**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

NATHÁLIA MORENO CURY

**INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE BRCA1 EM FAMÍLIAS
BRASILEIRAS COM SUSPEITA DA SÍNDROME HEREDITÁRIA DO
CÂNCER DE MAMA E/OU OVÁRIO**

Ribeirão Preto

2012

NATHÁLIA MORENO CURY

**Investigação de mutações no gene BRCA1 em famílias brasileiras com
suspeita da Síndrome Hereditária do Câncer de Mama e/ou Ovário**

Dissertação de Mestrado apresentada a
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Cury, Nathália Moreno.

Investigação de mutações no gene BRCA1 em famílias brasileiras com suspeita da Síndrome Hereditário do Câncer de Mama e/ou Ovário.

Ribeirão Preto, 2012.

93 f.: il.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Genética

Orientador: Silva Jr, Wilson Araújo

1. Câncer de Mama. 2. Gene BRCA1. 3. Mutações germinativas. 4. High Resolution *Melting*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nathália Moreno Cury

Investigação de mutações no gene BRCA1 em famílias brasileiras com suspeita da Síndrome Hereditária do Câncer de Mama e/ou Ovário

Dissertação de Mestrado apresentada a
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto,
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, por todo apoio e amor incondicional e
às minhas avós, por todo carinho e dedicação*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior, meu orientador, agradeço pela confiança e auxílio no meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Victor Evangelista de Faria Ferraz, agradeço pelas dicas e discussões principalmente de caráter clínico.

Aos membros titulares da banca: por aceitarem avaliar meu trabalho.

Aos pacientes e familiares que permitiram a realização desse trabalho de pesquisa.

A enfermeira Fátima das Graças Carvalho pela coleta das amostras dos pacientes.

A enfermeira Patrícia Silva pelo auxílio na coleta dos dados referentes ao histórico familiar de cada paciente.

A Capes, pelo apoio financeiro.

A minha família, pelo amor, pelo carinho, pelo incentivo, pela confiança, e pelo apoio incondicional. Ao meu pai José Nadim Cury, pelo exemplo de caráter, honestidade, capacidade e superação. A minha mãe Célia Regina Moreno Cury, pela cumplicidade, paciência, e pelas palavras de carinho e incentivo nos momentos difíceis.

A minha vó Ia, pelo carinho e por sempre torcer por mim.

A minha vó Olga, pelo carinho e cafuné nos momentos difíceis.

A Celina, minha segunda mãe, pelo carinho, mimos e companhia.

A Ana pelas risadas, pelos mimos e carinho.

A meus amigos do Ibilce de São José do Rio Preto, pela amizade e pelos churrascos.

As Tilangas, por dividirem comigo os melhores anos da minha vida

Aos amigos do laboratório, Júlio e Rafa pelas sugestões na redação dessa dissertação

Aos amigos do laboratório, Luíza, Greice, Dalila, Karina, Willys e Bruninha, pelos momentos de descontração necessários depois de um dia difícil de trabalho.

A Cristiane Ayres e Adriana Marques, pelo auxílio na técnica de sequenciamento de DNA

A Sandra Navarro Breseiani, pela adaptação das figuras.

A Fernanda Vargas e Silva Castanheira, pela paciência, compreensão, companheirismo e principalmente pela amizade incondicional.

A Patrícia Goto, pelos conselhos, pelos momentos de descontração e pela companhia.

A Silva e a Suzie, secretárias do departamento de genética, por cuidar da parte burocrática envolvida na entrega e defesa dessa dissertação.

A Fundação Hemocentro, pelo local e equipamentos de trabalho proporcionados.

