be associated. Encourage family members to perform segregation studies and participate whenever it's possible. 	<ul style="list-style-type: none"> Record of the carried-out processes and pairs revision by the clinical team. If using more than one guideline compare the obtained prediction results.
	Population Homozygotes						
	Observations in Unaffected individuals						
	Observations in Affected individuals	<ul style="list-style-type: none"> Observations in the patients' and family members' phenotype, and case-control studies suggested by the guideline. Loss of follow up with the patient. Non complete medical and family history records. Criteria poorly evaluated due lack of information. Type of genetic test performed. 	<ul style="list-style-type: none"> Regular contact with patients to update its medical history and exams. Regular literature review case-control studies with pairs revision. Encourage family members to perform segregation studies and participate whenever it's possible. Collect as much information as possible to correctly evaluate the guidelines' criteria. 	<ul style="list-style-type: none"> Observations in the patients' phenotype suggested by the guideline. Evaluation of the occurrence of the variant in populational databases or literature suggested by the guideline. Loss of follow up with the patient. Non complete medical and family history records. Criteria poorly evaluated due lack of information. Type of genetic test performed. 	<ul style="list-style-type: none"> Attention to patients' and family members' phenotype. Encourage family members to perform segregation studies and participate whenever it's possible. Evaluate the presence of other variants in the same position, cis and trans. Regular contact with patients to update its medical history and exams. If possible and/or when necessary, perform a wider genetic test. Collect as much information as possible to correctly evaluate the guidelines' criteria. 	<ul style="list-style-type: none"> No suggestions made to the patients' phenotype or observations in affected individuals. Erroneous information considered. Type of genetic test performed. Loss of follow up with the patient. Criteria poorly evaluated due lack of information. 	<ul style="list-style-type: none"> Regular contact with patients to update its medical history and exams. Encourage family members to perform segregation studies and participate whenever it's possible. If possible and/or when necessary, perform a wider genetic test. Establishment of a routine and/or scheme of evaluation of the patients' phenotype and affected member of the family.
	Individual Observations - clinical features						
Co-occurrence in Affected individuals	<ul style="list-style-type: none"> Co-occurrence with pathogenic variants 	<ul style="list-style-type: none"> Encourage family members to perform 	<ul style="list-style-type: none"> Co-occurrence with pathogenic variants in 	<ul style="list-style-type: none"> Encourage family members to perform 	<ul style="list-style-type: none"> Co-occurrence with pathogenic variants 	<ul style="list-style-type: none"> Encourage family members to perform 	

		<p>in other genes is considered benign evidence.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Limitations such as type of genetic test performed and availability of family members for segregation studies. ▪ Wrongly classified co-variants. 	<p>segregation studies and participate whenever it's possible.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ If possible and/or when necessary, perform a wider genetic test. ▪ Collect as much information as possible to correctly evaluate the guidelines' criteria. 	<p><i>BRCA1/2</i> and/or other genes is considered benign evidence.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Limitations such as type of genetic test performed and availability of family members for segregation studies. ▪ Wrongly classified co-variants. 	<p>segregation studies and participate whenever it's possible.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ If possible and/or when necessary, perform a wider genetic test. ▪ Collect as much information as possible to correctly evaluate the guidelines' criteria. 	<p>in <i>BRCA1/2</i> is considered benign evidence.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ Limitations such as type of genetic test performed and availability of family members for segregation studies. ▪ Wrongly classified co-variants. 	<p>segregation studies and participate whenever it's possible.</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ If possible and/or when necessary, perform a wider genetic test. ▪ Collect as much information as possible to correctly evaluate the guidelines' criteria.
Functional	Functional Experiments	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Guideline does not specify and suggest type of sample, lab assays or functional studies. ▪ Availability of equipment and reagents. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ensure that the experiments performed are revised and validated to guarantee quality and accuracy. ▪ Revision of the procedure itself, reagents and equipment used. ▪ Revision of the classification criteria of the guideline and the obtained result. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Specific type of sample, lab assays and functional studies suggested by the guideline. ▪ Availability of equipment and reagents. ▪ Results must be reproducible and correctly interpreted. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ensure that the experiments performed are revised and validated to guarantee quality and accuracy. ▪ Revision of the procedure itself, reagents and equipment used. ▪ Revision of the classification criteria of the guideline and the obtained result. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Specific type of sample, lab assays and functional studies suggested by the guideline. ▪ Availability of equipment and reagents. ▪ Results must be reproducible and correctly interpreted. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Ensure that the experiments performed are revised and validated to guarantee quality and accuracy. ▪ Revision of the procedure itself, reagents and equipment used. ▪ Revision of the classification criteria of the guideline and the obtained result.
	Laboratory Assays						
	Computational & Predictive analyses	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Guideline does not specify algorithms or predictors to be considered. ▪ Non reproducible results if a pattern is not followed. ▪ Software availability and knowledge. ▪ Erroneous assessments and criteria considered. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Establishment of pattern of information and tools considered to obtain reproducible results. ▪ Record of the carried-out processes and pairs revision by the clinical team. ▪ If using more than one guideline compare the obtained prediction results. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Specific protein features, splicing predictors and algorithms suggested by the guideline. ▪ Likelihood multifactorial model suggested. ▪ Execution personal-dependent inherent errors might be associated. ▪ Software availability and knowledge. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Record of the carried-out processes and pairs revision by the clinical team. ▪ If using more than one guideline compare the obtained prediction results. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Specific protein features, splicing predictors and algorithms suggested by the guideline. ▪ Likelihood multifactorial model suggested. ▪ Execution personal-dependent inherent errors might be associated. ▪ Software availability and knowledge. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Record of the carried-out processes and pairs revision by the clinical team. ▪ If using more than one guideline compare the obtained prediction results.
	Variant Effects						

Table 3. Possible inherent errors and management suggestions to the *BRCA1/2* VUS reclassification process.

counseling and cancer prevention are applicable, one year can be a significant period of time in terms of reclassification, having also a direct impact on screening, diagnosis and treatment access for the patient and at-risk relatives.

