

ȘCOALA DOCTORALĂ

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Factori de risc genetici și obstetricali implicați în apariția cancerului mamar

Doctorand **Iulian Gabriel Goidescu**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Florin Stamatian**

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Factori de risc genetici	19
1.1. Mutațiile genei BRCA	21
1.1.1. BRCA1	22
1.1.1.1. Genetică	22
1.1.1.2. Riscul de cancer mamar și ovarian	23
1.1.1.3. Histologie	23
1.1.1.4. Asocierea cu alte neoplazii	23
1.1.2. BRCA2	24
1.1.2.1. Genetică	24
1.1.2.2. Riscul de cancer mamar și ovarian	24
1.1.2.3. Histologie	24
1.1.2.4. Asocierea cu alte neoplazii	25
1.1.3. Recomandări de testare BRCA1/BRCA2	25
1.1.4. Beneficiile testării genetice BRCA1/BRCA2	25
1.2. Mutațiile genei TP53	26
1.2.1. Genetică	26
1.2.2. Riscul de cancer mamar și ovarian	26
1.2.3. Histologie	27
1.2.4. Asocierea cu alte neoplazii	27
1.2.5. Recomandări de testare genetică	27
1.2.6. Beneficiile testării genetice	28
1.3. Mutațiile genei PTEN	28
1.3.1. Genetică	28
1.3.2. Riscul de cancer mamar și ovarian	29
1.3.3. Histologie	29
1.3.4. Asocierea cu alte neoplazii	29
1.3.5. Recomandări de testare genetică	29
1.3.6. Beneficiile testării genetice	30
1.4. Mutațiile genei CDH1	30
1.4.1. Genetică	30
1.4.2. Riscul de cancer mamar și ovarian	31
1.4.3. Histologie	31
1.4.4. Asocierea cu alte neoplazii	31
1.4.5. Recomandări de testare genetică	31
1.4.6. Beneficiile testării genetice	32
1.5. Mutațiile genei STK 11	32
1.5.1. Genetică	32
1.5.2. Riscul de cancer mamar și ovarian	32
1.5.3. Histologie	33
1.5.4. Asocierea cu alte neoplazii	33
1.5.5. Recomandări de testare genetică	33

1.5.6. Beneficiile testării genetice	33
1.6. Mutațiile genei PALB2	33
1.6.1. Genetică	33
1.6.2. Riscul de cancer mamar și ovarian	34
1.6.3. Histologie	35
1.6.4. Asocierea cu alte neoplazii	35
1.6.5. Recomandări de testare genetică	35
1.6.6. Beneficiile testării genetice	35
1.7. Mutațiile genei CHEK2	36
1.7.1. Genetică	36
1.7.2. Riscul de cancer mamar și ovarian	36
1.7.3. Histologie	36
1.7.4. Asocierea cu alte neoplazii	37
1.7.5. Recomandări de testare genetică	37
1.7.6. Beneficiile testării genetice	37
1.8. Mutațiile genei ATM	37
1.8.1. Genetică	37
1.8.2. Riscul de cancer mamar și ovarian	38
1.8.3. Histologie	38
1.8.4. Asocierea cu alte neoplazii	38
1.8.5. Recomandări de testare genetică	38
1.8.6. Beneficiile testării genetice	38
2. Factori obstetricali (reproductivi)	39
2.1. Menstruația	39
2.2. Paritatea	40
2.3. Intervalul dintre menarhă – prima sarcină	40
2.4. Vârsta maternă la prima sarcină	41
2.5. Alăptarea	41
2.6. Avorturile	42
2.7. Tehnicile de reproducere asistată	43
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	47
2. Metodologie generală	51
2.1. Lotul pacienților	51
2.2. Recoltarea probelor și analiza genetică	54
2.3. Analiza histologică și imunohistochimică	56
3. Studiul 1 - Beneficiile utilizării panelurilor extinse de testare genetică în cancerul mamar	61
3.1. Introducere	61
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	62
3.3. Material și metodă	63
3.4. Rezultate	64
3.5. Discuții	67
3.6. Concluzii	69
4. Studiul 2 - Prevalența mutațiilor patogene în rândul pacientelor cu cancer mamar din România testate printr-un panel multigenic	71
4.1. Introducere	71

4.2. Ipoteza de lucru/obiective	72
4.3. Material și metodă	72
4.3.1. Pacienți	72
4.3.2. Testare genetică	72
4.4. Rezultate	72
4.5. Discuții	77
4.6. Concluzii	81
5. Studiul 3 - Corelarea factorilor genetici cu tabloul histologic și imunohistochimic la pacientele diagnosticate cu carcinom mamar	83
5.1. Introducere	84
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	84
5.3. Material și metodă	84
5.3.1. Pacienți	84
5.3.2. Histologie și imunohistochimie	85
5.3.2. Testare genetică	85
5.3.4. Analiza statistică	86
5.4. Rezultate	86
5.5. Discuții	93
5.6. Concluzii	96
6. Studiul 4 - Influența factorilor reproductivi asupra riscului de cancer mamar la femeile cu mutații patogene	99
6.1. Introducere	99
6.2. Ipoteza de lucru/obiective	99
6.3. Material și metodă	100
6.3.2. Pacienți	100
6.3.2. Testare genetică	100
6.3.4. Analiza statistică	100
6.4. Rezultate	101
6.5. Discuții	103
6.6. Concluzii	106
7. Studiul 5 - Asocierea variantei patogene c.4035delA a genei BRCA1 cu supraexpresia HER2	109
7.1. Introducere	109
7.2. Prezentarea cazurilor	110
7.2.1. Cazul 1	110
7.2.2. Cazul 2	111
7.3. Concluzii	113
8. Discuții generale	115
9. Concluzii generale	119
10. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	121
REFERINȚE	123
ANEXE	141