RESUMO

CURY, N.M. **Investigação de mutações no gene BRCA1 em famílias brasileiras com suspeita da Síndrome Hereditária do Câncer de Mama e/ou Ovário.** 2012. 113f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Cerca de 10% dos casos de câncer de mama e/ou ovário são caracterizados como hereditários, onde a presença de mutações germinativas no gene de suscetibilidade BRCA1 aumenta o risco de desenvolver esses cânceres durante a vida da mulher. O BRCA1 é um gene supressor tumoral envolvido na resposta de danos ao DNA, controle do ciclo celular, na remodelação da cromatina, ubiquitinação e regulação da transcrição. O presente estudo tem como objetivo central caracterizar as mutações do gene BRCA1 associadas a Síndrome Hereditária do Câncer de Mama e/ou Ovário (HBOC) em pacientes atendidos no Serviço de Aconselhamento Genético do Câncer do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP). Os vinte e dois éxons codificantes do BRCA1 foram analisados utilizando o método de High Resolution Melting (HRM) para triagem de mutações pontuais, seguido pelo sequenciamento de DNA dos casos selecionados para validação. A técnica de MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) também foi usada para detectar grandes deleções e duplicações. Uma vez confirmada a mutação, membros da família considerados de alto risco, serão investigados para a mutação específica, a fim de proporcionar-lhes um aconselhamento genético apropriado para a detecção precoce do câncer. No presente estudo, foram investigados 41 pacientes que preencheram os critérios para o teste genético de acordo com NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology v.1.2010. Um total de 21 mutações foram identificadas, duas das quais são patogênicas: a deleção dos éxons 17-18 e a deleção dos éxon 19. Ambas estão localizadas no domínio BRCT do gene BRCA1, essencial para a ligação de fosfoproteínas críticas para a ativação do complexo de reparo do DNA. Outra mutação, a S616del, foi tratada como patogênica, mas apresenta informações controversas em diferentes estudos. O trabalho também identificou uma nova mutação, Val1117Ile. Um estudo de haplótipos das mutações identificadas nos pacientes foi realizado e revelou que um dos haplótipos, denominado de 6, contendo quatro resíduos mutados (871Leu, 1038Gly, 1183Arg e 1613Gly) estava presente em 50% das pacientes. O estudo de associação com 82 indivíduos saudáveis, mostrou diferença significativa ($p=0,026$) nos pacientes, sugerindo assim um risco aumentado de HBOC. Adicionalmente, foi analisada a mutação germinativa R337H no gene p53 para os casos suspeitos de Síndrome de Li-Fraumeni. Em síntese, o presente estudo contribui com a identificação de uma nova mutação não-sinônima no gene BRCA1 e sugere que o haplótipo 871Leu-1038Gly-1183Arg-1613Gly possa conferir risco aumentado do câncer de mama e/ou ovário em pacientes diagnosticados com HBOC.

Palavras-chave: Câncer de Mama, BRCA1, Mutações germinativas, High Resolution *Melting*

ABSTRACT

About 10% of cases of breast and/or ovary cancer are characterized as hereditary, where the presence of germline mutations in susceptibility BRCA1 gene increases the risk of developing these cancers during woman's lifetime. BRCA1 is a tumor suppressor gene involved in DNA damage response, cell cycle control, chromatin remodeling, ubiquitination and transcriptional regulation. The present study aims to characterize BRCA1 gene mutations associated with Hereditary Breast/Ovary Cancer Syndrome (HBOC) in patients from the Cancer Genetic Counseling Service of the General Hospital of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo (HCFMRP-USP). The twenty two coding exons of BRCA1 were analyzed using High Resolution Melting (HRM) method for the screening of point mutations, followed by DNA sequencing of the cases selected to validation. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) technique was also used to detect gross deletions and duplications. Once confirmed the mutation, family members most at risk will be analyzed for the specific mutation in order to provide them with an appropriate genetic counseling for early detection of cancer. In the present study, we investigated 41 patients that fulfilled the criteria for genetic testing according to NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology v.1.2010. A total of 21 mutations were identified, two of them are pathogenic: a deletion of exons 17-18 and a deletion of exon 19. Both of them are located in the BRCT domain of BRCA1 gene, impairing the binding of essential phosphoproteins critical to the activation of DNA repair complex. Another mutation, S616del, shows controversial information about its pathogenesis in different studies. The present study also describes a new mutation, Val1117Ile. A study of haplotypes of the mutations identified in patients was performed and revealed that one of the haplotypes, called 6, containing four mutated residues (871Leu, 1038Gly, and 1183Arg 1613Gly) was present in 50% of patients. The association study with 82 healthy subjects showed a significant difference ($p = 0.026$) in patients, thus suggesting an increased risk for HBOC. Additionally, the germline mutation R337H on p53 gene was also analyzed in the present study for suspected cases of Li-Fraumeni Syndrome. In summary, this study contributes to the identification of a new missense mutation in the BRCA1 gene and suggests that the haplotype-871Leu-1038Gly 1183Arg-1613Gly may confer increased risk of breast cancer and / or ovarian cancer in patients diagnosed with HBOC.