We hypothesize that the establishment of a framework to reassess VUS could improve this process in places that have not implemented this practice yet. This framework should include critical points such as choosing the most appropriate guideline, determining which steps should be followed to perform the reclassification, and the availability of qualified professionals dedicated to this work. The present analysis allows us to conclude that the performance of the three guidelines is limited by the extensive information requested to achieve variant classification, complicating the choice of a guideline. As shown in Figure 2, the Sherlock guideline required the largest amount of information. However, when the data is available, this guideline provides the most reliable variant classification for general phenotypes by applying well described and less subjective criteria. On the other hand, in the context of HBOC syndrome, ENIGMA is a more specific guideline that compiles a set of specific data related to the *BRCA1/2* genes, and could be the most appropriate approach to analyze variants occurring in these genes. Indeed, there are initiatives to create workgroups in order to establish gene specific guidelines for variant reassessment⁴⁵. Another critical point is related to access to genetic care and insufficient number of genetically trained healthcare professionals to perform periodic evaluation of variant status. For instance, in Brazil, the public health care system, upon which about 70% of the population depends, does not offer *BRCA1/BRCA2* testing. In addition, in the private sector, although the number of commercial laboratories providing *BRCA1/BRCA2* testing has significantly increased over the last decade, none of them provides the service of variant reclassification. The lack of specialized consultants certainly results in a delay in reassessment and reclassification⁴⁶⁻⁴⁷.

It is important to acknowledge that this study presents some limitations. First, we did not perform functional studies for the VUS analyzed but recognize that there are regional difficulties to conduct functional *in vitro* studies. For example, from the 39 studies selected by us to review the functional status of the VUS reanalyzed here, only nine (23.1%) addressed functional analysis, all of them conducted in other countries. Second, population data important for VUS reclassification are scarce for Brazilians, since this population, unique in its admixed structure, is under-represented in genetic population databases. Third, updates on the cancer family history were difficult to obtain, even though the index cases were asked to report any changes in family history and genetic testing upon recruitment and segregation analysis of the VUS in the families was possible only in a minority of cases. Fourth, the evaluation of co-occurring variants in the same gene and whether they occur *in cis* or *in trans* has also not been performed during the NGS

assessment.

In spite of the limitations, we were still able to reclassify two variants and contribute novel information which may support reclassification of four VUS. *BRCA1* c.4987-3C>G and *BRCA2* c.7868A>G were reclassified as likely pathogenic by ACMG, Sherloc and ENIGMA and more appropriate clinical management will now be offered to these patients. *BRCA1* c.4987-3C>G was found in a proband diagnosed with triple negative breast cancer. Functional studies published in 2012 and 2018 suggest that the variant interferes with correct splicing, resulting in exon 17 skipping and generation of a truncated protein^{48,49}. In addition, the variant is absent from population databases and has been reported in two unrelated cancer affected patients, which suffices to reclassify it as likely pathogenic. Family segregation studies for this variant would have helped to classify it as definitively pathogenic but they were not possible due to family unavailability. *BRCA2* c.7868A>G, identified in a patient with an extensive family history of breast cancer, was first described in 2008 and it was reported in our proband in June 2017. In April 2019, at the time this study was initiated, ClinVar reported conflicting interpretations for this variant (VUS and likely pathogenic). In our re-interpretation, we considered that this variant is absent in the general population, it is reported in two unrelated cases and has strong functional and bioinformatics evidence of pathogenicity. Reclassification to likely pathogenic/pathogenic was modified by ClinVar in 2021. In both cases where a variant originally classified as VUS was reclassified to a likely pathogenic variant, genetic counseling for the proband and other family members was provided.

The variant is also absent from population databases and has been reported in several cancer affected individuals. Again segregation analysis in the family was not possible. Its pathogenicity was also assessed through the multifactorial likelihood model proposed by ENIGMA. Furthermore, our 3D structure analysis for this variant showed the importance of the histidine residue 2623 in the *BRCA2* protein, corroborating the pathogenicity evidence already described. Although this *in silico* approach is not mentioned in the guidelines, it is important that more accessible strategies are explored so that the findings can be validated *in vitro* or *in vivo* in the future.

Other 4 detected VUS were discordant about their reclassification (26.6%). *BRCA1* c.301+12A>C remained classified as uncertain by ENIGMA, but as likely benign by ACMG/Sherloc. This variant only remained uncertain by ENIGMA because it did not fulfill class 1 criterion, since it is an intronic variant with low bioinformatics likelihood to disrupt splicing and did not co-occur with another pathogenic variant in the same gene. *BRCA1* c.995G>A was reclassified as probably benign by ACMG, but continued as VUS by Sherloc and ENIGMA due insufficient data to fulfill

more stringent criteria. *BRCA2* c.172G>A and c.3978A>T remained as VUS by ACMG/Sherloc, but were reclassified as benign by ENIGMA, considering a Prior Pathogenicity Probability $\leq 0,02$ and co-occurring with another known pathogenic variant in *BRCA2*.