INTRODUCERE

Cancerul mamar este cea mai frecventă malignitate diagnosticată la femei și a doua cauză de mortalitate prin boală neoplazică, fiind cunoscut faptul că în zilele noastre 1 din 8 femei va fi diagnosticată cu această maladie.

Incidența cancerului mamar în România în 2012 era de 25,22/100.000, cu o mortalitate de 16,74/100.000 și o creștere estimată a prevalenței la 5 ani de până la aproximativ 35%.

În ultimii ani am fost martorii unui progres accelerat atât în înțelegerea cât și în diagnosticarea și tratamentul pacienților cu cancer mamar ereditar, studiile demonstrând importanța și utilitatea testărilor genetice.

Screeningul genetic pentru anumite tipuri de cancere ereditare familiale a început să fie folosit pe scară tot mai largă la nivel mondial, mai ales după introducerea Next Generation Sequencing (NGS). Acest lucru a devenit posibil mai ales în urma procesului din 2013, când Myriad Genetics, a pierdut dreptul de patent asupra BRCA1/2, Curtea Supremă din SUA hotărând că ADN-ul și genele nu pot fi patentate.

Dezvoltarea accelerată a panelurilor multigenice de testare a cancerelor ereditare a avut un impact pozitiv asupra diagnosticului și screeningului acestor pacienți. Hotărârea de testare multigenică, mai ales în cazul cancerului mamar ar trebui să nu difere de cea pentru testarea unei singure gene, mai ales că din punct de vedere al eficienței și al costurilor, aceasta este mai adecvată.

Scopul acestor testări genetice este de a crea oportunitatea unui tratament individualizat și multidisciplinar fiecărui pacient în funcție de mutația pe care o are, dar și de a putea sfătui rudele acestor pacienți cu privire la riscul de a dezvolta cancer mamar sau o altă formă de cancer la care ar putea fi susceptibili.

Tot mai multe gene sunt incriminate în apariția cancerului mamar, însă nu toate mutațiile ce apar pe aceste gene sunt patologice (Deleterious mutation), unele fiind "benigne" (Benign polymorphism), iar altele fiind cu semnificație necunoscută (Variant of unknown significance -VUS).

Deși determinismul genetic al cancerului mamar reprezintă nucleul central al cercetărilor actuale, tot mai multe studii întăresc legătura dintre factorii obstetricali și reproductivi și riscul de apariție al cancerului mamar. Se pare că acești factori reproductivi și hormonalți pot influența riscul, dar și vârsta de apariție a cancerului mamar la pacientele cu mutații patogene.

Sunt puține studii în literatură însă care au examinat asocierile dintre factorii reproductivi și riscul de cancer mamar la purtătorii de mutații patogene în genele cu risc crescut datele fiind limitate mai ales la genele BRCA1/2.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Studiul I. Beneficiile utilizării panelurilor extinse de testare genetică în cancerul mamar

Obiective: Analiza genetică a pacientelor cu cancer mamar printr-un panel multigenic, respectiv prin panel pentru BRCA1/BRCA2. Analiza beneficiilor testării prin panel multigenic a pacientele cu testare negativă prin panelul BRCA1/BRCA2.

Material și metodă: Studiu retrospectiv, descriptiv pe 80 de paciente diagnosticate cu cancer mamar în perioada ianuarie 2015 – decembrie 2016, testate genetic prin panel pentru BRCA1/BRCA2 sau panel multigenic conform criteriilor NCCN 2016.

Rezultate: Din cele 80 de paciente diagnosticate cu carcinom mamar și testate prin cele 2 paneluri, 30 au prezentat mutații cu penetranță mare și medie, 13 au prezentat mutații rare cu risc intermediar de

cancer mamar și 37 au fost negative. Din cele 14 paciente cu testare negativă la panelul BRCA, 6 au fost retestate folosind panelul multigenic, fiind detectate 2 mutații patogene (CHEK2, PALB2) și 1 cu mutații tip VUS pe gena STK11.

Concluzii: Rezultatele testării au influențat conduita terapeutică a tuturor pacientelor cu mutații cu penetranță crescută care au beneficiat de tratament sistemic neoadjuvant urmat de intervenții chirurgicale radicale și mastectomie profilactică și/sau anexectomie bilaterală profilactică. Excepție de la această conduită a făcut pacienta cu mutație TP53, care datorită riscului de neoplazii secundare dat de tratamentul neoadjuvant (chimio-radioterapie) a fost supusă tratamentului chirurgical primar. Retestarea genetică prin panelul extins a dus la diagnosticarea a 3 mutații (2 patogene și 1 tip VUS), care ar fi putut scăpa diagnosticului și implicit unui tratament și a unui sfat genetic adecvat.