Key words: Breast cancer, BRCA1, germline mutations, High Resolution *Melting*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -- A proteína BRCA1	20
Figura 2 -- Estrutura dos domínios BRCT do gene BRCA1	21
Figura 3 -- Recombinação homóloga	24
Figura 4 -- Ubiquitinação e Sumoilação	27
Figura 5 -- O gene TP53 e a proteína p53	34
Figura 6 -- Mutação R337H no gene TP53	37
Figura 7 -- O papel dos genes BRCA1 e BRCA2 no reparo do DNA	39
Figura 8 -- Temperatura ideal de detecção das mutações na técnica de HRM	44
Figura 9 -- Perfil da curva de <i>melting</i> em indivíduos homozigotos e heterozigotos	44
Figura 10 -- A técnica de MLPA	48
Figura 11 -- Gel de agarose representando a amplificação do éxon 18 do gene BRCA1	51
Figura 12 -- Identificação da mutação Val1117Ile no gene BRCA1	53
Figura 13 -- Identificação das mutações Ser1613Gly e Met1652Ile no gene BRCA1	54
Figura 14 -- Falha na identificação da mutação IVS8-57delT no gene BRCA1	55
Figura 15 -- Identificação das mutações Glu1038Gly e Ser1040Asn no gene BRCA1	56
Figura 16 -- Deleção em heterozigose dos éxons 16 e 17 no gene BRCA1	58
Figura 17 -- Deleção em heterozigose do éxon 19 no gene BRCA1	59
Figura 18 -- Indivíduos não portadores de deleções ou duplicações no gene BRCA1	59
Figura 19 -- Identificação da mutação R337H no gene TP53	64
Figura 20 -- Heredograma da família das pacientes 2699, 2739 e 2740	65
Figura 21 -- Heredograma da família da paciente 2692	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Mutações nos genes BRCA1/2 descritas no HGMD	29
Tabela 2 – Mutações encontradas no gene BRCA1	52
Tabela 3 – Significado clínico das mutações no gene BRCA1	57
Tabela 4 – Características clínicas de pacientes e controles	60
Tabela 5 – Frequência genotípica e alélica dos controles e pacientes com HBOC	61
Tabela 6 – Frequência genotípica dos controles e pacientes com HBOC	62
Tabela 7 – Frequência estimada de haplótipos associados a HBOC	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAGC= Ambulatório de Aconselhamento Genético

ADP= Adenosina di-fosfato

ASCO= *American Society of Clinical Oncology*

ATP= Adenosina tri-fosfato

BIC= *Breast Cancer Information Core*

CEP= Comitê de Ética e Pesquisa

CM= Câncer de mama

DBD= DNA *binding domain*

DNA= Ácido desoxiribonucléico

DSBs= *Doble strand breaks*

EDTA= Ácido etilenodiaminotetracético

ER-= Receptor de Estrógeno negativo

ER= Receptor de estrógeno β

ER α = Receptor de estrógeno α

HBOC= *Hereditary Breast and Ovary Cancer*

HCFMRP-USP= Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-
Universidade de São Paulo