The discordance among guidelines observed in this study is likely due to the refinement level of their criteria. Sherloc, in addition to the strong framework of the 33 rules already established by ACMG, introduced 108 novel detailed refining points, being recently described as a more robust approach to variant classification^{11,12}. Distinctly, ENIGMA was specifically designed for variants detected in *BRCA1/2*, having its criteria targeting location, residues and determined splice pattern modifications, which also may contribute to a more accurate classification process¹³. Finally, the different ACMG criteria applied by our reassessment compared to VarSome classification are an example of how data availability for a specific variant could influence variant reassessment. This difference could also be attributed to the more subjective criteria of the ACMG guidelines.

Conclusions

Our results highlight the challenges involved in classification and reassessment of variants identified in cancer predisposition genes. However, even though the process is complex, in the clinic it is imperative to periodically review VUS due to the impact in clinical management, as exemplified here. Currently, there is no established consensus workflow for VUS reanalysis. We suggest that regular monitoring of the functional, clinical, familial and bioinformatics data of VUS should be done in clinical practice by a multidisciplinary team. Specifically regarding bioinformatics analysis, standardized use of bioinformatics predictors should be implemented to minimize contradictory results in variant reassessment using these tools. The choice of which guideline to use is also important. When there is a specific framework for a given gene, such as ENIGMA for *BRCA1/2*, it could be a more robust system. Finally our results also underscore the importance of encouraging health care professionals in the field to attempt, in all cases where a VUS is identified (i) to recruit relatives for variant segregation studies; (ii) to thoroughly assess family and personal cancer history; (iii) to conduct and/or search for functional/penetrance studies; and (iv) to publish VUS results in the international scientific literature or in public variant databases, since it may be or become valuable information for variant reassessment.

Figure legends

Figure 1. Schematic representation of the *BRCA1/2* genetic variant reassessment process conducted in this study and main findings. P: Pathogenic; LP: Likely Pathogenic; B: Benign; LB: Likely Benign; VUS: Variant of Uncertain Significance.

Figure 2: Comparison of the remarkable characteristics of the guidelines used in this study: ACMG and its refinement Sherlock, and ENIGMA.

Figure 3. Reanalysis results of *BRCA1/2* VUS according to the different guidelines, showing the number of variants stratified by categories of reclassification using ACMG, ENIGMA and Sherlock workflows. Comparison of the ACMG variant final classification by two independent analyses (VarSome and our classification) is also depicted. VUS, variant of uncertain significance; LP, likely pathogenic; LB, likely benign; P, pathogenic; B, benign.

Figure 4. Structural assessment of the predicted pathogenic variant H2623R. A) The 3D structure of the mouse BRCA2-DSS1 complex. Y2643 (human Y2776) and R2580 (human R2659) are involved in the establishment of hydrogen bonds with H2544 (human H2623). B) Amino acid sequence alignment of the relevant regions of the BRCA2 COOH-terminal domain bound to DSS1 and ssDNA. Yellow boxes indicate residues involved in hydrogen bonds with H2623. C) Schematic diagram the gene structure of *BRCA2*. The pathogenic variant H2623R is highlighted in red and the Helical Domain and OB1 Domain in gold and brown respectively.

References

- Howlader N NA, Krapcho M, et al. SEER*Explorer. Recent trends in SEER incidence rates, 2000- 2017, by race/ethnicity, male, all ages, all stages, observed rates <https://seer.cancer.gov/explorer/> National Cancer Institute. Bethesda, MD; 2020.
- Lux MP, Fasching PA, Beckmann MW. Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives. *J Mol Med (Berl)*. Jan 2006;84(1):16-28. doi:10.1007/s00109-005-0696-7
- FOUNTZILAS C, KAKLAMANI VG. Multi-gene Panel Testing in Breast Cancer Management. *Treat Res*. 2018; 173: 121-140. doi: 10.1007/978-3-319-70197-4_8.
- Padamsee TJ, Wills CE, Yee LD, Paskett ED. Decision making for breast cancer prevention among women at elevated risk. *Breast Cancer Res*. 03 2017;19(1):34. doi:10.1186/s13058-017-0826-5
- Welsh JL, Hoskin TL, Day CN, et al. Clinical Decision-Making in Patients with Variant of Uncertain Significance in BRCA1 or BRCA2 Genes. *Ann Surg Oncol*. Oct 2017;24(10):3067-

3072. doi:10.1245/s10434-017-5959-3

Stafford L, Flehr A, Judd F, et al. Experiences and interpretations of BRCA1/2 testing among women affected by breast or ovarian cancer who received a negative result. *J Community Genet.* Oct 2019;10(4):501-514. doi:10.1007/s12687-019-00415-w

Richter S, Haroun I, Graham TC, Eisen A, Kiss A, Warner E. Variants of unknown significance in BRCA testing: impact on risk perception, worry, prevention and counseling. *Ann Oncol.* Nov 2013;24 Suppl 8:viii69-viii74. doi:10.1093/annonc/mdt312

Haroun I, Graham T, Poll A, et al. Reasons for risk-reducing mastectomy versus MRI-screening in a cohort of women at high hereditary risk of breast cancer. *Breast.* Jun 2011;20(3):254-8. doi:10.1016/j.breast.2011.01.006

Culver JO, Brinkerhoff CD, Clague J, et al. Variants of uncertain significance in BRCA testing: evaluation of surgical decisions, risk perception, and cancer distress. *Clin Genet.* Nov 2013;84(5):464-72. doi:10.1111/cge.12097

Chern JY, Lee SS, Frey MK, Lee J, Blank SV. The influence of BRCA variants of unknown significance on cancer risk management decision-making. *J Gynecol Oncol.* Jul 2019;30(4):e60. doi:10.3802/jgo.2019.30.e60

Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* May 2015;17(5):405-24. doi:10.1038/gim.2015.30

Nykamp K, Anderson M, Powers M, et al. Sherlock: a comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genet Med.* 10 2017;19(10):1105-1117. doi:10.1038/gim.2017.37

ENIGMA Consortium. Accessed July, 2021. <http://www.enigmaconsortium.org/>.