Studiul II. Prevalența mutațiilor patogene în rândul pacientelor cu cancer mamar din România testate printr-un panel multigenic

Obiectiv: Raportarea experienței noastre din primii 130 de pacienți consecutivi diagnosticați cu cancer mamar, care s-au adresat serviciului nostru pentru testare genetică prin panel multigenic, furnizând date cu privire la frecvența de variante genetice patogene sau a unor mutații cu semnificație încă necunoscută.

Material și metodă: Studiu retrospectiv, descriptiv pe 130 de paciente diagnosticate cu cancer mamar în perioada ianuarie 2015 – iunie 2017, testate genetic prin panel pentru BRCA1/BRCA2 sau panel multigenic conform criteriilor NCCN 2016.

Rezultate: Pe parcursul perioadei analizate, 130 de paciente cu cancer de mamar au fost eligibile pentru testare genetică și 82 au fost incluse în studiu. La cele 82 de paciente am identificat 93 de mutații din panelul testat (56 patogene și 37 VUS). Cea mai frecventă mutație BRCA1 a fost c.3607C>T (28%), urmată de c.5266dupC (16%) și c.4035delA (16%), c.181T>G (8%). În ceea ce privește mutațiile BRCA2 variantele c.9371A>T și c.8755-1G>A au fost întâlnite în 27,27 % din cazuri fiecare. 3 mutații tip VUS au fost identificate în gena BRCA2 (27,27%). Mutațiile pe gene adiționale au fost predominant mutații tip VUS doar în 5 cazuri fiind patogene. Majoritatea variantelor VUS au fost de la paciente cu mutații rare, în timp ce în grupul cu mutații BRCA 1 nu am identificat variante VUS.

Concluzii: Studiul nostru a identificat cu succes 2 mutații în gena BRCA1, care sunt mai puțin frecvente la populația din România, c.3607C> T și c.4035delA. Mai mult, cele două variante patogene au fost asociate cu diferite fenotipuri histologice și moleculare. Varianta c.3607C> T a fost asociată cu cancer mamar triplu negativ (ER, PR și HER2 negativ), respectând fenotipul general al pacienților cu mutații BRCA1, în timp ce varianta c.4035delA a fost asociată cu HER 2 pozitiv un element atipic pentru pacienții cu mutații ale genei BRCA1. Pentru restul genelor, informațiile ar putea fi utile pentru identificarea unor mutații specifice populației din România și, prin urmare la un diagnostic ținut, lucru care ar permite scăderea costurilor și a timpului de obținere a rezultatelor.

Studiul III. Corelarea factorilor genetici cu tabloul histologic și imunohistochimic la pacientele diagnosticate cu carcinom mamar

Obiective: Obiectivul principal al acestui studiu este de a aprecia asocierea unor mutații patogene responsabile de apariția cancerului mamar (BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN, STK 11, CDH1, PALB2, ATM,

CHEK2) cu anumiți factori de prognostic histopatologici și imunohistochimici. Obiectivul secundar a fost de a evalua prevalența unor variante patogene în genele BRCA1 și BRCA2 pentru a determina dacă aceste variante sunt similare cu cele din țările învecinate României (regiunea est europeană) și corelarea acestor variante cu caracteristicile imunohistochimice ale tumorii.

Material și metodă: Studiu retrospectiv, descriptiv pe 80 de paciente diagnosticate cu cancer mamar în perioada ianuarie 2015 – decembrie 2016, testate genetic prin panel multigenic conform criteriilor NCCN 2016. Toate pacientele au avut confirmare histopatologică a diagnosticului, cu imunohistochimie aferentă efectuată prin biopsie mamară cu Tru-Cut.

Rezultate: Pacienții cu cancer mamar și mutație patogenă au fost diagnosticați mai frecvent cu tumori slab diferențiate (G3) ($p=0,0050$), comparativ cu cei fără mutații care au asociat frecvent forme bine diferențiate de cancer de sân (G1) ($P=0,0120$). Carcinomul mamar bilateral a fost observat în două cazuri, ambele la paciente cu mutații CHEK2 patogene ($p=0,0183$). Diferențe semnificative au fost identificate atunci când am comparat grupul cu mutații BRCA1 cu subiecții fără mutații din punct de vedere al factorilor imunohistochimici - ER (%), PR (%) și Ki67 (%). Nu s-au observat alte diferențe semnificative la compararea celorlalte grupe de mutații cu subiecți fără mutații ($p>0,12$). Varianta BRCA1 c.3607C>T a fost diagnosticată la șapte paciente din studiul nostru, urmată de mutațiile c.5266dupC (4 cazuri) și c.181T>G (2 cazuri). Varianta BRCA1 c.3607C>T a fost cea mai frecventă în grupul studiat și în șase din aceste cazuri a fost asociată cu cancer mamar TNBC ($p<0,0001$).