HCl = Ácido Clorídrico

HER2-= Receptor *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* negativo

HGMD= *Human Gene Mutation Database*

Hp= haplótipo

HRM= *High Resolution Melting*

ICs= Intervalo de Confiança

INCA= Instituto Nacional do Câncer

LFL= Síndrome de Li-Fraumeni *like*

MgCl₂= Cloreto de Magnésio

MLPA= *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

NCBI= *National Center for Biotechnology Information*

NCCN= *National Comprehensive Cancer Network*

(NH₄)₂SO₄ = Sulfato de amônio

nt= Nucleotídeo

OMIM= *On-line Mendelian Inheritance in Men*

OR= *Odds Ratio*

PARPs= Poli (ADP-ribose) polimerase

pb= Pares de base

PCNA= Antígeno nuclear de proliferação celular

PCR= *Polimerase chain reaction*

PR- = Receptor de Progesterona negativo

PR= Progesterona

RH= Recombinação Homóloga

RNA= Ácido Ribonucléico

RNA_m= Mensageiro do ácido ribonucléico

SLF= Síndrome de Li-Fraumeni

SUMO= *Small ubiquitin-like modifier*

TA= *Transcription activation*

Ub= Ubiquitina

Uniprot= *Universal Protein Resource*

UTR= *Untranslated region*

v= Volume

WHO= *World Health Organization*

°C= Grau Célsio

LISTA DE SÍMBOLOS

M= Molar

mM= Milimolar

pmoles= Picomoles

ng= Nanogramas

nm= Nanômetros

μ L= Microlitro

μ M= Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	Epidemiologia do câncer de mama e ovário	13
1.2	Síndrome Hereditária do Câncer de Mama e/ou Ovário	15
1.2.1	Características clínicas e histopatológicas dos tumores relacionados a HBOC	18
1.3	Estrutura e função do gene <i>brca1</i> (Breast Cancer 1 gene)	20
1.4	Modificações pós-traducionais do gene BRCA1	25
1.5	Tipos e prevalência das mutações nos genes BRCA1 e BRCA2	27
1.6	Predição e avaliação da patogenicidade de mutações missense do gene BRCA1	31
1.7	Teste genético para a Síndrome Hereditária de Câncer de Mama e/ou Ovário	32
1.8	A mutação R337H do gene TP53 e o câncer de mama hereditário	33
2	OBJETIVOS	40
2.1	Objetivo Geral	40
2.2	Objetivos Específicos	40
3	MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1	Coleta de amostras	41
3.2	Aspectos Éticos	42
3.3	Análise de mutações no gene BRCA1	42
3.3.1	Extração de DNA	42
3.3.2	Reação da Cadeia da Polimerase (PCR)	42
3.3.3	High Resolution <i>Melting</i> (HRM)	43
3.3.4	Sequenciamento de DNA	45
3.3.5	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)	45
3.3.5.1	Denaturação do DNA genômico e hibridização com sondas SALSA MLPA	46
3.3.5.2	Reação de Ligação	46
3.3.5.3	Reação da PCR Multiplex	47
3.3.5.4	Separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar	49
3.3.5.5	Análise dos dados obtidos por MLPA	49
3.4.	Análise Estatística	50
4	RESULTADOS	51
4.1	Amplificação do gene BRCA1 por PCR	51
4.2	Deteção de mutações por HRM	52
4.2.1	Significado clínico das mutações encontradas	57
4.3	Análise por MLPA	58
4.4	Análise de Haplótipos	60
4.5	Análise da mutação R337H (Arg337His) no gene TP53	63
5	DISCUSSÃO	66
6	CONCLUSÃO	78
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
8	APÊNDICES	93
9	ANEXOS	111

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO

A carcinogênese traduz-se num processo caracterizado por envolver vários eventos que ativam vias gênicas fundamentais para o crescimento e desenvolvimento do tumor (OSBORNE *et al.*, 2004).

Câncer de Mama

No cenário mundial, o câncer de mama (CM) é o segundo tumor mais freqüente no gênero feminino, com incidência inicial aos 25 anos de idade tendo seu pico entre 75 e 79 anos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2007). Além disso, o CM pertence a um grupo de doenças multifatoriais de etiologia complexa caracterizada pela proliferação descontrolada das células epiteliais/estromais e metástase. As primeiras lesões visíveis são as hiperplasias das células epiteliais, caracterizadas por alterações estruturais, sem atipia citológica e com poucas alterações genéticas (FADARE e TAVASSOLI, 2007).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (World Health Organization -WHO), o número de casos novos tem crescido globalmente. Estima-se que de 2007 a 2030 haja um aumento de 45% no número de mortes (de 7.9 milhões para 11.5 milhões). A WHO estima também que mais de um milhão de mulheres sejam anualmente acometidas por essa neoplasia. No Brasil o CM é responsável pela maior causa de óbitos por câncer na população feminina sobretudo na faixa etária entre 40 e 69 anos. Para o ano de 2012 a estimativa do INCA (Instituto Nacional do Câncer) é de 52.680 novos casos. Estudos epidemiológicos têm apontado vários fatores de risco associados ao aumento da suscetibilidade ao câncer de mama.

Entre eles, estão a idade, a menarca precoce, a menopausa tardia, a nuliparidade, idade avançada da primeira gravidez e a história familiar considerada um dos mais importantes. O uso de contraceptivos orais e a terapia de reposição hormonal continuam sendo alvo de controvérsias (MCPHERSON *et al.*, 2000). Cerca de 5-10% dos tumores de mama são do tipo hereditários e aproximadamente 30% das mulheres jovens, que desenvolvem esse tipo de câncer, apresentam predisposição a doença (CLAUS *et al.*, 1996; WALSH *et al.*, 2006; CHACÓN e COSTANZO *et al.*, 2010; PRAT e PEROU, 2011). O CM afeta cerca de 1% dos homens. No entanto, esta incidência tem aumentado e está relacionada principalmente com o histórico familiar (WEISS *et al.*, 2005).