Plon SE, Eccles DM, Easton D, et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. *Hum Mutat.* Nov 2008;29(11):1282-91. doi:10.1002/humu.20880

Laraqui A, Uhrhammer N, Lahlou-Amine I, et al. Mutation screening of the BRCA1 gene in early onset and familial breast/ovarian cancer in Moroccan population. *Int J Med Sci.* 2013;10(1):60-7. doi:10.7150/ijms.5014

Howlander N NA, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA. Data from: SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. 2019. *Bethesda, MD*,. Deposited April 2019.

Antoniou AC, Gayther SA, Stratton JF, Ponder BA, Easton DF. Risk models for familial

ovarian and breast cancer. *Genet Epidemiol*. Feb 2000;18(2):173-90. doi:10.1002/(SICI)1098-2272(200002)18:2<173::AID-GEPI6>3.0.CO;2-R

Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. Anglian Breast Cancer Study Group. *Br J Cancer*. Nov 2000;83(10):1301-8. doi:10.1054/bjoc.2000.1407

Shao D, Cheng S, Guo F, et al. Prevalence of hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) predisposition gene mutations among 882 HBOC high-risk Chinese individuals. *Cancer Sci*. Feb 2020;111(2):647-657. doi:10.1111/cas.14242

Kurian AW. BRCA1 and BRCA2 mutations across race and ethnicity: distribution and clinical implications. *Curr Opin Obstet Gynecol*. Feb 2010;22(1):72-8. doi:10.1097/GCO.0b013e328332dca3

Hall MJ, Reid JE, Burbidge LA, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer. *Cancer*. May 2009;115(10):2222-33. doi:10.1002/cncr.24200

Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, et al. Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. *J Clin Oncol*. Mar 2002;20(6):1480-90. doi:10.1200/JCO.2002.20.6.1480

Murray ML, Cerrato F, Bennett RL, Jarvik GP. Follow-up of carriers of BRCA1 and BRCA2 variants of unknown significance: variant reclassification and surgical decisions. *Genet Med*. Dec 2011;13(12):998-1005. doi:10.1097/GIM.0b013e318226fc15

Jones T, Trivedi MS, Jiang X, et al. Racial and Ethnic Differences in *BRCA1/2* and Multigene Panel Testing Among Young Breast Cancer Patients. *Journal of Cancer Education* 2021, 36:463-469. doi: 10.1007/s13187-019-01646-8.

Murray ML, Cerrato F, Bennet RL, et al. Follow-up of carriers of *BRCA1* and *BRCA2* variants of unknown significance: Variant reclassification and surgical decisions. *Genetics in Medicine*, 2011 13, 12, 998-1005. doi: 10.1097/GIM.0b013e318226fc15.

. Nanda R, Schumm LP, Cummings S, et al. Genetic testing in an ethnically diverse cohort of high-risk women: a comparative analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in American families of European and African ancestry. *JAMA* 2005, 294(15): 1925-33. doi: 10.1001/jama.294.15.1925.

Weitzel JN, Lagos V, Blazer KR, et al. Prevalence of BRCA mutations and founder effect in high-risk Hispanic families. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, 14(7): 1666-71. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0072.

Welsh JL, Hoskin TL, Day CN, et al. Clinical Decision-Making in Patients with Variant of

Uncertain Significance in BRCA1 or BRCA2 Genes. *Ann Surg Oncol* 2017, 24(10): 3067-3072. doi: 10.1245/s10434-017-5959-3.

Chern J, Lee SS, Frey MK, et al. The influence of BRCA variants of unknown significance on cancer risk management decision-making. *J Gynecol Oncol* 2019, 30(4). doi: 10.3802/jgo.2019.30.e60.

Herzog JS, Chavarri-Guerra Y, Castillo D, et al. Genetic epidemiology of *BRCA1- and BRCA2-* associated cancer across Latin America. *npj Breast Cancer* 2021, 7:107. doi: 10.1038/s41523-021-00317-6

Daly MB, Axilbund JE, Buys S, et al. Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian. *J Natl Compr Canc Netw*. May 2010;8(5):562-94. doi:10.6004/jnccn.2010.0043

Allot A, et al. LitVar: a semantic search engine for linking genomic variant data in PubMed and PMC. *Nucleic Acids Res* 2018, 46; W1 doi: 10.1093/nar/gky355

Landum MJ, Lee JM, Riley GR, et al. ClinVar: a public archive of relationships among sequence variation and human phenotype. *Nucleic Acids Res*. Jan 2014; 42 (Database issue):D980-5. doi:10.1093/nar/gkt1113.

Kopanos C, Tsiolkas K, Kouris A, et al. VarSome: the human genomic variant search engine. *Bioinformatics*. Jun 2019;35(11): 1978-1980. doi: 10.1093/bioinformatics/bty897

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. Oct 2004; 25(13):1605-12. doi:10.1002/jcc.20084

Yeo G, Burge CB. Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals. *J Comput Biol*. 2004;11(2-3):377-94. doi:10.1089/1066527041410418

Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res*. Sep 1987;15(17):7155-74. doi:10.1093/nar/15.17.7155

Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C. Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res*. May 2009;37(9):e67. doi:10.1093/nar/gkp215

Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol*. 1997;4(3):311-23. doi:10.1089/cmb.1997.4.311

Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*. 1974; 185(4154): 862-4. doi: 10.1126/science.185.4154.862.