Concluzii: Studiul nostru a confirmat faptul că pacientele cu mutații genetice și cancer mamar au de obicei forme mai agresive și nediferențiate (G3), această particularitate fiind cel mai frecventă la mutațiile BRCA1 și PALB2. Mutațiile BRCA1 au respectat profilul imunohistochimic, majoritatea fiind triplu negative, pe când doar un sfert din pacientele cu cancer mamar și fără mutație au prezentat acest subtip molecular. Studiul nostru a relevat o nouă mutație BRCA1 care până acum nu a fost raportată în populația din România, BRCA1 c.3607C>T, singurele studii efectuate până în prezent în această populație, argumentând că c.5266dupC este cea mai comună variantă din această regiune. Varianta BRCA1 c.3607C>T se asociază cu forme TNBC, acest lucru fiind în concordanță cu profilul imunohistochimic general al pacienților cu cancer mamar și mutații BRCA1 pozitive. În ceea ce privește mutațiile BRCA2, ambele variante c.8755-1G>A și c.9371A>T nu au fost niciodată descrise la populația din România, iar datele din țările est-europene pentru aceste două mutații sunt limitate.

Studiul IV. Influența factorilor reproductivi asupra riscului de cancer mamar la femeile cu mutații patogene

Obiectiv: Studiul de față își propune să analizeze influența factorilor reproductivi în apariția cancerului mamar la pacientele cu mutații patogene versus paciente fără mutații. Ca și obiectiv secundar ne-am propus să analizăm influența factorilor reproductivi în apariția cancerului mamar pe un sublot de paciente cu mutații BRCA1 patogene, comparativ cu pacientele fără mutații.

Material și metodă: Studiu retrospectiv, descriptiv pe 130 de paciente diagnosticate cu cancer mamar în perioada ianuarie 2015 – iunie 2017, testate genetic prin panel pentru BRCA1/BRCA2 sau panel multigenic conform criteriilor NCCN 2016. Au fost notate caracteristicile reproductive ale tuturor pacientelor, după cum urmează: vârsta menarhăi (≤ 12 , 13-14, ≥ 15 ani), vârsta pacientei la prim sarcină la termen (< 25 , 25-29, 30-34, ≥ 35 ani), numărul de sarcini (1, 2, 3, 4, etc.), numărul nașterilor (1, 2, 3, 4, etc.), intervalul de alăptare (≤ 3 , 4-6, 7-11, ≥ 12 luni), numărul avorturilor (1, 2, 3, 4, etc.), statusul menopauzal în momentul diagnosticului (Da, Nu).

Rezultate: Comparația în ceea ce privește caracteristicile reproductive în rândul subiecților cu cancer mamar cu mutații și fără mutații a arătat că alăptarea este factor protectiv semnificativ statistic doar în rândul pacienților cu cancer mamar și fără mutație ($p < 0.05$). Nu s-au identificat alte asocieri semnificative sau diferențe semnificative între cele 2 grupuri. Nu a fost identificată nicio asociere semnificativă între consumul de contraceptive orale combinate și pacientele cu mutație prezentă ($p = 0,4142$). Nu s-au observat asocieri sau diferențe semnificative în ceea ce privește caracteristicile reproductive atunci când subiecții cu BRCA1 au fost comparați cu cei fără mutație și nici în ceea ce privește consumul de contraceptive orale.

Concluzii: Factorii de mediu și reproductivi pot influența atât riscul cât și vârsta de apariție a cancerului mamar la pacientele purtătoare de mutații patogene. Studiul nostru a demonstrat că alăptarea are efect protectiv împotriva apariției cancerului mamar doar la pacientele fără mutații. Riscul de cancer mamar nu este influențat la purtătoarele de mutații patogene sau în gena BRCA1 de numărul de avorturi, de paritate, de vârsta la care survine prima sarcină, de vârsta la care survine menarha și menopauza și nici de consumul de contraceptive orale.

Studiul V. Asocierea variantei patogene c.4035delA a genei BRCA1 cu supraexpresia HER2

Obiectiv: Raportarea a 3 cazuri de cancer mamar asociate cu mutația BRCA1 c.4035delA care au avut prezentă supraexpresia HER2.

Prezentarea cazurilor: Descrierea a 3 cazuri din care 2 paciente mamă-fiică care au fost diagnosticate cu cancer mamar și mutație BRCA1 c.4035delA prezentă.

Concluzii: Particularitatea acestor cazuri rezidă din asocierea mutației patogene a genei BRCA1 - c.4035 delA (p.Glu1346Lysfs*20) cu supraexpresia HER2 și cu un nivel crescut al receptorilor estrogenici. Este cunoscut că mutațiile genei BRCA1 se asociază frecvent cu forme triplu negative de carcinom mamar și excepțional de rar cu forme HER2 pozitive.

ORIGINALITATEA SI CONTRIBUTIILE INOVATIVE

Cercetarea de față este prima evaluare a mutațiilor patogene implicate în apariția cancerului mamar la populația din România. Chiar dacă studiile concentrate asupra mutațiilor genelor BRCA au început cu mai mulți ani în urmă, importanța celorlalte gene cu penetranță crescută și medie, a început să crească numai în ultimii 3-4 ani, cu ocazia introducerii pe scară largă a tehnologiei NGS.