Dados de Jemal *et al.* (2011), indicam uma incidência de CM elevada em países da região Norte e Ocidental da Europa, Austrália/Nova Zelândia e América do Norte; intermediária em países da América do Sul, Caribe e Sul da África; e baixa na África Sub-Saariana e Ásia. Entre os fatores que contribuem para esta variação internacional estão às diferenças entre comportamento reprodutivo e hormonal e a disponibilidade de serviços de diagnóstico precoce. No Brasil, observa-se uma variação regional na incidência e mortalidade de CM, com maiores taxas nas áreas mais desenvolvidas sugerindo que o ambiente e/ou estilo de vida podem influenciar na incidência desta doença (INCA, 2008). Por outro lado, este fato pode apenas estar refletindo a presença de melhores condições de diagnóstico e de registro nestas regiões.

Câncer de Ovário

O câncer de ovário é a oitava neoplasia maligna mais freqüente nas mulheres brasileiras (SILVA-FILHO *et al.*, 2004). A estimativa do INCA para o ano de 2012 é de 6.190 novos casos. É um tumor ginecológico de difícil diagnóstico e o de maior letalidade, que ocorre em qualquer faixa etária, mas sobretudo em mulheres acima dos 40 anos de idade (LUIZ, 2009). Cerca de 3/4 dos tumores malignos de ovário são diagnosticados em estágio avançado. Fatores hormonais e ambientais podem estar relacionados com o aparecimento do tumor de ovário, entretanto os principais fatores de risco são a idade e a suscetibilidade genética (WHITTEMORE *et al.*, 1992). Assim como o CM, cerca de 5 a 10% dos casos câncer de ovário são do tipo hereditário ou familiar (PLAKHINS *et al.*, 2011).

1.2 SÍNDROME HEREDITÁRIA DO CÂNCER DE MAMA E/OU OVÁRIO

A Síndrome Hereditária de Câncer de Mama e de Ovário (Hereditary Breast and Ovary Syndrome - HBOC) é caracterizada pela presença de adenocarcinoma de mama de origem ductal ou lobular e carcinoma epitelial de ovário, com prevalência de 1 em 800 ou até 2500 mulheres na população geral (SCHNEIDER, 2002). Conforme descrito anteriormente, estima-se que cerca de 90% de todos os casos de CM e ovário são do tipo esporádico, enquanto que apenas 10% são do tipo hereditário, associados a mutações nos genes de reparo do DNA. Nesse caso, cerca de 2/3 estão relacionados com mutações nos BRCA1 e BRCA2 (MIKI *et al.*, 1994; NATHANSON *et al.*, 2001; ANTONIOU *et al.*, 2003). O restante dos casos afetam principalmente os genes TP53, PTEN, RAD51, BRIP1 e PALB2 (EWALD *et al.*, 2009).

Segundo o NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) *Clinical Practice Guidelines in Oncology* v.1.2011, há indicação para o teste genético relacionado a HBOC quando o indivíduo preenche os seguintes critérios:

- Indivíduos de família com histórico de mutação nos genes BRCA1 e/ou BRCA2.
- História Pessoal de Câncer de Mama + 1 ou mais características abaixo:
 - Idade do diagnóstico ≤ 45 anos;
 - Idade do diagnóstico ≤ 50 anos, com ≥ 1 parente próximo (1º, 2º e 3º graus) com Câncer Mama ≤ 50 anos e/ou ≥ 1 parente próximo (1º, 2º e 3º graus) com Câncer Epitelial de Ovário, Câncer de Trompa de Falópio ou Câncer Peritoneal Primário em qualquer idade;
 - Dois cânceres de mama primários, sendo o primeiro diagnosticado antes dos 50 anos de idade;
 - Idade do diagnóstico < 60 anos com câncer de mama triplo-negativo;
 - Idade do diagnóstico < 50 anos com história familiar limitada;
 - Diagnóstico em qualquer idade com ≥ 2 parentes próximos (1º, 2º e 3º graus) com Câncer Mama e/ou Câncer Epitelial de Ovário, Câncer de Trompa de Falópio ou Câncer Peritoneal Primário em qualquer idade;
 - Um parente próximo (1º, 2º e 3º) do sexo masculino com Câncer de Mama;
 - História pessoal de Câncer Epitelial de Ovário, Câncer de Trompa de Falópio ou Câncer Peritoneal Primário;
 - Etnias de Alto Risco (Judeus Ashkenazi, Islandeses, Suecos, Húngaros etc)
- História pessoal de Câncer Epitelial de Ovário, Câncer de Trompa de Falópio ou Câncer Peritoneal Primário em qualquer idade;
- História Pessoal de Câncer de Mama em homens;
- História Pessoal de Câncer de Mama e/ou ovário em qualquer idade com 2 ou mais parentes próximos (1º, 2º e 3º graus) com Câncer pancreático em qualquer idade;
- História Pessoal de Câncer pancreático em qualquer idade com 2 ou mais parentes próximos (1º, 2º e 3º graus) com Câncer de Mama e/ou ovário e/ou pancreático em qualquer idade ;
- História Familiar:
 - Algum parente próximo (1º e 2º graus) da família preenchendo um dos critérios anteriores
 - Parente em 3º grau com câncer de mama/ovário/trompa de Falópio/peritoneal primário com 2 ou mais parentes próximos (1º, 2º e 3º graus) com câncer de mama ou ovário, sendo ao menos um parente com câncer de mama com 50 anos ou menos.