Yang H, Jeffrey PD, Miller J, et al. BRCA2 function in DNA binding and recombination from BRCA2- DSS1-ssDNA structure. *Science*. Sep 2002; 297 (5588):1837-48. doi:

10.1126/science.297.5588.1837.

Mighton C, Charames GS, Wang M, et al. Variant classification changes over time in BRCA1 and BRCA2. *Genet Med*. 10 2019;21(10):2248-2254. doi:10.1038/s41436-019-0493-2

Macklin S, Durand N, Atwal P, Hines S. Observed frequency and challenges of variant reclassification in a hereditary cancer clinic. *Genet Med*. Mar 2018;20(3):346-350. doi:10.1038/gim.2017.207

Mersch J, Brown N, Pirzadeh-Miller S, et al. Prevalence of Variant Reclassification Following Hereditary Cancer Genetic Testing. *JAMA*. 09 2018;320(12):1266-1274. doi:10.1001/jama.2018.13152

Rehm HL, Berg JS, Brooks LD, et al. ClinGen - The Clinical Genome Resource. *The New England Journal of Medicine* 2015, 372: 2235-2242. doi: 10.1056/NEJMSr1406261.

Donohue KE, Gooch C, Katz A, Wakelee J, Slavotinek A, Korf BR. Pitfalls and challenges in genetic test interpretation: An exploration of genetic professionals experience with interpretation of results. *Clin Genet*. 2021 May;99(5):638-649. doi: 10.1111/cge.13917.

Ciucă, A., Moldovan, R. & Băban, A. Developing genetic counselling services in an underdeveloped healthcare setting. *J Community Genet* 12, 539–548 (2021). doi: 10.1007/s12687-021-00546-z

Brandão RD, van Roozendaal KE, Tserpelis D, Caanen B, Gómez García E, Blok MJ. BRCA1 c.4987-3C>G is a pathogenic mutation. *Breast Cancer Res Treat*. Jan 2012;131(2):723-5. doi:10.1007/s10549-011-1878-3

Findlay GM, Daza RM, Martin B, et al. Accurate classification of BRCA1 variants with saturation.

7.1 Resumo publicado e apresentado em formato oral (41ª Semana Científica do HCPA)

Reassessment of *BRCA1/2* variants of unknown significance: an analysis using different classification guidelines

Kayana Isabel Weber de Souza, Tiago Finger Andreis, Bárbara Alemar, Yasminne Marinho de Araújo Rocha, Osvaldo Artigalás, Camila Bittar, Cristina Brinckmann Oliveira Netto, Patricia Ashton-Prolla, Clévia Rosset.

Introduction: Description of germline variants of unknown significance (VUS) is quite common in individuals with suspected hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC). Currently, VUS detection is considered a non-actionable finding. Thus, these variants must be periodically revised with appropriate classification guidelines searching for new epidemiologic or functional evidence to classify them as pathogenic or benign. We aimed to reanalyze *BRCA1/2* VUS detected between 2014 and 2017 in patients with suspected HBOC from southern Brazil, comparing the most common guidelines for reclassification and highlighting the challenges of VUS reclassification. Methods: Among 357 unrelated individuals submitted to germline *BRCA1/2* testing, 4 *BRCA1* VUS and 12 *BRCA2* VUS were detected. These variants were revised using the ACMG guidelines and its Sherlock refinement and ENIGMA consortium guidelines. Results and Conclusion: Two of the VUS were reclassified as likely pathogenic by the 3 guidelines used (*BRCA1* c.4987-3C>G and *BRCA2* c.7868A>G). Other 4 VUS were discordant in reclassification, showing the variability among the guidelines used: *BRCA1* c.301+12A>C (uncertain by ENIGMA and probably benign by ACMG/Sherloc); *BRCA1* c.995G>A (probably benign by ACMG and uncertain by ENIGMA and Sherlock); *BRCA2* c.172G>A and c.3987A>T (benign by ENIGMA and uncertain by ACMG/Sherloc). The other 10 variants remained classified as VUS. The most conflicting criteria during the reassessment process were bioinformatics results regarding splicing pattern and protein structure. The availability of functional studies in the literature also limited the reclassification process. We realized that in Brazil, a middle-income country, the limited capacity to conduct novel functional studies and limited information regarding family and personal histories of cancer and variant segregation could hamper the reclassification process. These difficulties suggest that the developed guidelines are more appropriate for use in scenarios where variant, family and personal information are fully available. The choice of which final classification guideline should be used in case of discordance between their results remains an important issue. Despite that, our results highlight the importance of incorporating VUS reassessment for patients with HBOC, since we were able to reclassify 2

variants and discuss other 4, whose carriers could benefit from specific personal, family and clinical management.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A importância da identificação de variantes nas regiões não codificantes de *BRCA1/2* para o diagnóstico definitivo de HBOC foi bem estabelecida através do presente trabalho. O baixo número de análises moleculares que rastreiam estas regiões gênicas, assim como estudos funcionais que incluem pacientes com fenótipo clínico de HBOC e testes genéticos negativos ou inconclusivos, especialmente no Brasil, visto as altas taxas de miscigenação da população, remetem a necessidade de explorar progressivamente mais estas áreas.

É importante considerar ainda que o sequenciamento completo das regiões não codificantes de *BRCA1/2* representa um custo alto, devido à sua grande extensão. Contudo, deve-se avaliar as opções apresentadas e qual o impacto desta análise para os pacientes, uma vez que estas apresentam um prognóstico desfavorável, idade precoce ao diagnóstico e fenótipo mais agressivo, dispondo de poucas opções de tratamentos convencionais.