Cercetarea noastră a identificat cu succes o nouă mutație patogenă a genei BRCA1 care nu a mai fost descrisă până acum la populația din România și anume varianta BRCA1 c.3607C> T. Această mutație a fost cea mai frecventă variantă BRCA 1 diagnosticată în studiul nostru și s-a asociat cu forme triplu negative de carcinom mamar în 6 din cele 7 cazuri identificate, respectând profilul molecular al clasei.

Variantele c.4035delA și c.5266dupC ale genei BRCA 1, au ocupat a 2-a poziție, fiind diagnosticate în câte 4 cazuri fiecare. Interesant este profilul molecular al variantei c.4035delA, care s-a asociat în 3 cazuri cu supraexpresia HER2, un element atipic pentru mutațiile BRCA1, cel de-al 4-lea caz fiind cel al unei purtătoare a mutației, fără cancer mamar însă.

Cercetarea noastră a adus informații noi și despre prevalența mutațiilor patogene și tip VUS implicate în apariția cancerului mamar cu determinism genetic la populația din România, fiind printre primele studii care au analizat această problemă.

În ceea ce privește factorii reproductivi și obstetricali implicați în apariția cancerului mamar, se pare că aceștia nu influențează riscul și nici momentul de apariție al cancerului mamar la pacientele cu risc genetic.

Alăptarea este singurul factor reproductiv care și-a demonstrat semnificativ efectul protector, însă numai în cazul pacientelor fără mutații patogene.

Restul factorilor reproductivi considerați a crește riscul de cancer mamar precum menarha precoce, menopauza tardivă, nuliparitatea, avorturile și intervalul lung dintre menarhă și prima naștere se pare că nu influențează semnificativ acest risc la pacientele cu mutații patogene.

Administrarea de contraceptive orale combinate la aceste paciente cu mutații patogene, nu influențează de asemenea riscul și nici vârsta de apariție a cancerului mamar.

ȘCOALA DOCTORALĂ

ABSTRACT OF DOCTORAL THESIS

Genetic and reproductive risk factors involved in breast cancer occurrence

PhD candidate **Iulian Gabriel Goidescu**

Con PhD coordinator **Prof. dr. Florin Stamatian**

Cluj-Napoca 2017

Table of contents

INTRODUCTION	15
CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE	
1. Genetic risk factors	19
1.1. BRCA gene mutations	21
1.1.1. BRCA1	22
1.1.1.1. Genetics	22
1.1.1.2. Breast and ovarian cancer risk	23
1.1.1.3. Histology	23
1.1.1.4. The risk for other neoplasms	23
1.1.2. BRCA2	24
1.1.2.1. Genetics	24
1.1.2.2. Breast and ovarian cancer risk	24
1.1.2.3. Histology	24
1.1.2.4. The risk for other neoplasms	25
1.1.3. Genetic testing recommendations for BRCA1/BRCA2	25
1.1.4. The benefits of BRCA1/BRCA2 genetic testing	25
1.2. TP53 gene mutations	26
1.2.1. Genetics	26
1.2.2. Breast and ovarian cancer risk	26
1.2.3. Histology	27
1.2.4. The risk for other neoplasms	27
1.2.5. Genetic testing recommendations	27
1.2.6. The benefits of genetic testing	28
1.3. PTEN gene mutations	28
1.3.1. Genetics	28
1.3.2. Breast and ovarian cancer risk	29
1.3.3. Histology	29
1.3.4. The risk for other neoplasms	29
1.3.5. Genetic testing recommendations	29
1.3.6. The benefits of genetic testing	30
1.4. CDH1 gene mutations	30
1.4.1. Genetics	30
1.4.2. Breast and ovarian cancer risk	31
1.4.3. Histology	31
1.4.4. The risk for other neoplasms	31
1.4.5. Genetic testing recommendations	31
1.4.6. The benefits of genetic testing	32
1.5. STK 11 gene mutations	32
1.5.1. Genetics	32
1.5.2. Breast and ovarian cancer risk	32
1.5.3. Histology	33
1.5.4. The risk for other neoplasms	33
1.5.5. Genetic testing recommendations	33