O BRCA1 e BRCA2 são genes supressores tumorais que apresentam herança autossômica dominante com penetrância incompleta. Estudos populacionais verificaram que a penetrância para o CM é de 45% a 65% (ANTONIOU *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2006), sendo que em algumas famílias esse número é superior (KING *et al.*, 2003).

Os genes BRCA1 e BRCA2 foram caracterizados por meio de clonagem posicional em 1994 (MIKI *et al.*, 1994) e 1995 (WOOSTER *et al.*, 1995), respectivamente. Eles estão envolvidos em vias importantes relacionadas ao reconhecimento de danos no DNA, no reparo do DNA, no controle do ciclo celular, na regulação da transcrição e na remodelação da cromatina (FRIEDENSON, 2005). Por essas razões, a perda de função desses genes pode acarretar o surgimento e o desenvolvimento de neoplasias.

Acredita-se que o BRCA1 seja responsável por cerca de 45-50% de todos os casos de CM hereditários (RISCH *et al.*, 2006). Portadores de mutações no gene BRCA1 tem um risco cumulativo de 80-85% de desenvolver CM durante toda vida e até 50% de risco para o câncer de ovário (FORD *et al.*, 1998; SATAGOPAN *et al.*, 2001; SIMCHONI *et al.*, 2006; BEGG *et al.*, 2008; MAHFOUDH *et al.*, 2011). Outros tumores que parecem ser mais freqüentes em portadores(as) de mutações em BRCA1 incluem câncer de trompa de Falópio, câncer peritoneal e câncer de próstata (THOMPSON E EASTON, 2002a; LIEDE *et al.*, 2004; HODGSON *et al.*, 2007).

A freqüência de mutações no gene BRCA1 em famílias com HBOC depende do número de casos na família, da idade de início do câncer e dos órgãos afetados (mama ou ovário) (EVANS *et al.*, 2004). Há também evidências de variação do risco de câncer de acordo com o tipo e a posição da mutação no gene, assim como uma variação do risco entre as famílias com a mesma mutação (Smith *et al.*, 2007). Recentemente, Al-Mulla *et al.* (2009), mostraram, em famílias do Reino Unido, que a penetrância dos cânceres de mama e de ovário é menor em indivíduos portadores da mutação 185delAG, presente no éxon 2 do gene

BRCA1, quando comparada a indivíduos portadores da duplicação do éxon 13 do mesmo gene. Em relação ao carcinoma de mama esporádico, o gene BRCA1 é raramente mutado, mas sua função pode ser suprimida pelo mecanismo epigenético de metilação do DNA (PLAKHINS *et al.*, 2011).

Já o gene BRCA2 é responsável por cerca de 30-40% de todos os casos de CM hereditário (RISCH *et al.*, 2006). O risco de vida cumulativo para o CM em mulheres portadoras de mutações germinativas nesse gene é similar ao risco de portadoras de mutações germinativas em BRCA1, 80-85% durante toda vida, enquanto que o risco para câncer de ovário é de 10-25% (FORD *et al.*, 1998; SATAGOPAN *et al.*, 2001; SIMCHONI *et al.*, 2006; BEGG *et al.*, 2008; MAHFOUDH *et al.*, 2011). Com relação ao desenvolvimento do CM bilateral, mulheres com histórico familiar positivo para BRCA1 têm risco maior de 1,6 vezes do que as mulheres com histórico familiar positivo para BRCA2 (GRAESER *et al.*, 2009).