Em primeiro momento, a identificação de variantes através de bancos de dados populacionais pode auxiliar também no reconhecimento de regiões *hotspots* e estabelecimento de mutações fundadoras, junto da realização de estudos *in silico* e funcionais para elucidar sua patogenicidade. Com isso, pode-se passar a ponderar sobre uma possível diminuição de custo do sequenciamento, direcionando-o para áreas ou mutações específicas.

Além disso, pôde-se ainda avaliar o processo de reclassificação de VUS em uma série de casos reportados em nossa população, considerando os critérios estabelecidos pelas diretrizes internacionais, informações clínicas e recursos disponíveis. A realização deste tipo de estudo é de extrema importância, considerando as taxas de miscigenação da população brasileira e o número de VUS reportadas.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

Citamos que o presente trabalho propôs também realizar a genotipagem da variante c.-107A>T, localizada na região 5' UTR de *BRCA1*, descrita por Evans e colaboradores em 2018, como sendo a primeira variante germinativa associada com a hipermetilação promotora. As sondas TaqMan para PCR em tempo real já se encontram disponíveis no laboratório e já foram testadas em diferentes protocolos de teste. Esta etapa foi deixada de fora da presente dissertação, devido o estabelecimento de uma parceria recente com o grupo de pesquisa do INCA, coordenado pelo Prof. Dr. Miguel Angelo Martins Moreira. Serão genotipadas, neste estudo multicêntrico, 675 amostras de pacientes com fenótipo clínico de HBOC, mas sem variantes patogênicas detectadas.

Devido a grande quantidade de dados gerados e variantes reportadas, análises futuras devem ser consideradas para tornar este estudo mais robusto e direcionado. Inicialmente, avalia-se a realização de uma revisão de literatura para verificar a presença das variantes de região não codificante de *BRCA1/2* descritas e estudadas em outros países, e comparar com as encontradas no Brasil. As variantes não referenciadas serão estudadas a partir de sua posição genômica, através de bioinformática.

Já a busca por sequências *enhancers* de *BRCA1/2* também deverá ser ampliada para regiões próximas e outras linhagens celulares, visto que estas podem estar localizadas em *upstream*, e variantes intrônicas localizadas em sítios canônicos de processamento devem ser filtradas e excluídas, visto que estas são comumente detectadas por testes de exoma e prontamente classificadas de acordo com sua localização.

As variantes de 3'UTR serão avaliadas e relacionadas com a criação de sítios de ligação de microRNAs, e os 78 microRNAs encontrados na rede de interação com alvos da via de recombinação homóloga serão averiguados quanto tipo de regulação e presença de variantes em seus genes através de revisão de literatura.

A implementação da análise das regiões não codificantes de *BRCA1/2* deve ser considerada após a realização de trabalhos em coortes maiores em diferentes populações, além de significativas etapas de validação. Além disso, estudos de metilação da região promotora através das metodologias de conversão de bissulfito ou captura de regiões metiladas, seguidos de sequenciamento, ou PCR em tempo real ou para verificar a presença de hipermetilação e silenciamento gênico epigenético também podem ser realizados no futuro.

10. ANEXOS E/OU APÊNDICES

10.1 Material suplementar do artigo publicado

Patient ID	Targets tested in the MGPT	BRCA1/2 VUS in MGPT	Other variants in MGPT
1	APC, ATM, BARD1, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK4, CDKN2A, CHEK2, EGFR, EPCAM, FANCC, MEN1, MET, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, NF2, PALB2, PIK3CA, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, RAD51C, RAD51D, RB1, RECQL, RET, STK11, TP53, WT1	BRCA1 c.60A>C; p.(Lys20Asn)	ATM c.3256C>T; p.(Arg1086Cys) RAD51C c.571+4A>G
2	APC, ATM, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK4, CDKN2A, CHEK2 (c.1100delC only), EPCAM, MEN1, MET, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PALLD, PMS2, PTCH1, PTEN, RAD51C, RET, SMAD4, STK11, TP53, VHL	BRCA1 c.301+12A>C	no
3	ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, , NBN, NF1, PALB2, PTEN, RAD50, STK11, TP53	BRCA1 c.995G>A; p.(Arg332Gln)	no
4	ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, EPCAM, FANCC, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, NBN, NF1, PALB2, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51C, STK11, TP53	BRCA1 c.4987-3C>G	ATM c.5375T>C; p.(Ile1792Thr)
5	APC, ATM, BARD1, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK4, CDKN2A, CHEK2, EGFR, EPCAM, FANCC, MEN1, MET, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, NF2, PALB2, PIK3CA, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, RAD51C, RAD51D, RB1, RECQL, RET, STK11, TP53, WT1	BRCA2 c.172G>A; p.(Glu58Lys)	BRCA2 c.8067T>A; p.(Cys2689*)
6	APC, ATM, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK4, CDKN2A, CHEK2 (c.1100delC only), EPCAM, MEN1, MET, MLH1, MSH2, MSH6, MUTHY, NBN, PALB2, PALLD, PMS2, PTCH1, PTEN, RAD51C, RET, SMAD4, STK11, TP53, VHL	BRCA2 c.710A>G; p.(Asp237Gly)	MSH6 c.263G>A; p.(Cys88Tyr) MUTYH c.536A>G; p.(Tyr179Cys)
7	ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CHEK2, , DICER1, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, NBN, NF1, PALB2, PMS2, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, SMARCA4, STK11, TP53	BRCA2 c.1244A>G; p.(His415Arg)	no
8	ALK, APC, ATM, AXIN2, BAP1, BARD1, BLM, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CASR, CDC73, CDH1, CDK4, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A (p14ARF and p16INK4a), CEBPA, CHEK2, DICER1, DIS3L2, EGFR (2369C>T only), EPCAM (dep/dup only), FH, FLCN, GATA2, GPC3, GREM1 (Promoter region del/dup only), HOXB13 (c.251G>A only),	BRCA2 c.3987A>T; p.(Arg1329Ser)	BRCA2 c.5794_5800delinsT; p.(His1932*)