1.5.6. The benefits of genetic testing	33
1.6. PALB2 gene mutations	33
1.6.1. Genetics	33
1.6.2. Breast and ovarian cancer risk	34
1.6.3. Histology	35
1.6.4. The risk for other neoplasms	35
1.6.5. Genetic testing recommendations	35
1.6.6. The benefits of genetic testing	35
1.7. CHEK2 gene mutations	36
1.7.1. Genetics	36
1.7.2. Breast and ovarian cancer risk	36
1.7.3. Histology	36
1.7.4. The risk for other neoplasms	37
1.7.5. Genetic testing recommendations	37
1.7.6. The benefits of genetic testing	37
1.8. ATM gene mutations	37
1.8.1. Genetics	37
1.8.2. Breast and ovarian cancer risk	38
1.8.3. Histology	38
1.8.4. The risk for other neoplasms	38
1.8.5. Genetic testing recommendations	38
1.8.6. The benefits of genetic testing	38
2. Reproductive risk factors	39
2.1. Menstruation	39
2.2. Parity	40
2.3. The interval between menarche and the first pregnancy	40
2.4. Maternal age at first pregnancy	41
2.5. Breastfeeding	41
2.6. Abortions	42
2.7. Assisted reproduction techniques	43
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Work hypothesis and objectives	47
2. General methodology	51
2.1. Patients	51
2.2. Sample collection and genetic analysis	54
2.3. Histological and immunohistochemical analysis	56
3. 1st Study - Benefits of multigene panel testing in breast cancer	61
3.1. Introduction	61
3.2. Working hypothesis / objectives	62
3.3. Material and method	63
3.4. Results	64
3.5. Discussion	67
3.6. Conclusions	69
4. 2nd Study - Prevalence of deleterious mutations among patients with breast cancer referred for multigene panel testing in a Romanian population	71

4.1. Introduction	71
4.2. Working hypothesis / objectives	72
4.3. Material and method	72
4.3.1. Patients	72
4.3.2. Genetic testing	72
4.4. Results	72
4.5. Discussion	77
4.6. Conclusions	81
5. 3rd Study - Associations of pathogenic mutations responsible for breast cancer risk with histology and immunohistochemistry in Romanian population	83
5.1. Introduction	84
5.2. Working hypothesis / objectives	84
5.3. Material and method	84
5.3.1. Patients	84
5.3.2. Histology and immunohistochemistry	85
5.3.2. Genetic testing	85
5.3.4. Statistical analysis	86
5.4. Results	86
5.5. Discussion	93
5.6. Conclusions	96
6. 4th Study - Influence of reproductive factors on the risk of breast cancer in women with pathogenic mutations	99
6.1. Introduction	99
6.2. Working hypothesis / objectives	99
6.3. Material and method	100
6.3.2. Patients	100
6.3.2. Genetic testing	100
6.3.4. Statistical analysis	100
6.4. Results	101
6.5. Discussion	103
6.6. Conclusions	106
7. 5th Study - The association of the pathogenic variant c.4035delA of the BRCA1 gene with HER2 overexpression	109
7.1. Introduction	109
7.2. Case presentation	110
7.2.1. 1 st Case	110
7.2.2. 2 nd Case	111
7.3. Conclusions	113
8. General discussions	115
9. General conclusions	119
10. Originality and innovative contributions of the thesis	121
REFERENCES	123
ANNEXES	141

INTRODUCTION

Breast cancer is the most frequently diagnosed malignancy in women worldwide and the second cause of death by neoplasia, being known that nowadays one in 8 women will be diagnosed with this disease.

The incidence of breast cancer in Romania in 2012 was 25.22 / 100.000, with a mortality of 16.74 / 100.000 and an estimated 5-year prevalence increase of up to 35%.

In recent years, we have witnessed an accelerated progress both in understanding and in the diagnosis and treatment of patients with hereditary breast cancer, studies demonstrating the importance and usefulness of genetic testing.

Genetic screening for certain types of familial hereditary cancers has begun to be used on a wider scale worldwide, especially after the introduction of Next Generation Sequencing (NGS). This has been made possible in particular since the 2013 trial, when Myriad Genetics lost its patent right on BRCA1 / 2, the US Supreme Court ruling that DNA and genes cannot be patented.

Accelerated development of multigenic test panels for hereditary cancers had a positive impact on the diagnosis and screening of these patients. The multigene panel test recommendations, especially for breast cancer, should not be different from those for a single gene, especially since it is more appropriate in terms of efficiency and costs.

The purpose of these genetic tests is to create the opportunity for individualized and multidisciplinary treatment of each patient according to their mutation, but also to advise relatives of these patients about their risk for developing breast cancer or other forms of cancer at which they may be susceptible.

More and more genes are incriminated in breast cancer risk occurrence, but not all mutations occurring on these genes are pathological (Deleterious mutation), some are benign polymorphism and others have unknown significance (Variant of unknown significance - VUS).

Although genetic determinism of breast cancer is the core of the current research, more and more studies reinforce the link between obstetric and reproductive factors and the risk of breast cancer. It seems that these reproductive and hormonal factors can influence the risk but also the age of breast cancer onset in patients with pathogenic mutations.

There are only a few studies in medical literature that examined the associations between reproductive factors and the risk of breast cancer in carriers of pathogenic mutations in high-risk genes, data being particularly limited to BRCA1 / 2 genes.

PERSONAL CONTRIBUTION

1st Study - Benefits of multigene panel testing in breast cancer

Objectives: Genetic analysis of breast cancer patients using a multigene panel or a BRCA1 / BRCA2 panel. Analysis the benefits of multigene panel testing in patients with breast cancer and negative results of BRCA1 / BRCA2 panel.

Material and method: Retrospective, descriptive study on 80 patients diagnosed with breast cancer between January 2015 - December 2016, using a BRCA1 / BRCA2 panel or a multigene panel for genetic testing, according to 2016 NCCN guidelines for genetic testing.