Patient ID	Targets tested in the MGPT	BRCA1/2 VUS in MGPT	Other variants in MGPT
	<i>HRAS, KIT, MAX, MEN1, MET, MITF (c.952G>A), MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, NF2, PALB2, PDGFRA, PHOX2B, PMS2, POLD1, POLE, POT1, PRKAR1A, PTCH1, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, RB1, RECQL4, RET, RUNX1, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, STK11, SUFU, TERC, TERT, TMEM127, TP53, TSC1, TSC2, VHL, WRN, WT1</i>		
9	<i>AKT1, ATM, BARD1, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDC73, CDH1, CHEK2, DICER1, EPCAM (del/dup only), FAM175A, FANCC, MLH1, MRE11A, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, PALB2, PIK3CA, PMS2, POLD1, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, RINT1, SDHB, SDHD, SMARCA4, STK11, TP53, XRCC2</i>	<i>BRCA2</i> c.4477G>C; p.(Glu1493Gln)	no
10	<i>APC, ATM, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK4, CDKN2A, CHEK2 (c.1100delC only), EPCAM, MEN1, MET, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, PALB2, PALLD, PMS2, PTCH1, PTEN, RAD51C, RET, SMAD4, STK11, TP53, VHL</i>	<i>BRCA2</i> c.4627A>G; p.(Lys1543Glu)	no
11	<i>ALK, APC, ATM, AXIN2, BAP1, BARD1, BLM, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CASR, CDC73, CDH1, CDK4, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A (p14ARF and p16INK4a) CEBPA, CHEK2, DICER, DIS3L2, EGFR (2369C>T only), EPCAM (del/dup only), FH, FLCN, GATA2, GPC3, GREM1 (Promoter region (del/ dup only), HOXB13 (c.251G>A only), HRAS, KIT, MAX, MEN1, MET, MITF (c.952G>A), MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, NF2, PALB2, PDGFRA, PHOX2B, PMS2, POLD1, POLE, POT1, PRKAR1A, PTCH1, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, RB1, RECQL4, RET, RUNX1, SDHA, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, STK11, SUFU, TERC, TERT, TMEM127, TP53, TSC1, TSC2, VHL, WRN, WT1</i>	<i>BRCA2</i> c.6095C>T; p.(Ala2032Val)	<i>ALK</i> c.1652G>A; p.(Arg551Gln) <i>DICER1</i> c.2201C>G; p.(Thr734Ser) <i>SUFU</i> c.777C>G; p.(Ile259Met)
12	<i>AKT1, ATM, APC, BAP1, BARD1, BLM, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK4, CDKN2A, CHEK2, EGFR, EPCAM, FANCC, MEN1, MET, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, NF2, NTRK1, PALB2, PIK3CA, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, RB1, RECQL, RET, SDHB, STK11, TP53, XRCC2, WT1</i>	<i>BRCA2</i> c.6095C>T; p.(Ala2032Val)	<i>ATM</i> c.3256C>T; p.(Arg1086Cys)
13	<i>BRCA1, BRCA2, EPCAM, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, PTEN, TP53</i>	<i>BRCA2</i> c.6271A>G; p.(Ser2091Gly)	no

Patient ID	Targets tested in the MGPT	BRCA1/2 VUS in MGPT	Other variants in MGPT
14	ALK, APC, ATM, AXIN2, BAP1, BARD1, BLM, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CASR, CDC73, CDH1, CDK4, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A (p14ARF and p16INK4a only), CEBPA, CHEK2, DICER1, DIS3L2, EGFR (2369C>T only), EPCAM (del/dup only) FH, FLCN, GATA2, GPC3, GREM1 (Promoter region del/dup only), HOXB13 (c.251G>A only), HRAS, KIT, MAX, MEN1, MET, MITF (c.952G>A), MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, NF2, PALB2, PDGFRA, PHOX2B, PMS2, POLD1, POLE, POT1, PRKAR1A, PTCH1, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, RB1, RECQL4, RET, RUNX1, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, STK11, SUFU, TERC, TERT, TMEM127, TP53, TSC1, TSC2, VHL, WRN, WT1	BRCA2 c.7868A>G; p.(His2623Arg)	APC c.7490C>T; p.(Ser2497Leu) NF1 c.3436G>A; p.(Val1146Ile) SDHD c.53C>T; p.(Ala18Val)
15	ALK, APC, ATM, AXIN2, BAP1, BARD1, BLM, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CASR, CDC73, CDH1, CDK4, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CEBPA, CHEK2, DICER1, DIS3L2, EGFR (2369C>T only), EPCAM (del/dup only), FH, FLCN, GATA2, GPC3, GREM1 (Promoter region del/dup only), HOXB13 (c.251G>A only), HRAS, KIT, MAX, MEN1, MET, MITF (c.952G>A), MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, NF2, PALB2, PDGFRA, PHOX2B, PMS2, POLD1, POLE, POT1, PRKAR1A, PTCH1, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, RB1, RECQL4, RET, RUNX1, SDHA, SDHAF2, SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, SMARCA4, SMARCB1, SMARCE1, STK11, SUFU, TERC, TERT, TMEM127, TP53, TSC1, TSC2, VHL, WRN, WT1	BRCA2 c.9101A>G; p.(Gln3034Arg)	no
16	APC, ATM, AXIN2, BARD1, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDKN2A, CHEK2, DICER1, EPCAM (del/dup only)GREM1 (Promoter region del/dup only), KIT, MEN1, MLH1, MSH2, MSH6, MUTYH, NBN, NF1, PALB2, PDGFRA, PMS2, POLD1, POLE, PTEN, RAD50, RAD51C, RAD51D, SDHA (sequences change only) SDHB, SDHC, SDHD, SMAD4, SMARCA4, STK11, TP53, TSC1, TSC2, VHL	BRCA2 c.10250A>G; p.(Tyr3417Cys)	- ATM c.7696G>A; p.(Ala2566Thr)