Results: Out of the 80 patients diagnosed with breast cancer and tested through these two panels, 30 had high and medium penetration mutations, 13 had rare mutations with intermediary breast cancer

risk and 37 were negative. From the 14 patients with negative BRCA panel testing, 6 were retested using the multigene panel, and we diagnosed 2 pathogenic mutations (CHEK2, PALB2) and 1 VUS mutations in STK11 gene.

Conclusions: The genetic test results influenced the medical conduct of all patients with high penetration mutations who received neoadjuvant systemic therapy, followed by radical surgery and prophylactic mastectomy and / or bilateral prophylactic Salpingo-oophorectomy. Exception to this medical conduct was only for TP53 mutation carrier, due to the risk of secondary neoplasia given by neoadjuvant treatment (chemo-radiotherapy), and undergone primary surgery. Genetic retesting through the extended panel has led to the diagnosis of 3 mutations (2 pathogenic and 1 VUS type) which could have escaped the diagnosis and hence a proper treatment and genetic counseling.

2nd Study - Prevalence of deleterious mutations among patients with breast cancer referred for multigene panel testing in a Romanian population

Objective: To report our experience on the first 130 consecutive breast cancer patients who have addressed our service for genetic testing through a multigenic panel, providing data on the frequency of pathogenic genetic variants or variants of unknown significance.

Material and method: Retrospective, descriptive study on 130 patients diagnosed with breast cancer between January 2015 and June 2017, genetically tested using a panel for BRCA1 / BRCA2 or a multigene panel according to NCCN 2016 guidelines.

Results: During the analyzed period, 130 patients with breast cancer were eligible for genetic testing and 82 were included in the study. From the 82 patients that we've tested we identified 93 mutations (56 pathogenic and 37 VUS). The most frequent BRCA1 mutation was c.3607C> T (28%), followed by c.5266dupC (16%) and c.4035delA (16%), c.181T> G (8%). Regarding BRCA2 mutations, c.9371A> T and c.8755-1G> A variants were found each in 27.27% of cases. 3 VUS mutations were identified in the BRCA2 gene (27.27%). Mutations on additional genes were predominantly VUS mutations and only in 5 cases were pathogenic. Most VUS variants were from patients with rare mutations, whereas in the BRCA1 mutation group we did not identify any VUS variants.

Conclusions: Our study successfully identified 2 mutations in the BRCA1 gene, which are uncommon in the population of Romania, c.3607C> T and c.4035delA. Furthermore, the two pathogenic variants were associated with different histological and molecular phenotypes. Variant c.3607C> T was associated with triple negative breast cancer (ER, PR and HER2 negative), respecting the general phenotype of patients with BRCA1 mutations, while variant c.4035delA was associated with HER2 positive phenotype, an atypical element for patients with mutations in the BRCA1 gene. For the rest of the genes, the information could be useful to identify specific mutations in Romania population and therefore for a targeted diagnosis, which could reduce the costs and shorter the time to obtain results.

3rd Study - Associations of pathogenic mutations responsible for breast cancer risk with histology and immunohistochemistry in Romanian population

Objective: The main objective of this study was to evaluate the association of pathogenic mutations responsible for the occurrence of breast cancer (BRCA1, BRCA2, TP53, PTEN, STK11, CDH1, PALB2, ATM, CHEK2) with certain histopathological and immunohistochemical prognostic factors. The secondary

objective was to evaluate the prevalence of some pathogenic variants in the BRCA1 and BRCA2 genes, to determine whether these variants are similar to those in the neighboring countries of Romania (the Eastern European region) and to correlate these variants with the immunohistochemical characteristics of the tumors.

Material and method: Retrospective, descriptive study on 80 patients diagnosed with breast cancer between January 2015 and December 2016, genetically tested using a multigene panel according to NCCN 2016 guidelines. All patients had a prior histopathological confirmation of the diagnosis, with immunohistochemistry performed through a Tru-Cut breast biopsy.

Results: Patients with breast cancer and pathogenic mutations were diagnosed often with undifferentiated tumors (G3) ($p = 0.0050$) compared to those without mutations that were frequently associated with well-differentiated forms of breast cancer (G1) ($P = 0.0120$). Bilateral breast carcinoma was observed in two cases, both in patients with pathogenic CHEK2 mutations ($p = 0.0183$). Significant differences were found when we compared the group with BRCA1 mutations with breast cancer patients without mutations, regarding the immunohistochemical features - ER (%) PR (%) and Ki-67 (%). No other significant differences were observed when comparing the other groups of mutations with breast cancer patients without mutations ($p > 0.12$). The BRCA1 c.3607C> T variant was diagnosed in seven patients from our study, followed by mutations c.5266dupC (4 cases) and c.181T> G (2 cases). The BRCA1 c.3607C> T variant was the most common in the study group and in six of the cases it was associated with TNBC breast cancer ($p < 0.0001$).

Conclusions: Our study confirmed that patients with pathogenic mutations and breast cancer usually have more aggressive and undifferentiated forms (G3), this feature being the most common in BRCA1 and PALB2 mutation carriers. BRCA1 mutations respected the general immunohistochemical profile, most of them being triple negative, whereas only a quarter of the breast cancer patients without mutations presented this molecular subtype. Our study revealed a new BRCA1 mutation which wasn't reported so far in the Romanian population, BRCA1 c.3607C> T variant, the only studies conducted so far in this population, arguing that c.5266dupC is the most common variant in this region. BRCA1 c.3607C> T variant is associated with TNBC forms, this being consistent with the general immunohistochemical profile of breast cancer patients and BRCA1 mutation carriers. Regarding BRCA2 mutations, both c.8755-1G> A and c.9371A> T variants have never been reported in the Romanian population, and data from Eastern European countries for these two mutations are limited.

4th Study - Influence of reproductive factors on the risk of breast cancer in women with pathogenic mutations

Objective: This study aims to analyze the influence of reproductive factors in the occurrence of breast cancer in patients with pathogenic mutations versus patients without mutations. As a secondary objective, we aimed to analyze the influence of reproductive factors on the occurrence of breast cancer in a subgroup of patients with pathogenic BRCA1 mutations compared to patients without mutations.

Material and method: Retrospective, descriptive study on 130 patients diagnosed with breast cancer between January 2015 and June 2017, genetically tested using a panel for BRCA1 / BRCA2 or a multigene panel according to NCCN 2016 guidelines. The reproductive characteristics of all patients were noted as follows: age of menarche (≤ 12 , 13-14, ≥ 15 years), patient's age at first fulltime pregnancy (< 25 , 25-29, 30-34, ≥ 35 years), the number of pregnancies (1, 2, 3, 4, etc.), the number of births (1, 2, 3, 4, etc.), breastfeeding interval (≤ 3 , 4-6, 7-11, ≥ 12 months), the number of abortions (1, 2, 3, 4, etc.), menopausal status at diagnosis (Yes, No).

Results: The comparison in terms of reproductive characteristics in subjects with breast cancer, and mutations or without mutations showed that breast-feeding is the only statistically significant protective factor in patients with breast cancer without mutation ($p < 0.05$). No other significant associations or differences were found between the two groups. No significant association was found between the use of combined oral contraceptives and patients with breast cancer and mutations ($p = 0.4142$). No significant associations or differences in reproductive characteristics were observed when subjects with BRCA1 were compared with those without a mutation nor in terms of oral contraceptives consumption.

Conclusions: Environmental and reproductive factors can influence both the risk and the age of onset of breast cancer in patients carrying pathogenic mutations. Our study has shown that breastfeeding has a protective effect against breast cancer only in patients without mutations. The risk of breast cancer is not affected by carriers of pathogenic mutations or mutations in BRCA1 gene by the number of abortions, parity, age at which the first pregnancy occurs, age at menarche and menopause, or oral contraceptive use.

5th Study - The association of the pathogenic variant c.4035delA of the BRCA1 gene with HER2 overexpression

Objective: Reporting 3 cases of breast cancer associated with the c.4035delA BRCA1 variant that were associated with HER2 overexpression.

Case presentation: Description of 3 cases of which 2 mother-daughter patients who were diagnosed with breast cancer and positive BRCA1 c.4035delA variant.

Conclusions: The particularity of these cases resides in the association of a pathogenic mutation in the BRCA1 gene - c.4035delA (pGlu1346Lysfs * 20) with HER2 overexpression and increased estrogen receptors. It is known that BRCA1 gene mutations are frequently associated with triple-negative breast cancer and exceptionally rare with HER2-positive forms.

Originality and innovative contributions of the thesis

This research is the first evaluation of the pathogenic mutations involved in the occurrence of breast cancer in the Romanian population. Although studies focused on BRCA gene mutations began many years ago, the importance of other high and medium penetration genes has drawn attention over the last 3-4 years with the widespread introduction of NGS technology.

Our research has successfully identified a new pathogenic mutation in the BRCA1 gene that has not been previously described in the Romanian population, namely BRCA1 c.3607C> T variant. This mutation was the most common BRCA1 variant diagnosed in our study, and has been associated with triple-negative forms of breast cancer in 6 of the 7 identified cases, respecting the molecular profile of the class.

C.4035delA and c.5266dupC variants of BRCA 1 gene have been diagnosed each in 4 cases, occupying the 2-position. Interesting is the molecular profile of variant c.4035delA, which has been associated in 3 cases with HER2 overexpression, an atypical element for BRCA1 mutations, the fourth case being that of a mutation carrier, but without breast cancer.

Our research has also brought new information regarding the prevalence of pathogenic and VUS mutations involved in the occurrence of genetically determined breast cancer in the Romanian population, being among the first studies to address this problem in our region.

Regarding the reproductive and obstetric factors involved in breast cancer occurrence, it appears that they do not influence the risk of breast cancer in patients with genetic risk.

Breastfeeding is the only reproductive factor that has shown significant protective effect, but only in patients without pathogenic mutations.

The rest of the reproductive factors considered to increase the risk of breast cancer such as early menarche, late menopause, nulliparity, abortions, and the long interval between menarche and first childbirth do not seem to significantly affect this risk in patients with pathogenic mutations.

Consumption of combined oral contraceptives of these patients with pathogenic mutations also does not influence the risk and age of breast cancer onset.