Transcripts used for variants annotation: ALK = NM_004304.4; APC = NM_00038.5; BRCA1 = NM_007294.3; BRCA2 = NM_00059.3; DICER1 = NM_177438.2; MSH6 = NM_000179.2; NF1 = NM_000267.3; RAD51C = NM_058216.2; SDHD = NM_003002.4

Supplementary Table 1. Targets and results of multi-gene panel testing for the *BRCA1/2* VUS carriers included in this study.

Variant	Allele count in population databases					Missense <i>in-silico</i> predictors**				Splicing <i>in-silico</i> predictors			
	FLOSSIES	gnomAD (non-cancer)*	ExAC	AbraOM	TOPMED	SIFT	Poly Phen2	Mutation Taster	Align GVGD	SSF	MaxEnt	NNSPLICE	GeneSplicer
<i>BRCA1</i> (c.60A>C)	No	1/236560	No	No	1/125568	D	PD	DC	C0	NA	NA	NA	NA
<i>BRCA1</i> (c.301+12A>C)	No	1/251156	No	No	1/125568	NA	NA	P	NA	No alterations	Minor alteration of the WT acceptor site	No alterations	Minor alteration of the WT acceptor site
<i>BRCA1</i> (c.995G>A)	No	8/236842	3/121404	No	1/125568	T	B	P	C0	NA	NA	NA	NA
<i>BRCA1</i> (c.4987-3C>G)	No	No	No	No	No	NA	NA	P	NA	Decrease of the WT acceptor site	Decrease of the WT acceptor site	Loss of the WT acceptor site	Loss of the WT acceptor site
<i>BRCA2</i> (c.172G>A)	No	6/236822	3/121184	No	6/125568	D	PD	P	C0	NA	NA	NA	NA
<i>BRCA2</i> (c.710A>G)	No	No	No	No	No	T	B	P	C0	NA	NA	NA	NA
<i>BRCA2</i> (c.1244A>G)	No	5/266308	No	1/1218	4/125568	T	PsD	P	C0	NA	NA	NA	NA
<i>BRCA2</i> (c.3987A>T)	No	1/212912	No	No	No	T	B	P	C0	NA	NA	NA	NA
<i>BRCA2</i> (c.4477G>C)	No	No	No	No	No	D	PD	P	C0	NA	NA	NA	NA
<i>BRCA2</i> (c.4627A>G)	No	No	No	No	No	T	PD	P	C0	NA	NA	NA	NA
<i>BRCA2</i> (c.6095C>T)	No	1/236500	No	1/1218	No	T	B	P	C0	NA	NA	NA	NA
<i>BRCA2</i> (c.6271A>G)	No	No	No	No	No	T	B	P	C0	NA	NA	NA	NA
<i>BRCA2</i> (c.7868A>G)	No	No	No	No	No	D	PD	DC	C25	NA	NA	NA	NA
<i>BRCA2</i> (c.9101A>G)	No	3/235062	2/11668	No	6/125568	T	B	P	C0	NA	NA	NA	NA
<i>BRCA2</i> (c.10250A>G)	No	-	No	No	No	D	B	P	C0	NA	NA	NA	NA

* Non-cancer dataset;

**NA = Not Applicable; D = Damaging; T = Tolerated; Probably Damaging; PsD = Possibly Damaging; B = Benign; WT = Wild Type; DC = Disease causing; P = Polymorphism

*** Functional Studies

Supplementary Table 2. Allele count in population databases and *in-silico* tools used for variant classification.

Variant	VarSome classification*	Our classification*
<i>BRCA1</i> (c.60A>C)	LB	VUS
<i>BRCA1</i> (c.301+12A>C)	LB	LB
<i>BRCA1</i> (c.995G>A)	VUS	LB
<i>BRCA1</i> (c.4987-3C>G)	LP	LP
<i>BRCA2</i> (c.172G>A)	VUS	VUS
<i>BRCA2</i> (c.710A>G)	VUS	VUS
<i>BRCA2</i> (c.1244A>G)	VUS	VUS
<i>BRCA2</i> (c.3987A>T)	VUS	VUS
<i>BRCA2</i> (c.4477G>C)	VUS	VUS
<i>BRCA2</i> (c.4627A>G)	VUS	VUS
<i>BRCA2</i> (c.6095C>T)	LB	VUS
<i>BRCA2</i> (c.6271A>G)	VUS	VUS
<i>BRCA2</i> (c.7868A>G)	P	LP
<i>BRCA2</i> (c.9101A>G)	VUS	VUS
<i>BRCA2</i> (c.10250A>G)	VUS	VUS

* VUS, variant of uncertain significance; LP, likely pathogenic; LB, likely benign; P, pathogenic; B, benign.

Supplementary Table 3. Raw data comparison of two variant classification independent analyses based on ACMG guidelines (VarSome and ours).