1.2.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOPATOLÓGICAS DOS TUMORES RELACIONADOS A HBOC

A HBOC em portadores de mutação no gene BRCA1 tem características clínicas particulares. Uma delas é o início do CM por volta dos 42 a 45 anos (MARCUS *et al.*, 1996; MARTIN *et al.*, 2001) e do câncer de ovário aproximadamente aos 54 anos (LI e FRAUMENI, 1969; MENKISZAK *et al.*, 1998).

Em relação a características histopatológicas, os tumores relacionados a mutações no gene BRCA1 são pouco diferenciados (grau 3), com contagem mitótica elevada e alta frequência de áreas necrosadas (VAN der GROEP *et al.*, 2008). Os tumores são frequentemente aneuplóides, apresentando alta frequência de invasão linfática, superexpressão da proteína p53 e um maior grau de pleomorfismo (Honrado *et al.*, 2005).

Esses aspectos apontam para um fenótipo mais agressivo (ARMES *et al.*, 1998; HONRADO *et al.*, 2005) que também é caracterizado por meio do aumento da proliferação celular e metástase, principalmente nos três primeiros anos após o diagnóstico. Observa-se também uma correlação fraca entre o tamanho do tumor, estado linfonodal e sobrevivência (DENT *et al.*, 2007).

As características imunofenotípicas dos cânceres de mama com mutação no gene BRCA1 incluem a baixa expressão do receptor de estrogênio alfa (ER α) (JOHANNSSON *et al.*, 1997; KARP *et al.*, 1997; ARMES *et al.*, 1999; EEROLA *et al.*, 2005), superexpressão do receptor de estrogênio beta (ER β) (LITWINIUK *et al.*, 2008) e baixa expressão do receptor de progesterona (PR) (ARMES *et al.*, 1999; EEROLA *et al.*, 2005).

Ainda não há diferenças entre os tratamentos para o CM e ovário de origem esporádica e hereditária. Entretanto, há evidências de que os tumores associados a mutações nos genes BRCA 1/2 apresentam resistência a taxanos (LAFARGE *et al.*, 2001; QUINN *et al.*, 2003). Por outro lado, há um alto nível de sensibilidade à derivados de platina e outros quimioterápicos que provocam quebras no DNA, refletindo assim o papel das proteínas BRCAs na reparação das quebras de fita dupla do DNA. (BYRSKI *et al.*, 2010; GOODWIN *et al.*, 2011). Além disso, ensaios clínicos vem demonstrando uma boa eficácia dos inibidores da polimerase PARPs, ou poli ADP (adenosina difosfato)-ribose em portadores de mutação com cânceres de mama e de ovário avançados (AUDEH *et al.*, 2010; TUTT *et al.*, 2010).

1.3 ESTRUTURA E FUNÇÃO DO GENE BRCA1 (Breast Cancer 1 gene)

O BRCA1 (OMIM: 113705) é um gene supressor tumoral situado no cromossomo 17 na posição q21 (17q21). Ele se estende por mais de 80 kb e está organizado em 22 éxons codificantes para uma proteína de 1.863 aminoácidos (HALL *et al.*, 1990; MIKI *et al.*, 1994). Três domínios do BRCA1 são importantes para a interação com outras proteínas, sendo um domínio RING-finger na região N-terminal e dois domínios BRCTs na região C-terminal localizados em tandem (Figura1).

Figura 1. Esquema da proteína BRCA1 evidenciando a posição do domínio RING finger, do sinal de localização nuclear e dos domínios BRCTs. As proteínas de interação com o BRCA1 estão demonstradas abaixo da região requerida para a associação. aa= aminoácidos. FONTE: Adaptado de Boulton, 2006.

O domínio RING-finger compreende aproximadamente os primeiros 100 aminoácidos e interage com a proteína BARD1 formando um complexo hetero-dimérico com atividade ubiquitina-ligase E3 (WU *et al.*, 1996; BOULTON *et al.*, 2006; OHTA *et al.*, 2011). Já os domínios BRCTs situados em tandem são formados por aproximadamente 100 aminoácidos cada e, além de serem capazes de transmitir os sinais gerados por danos ao DNA para a maquinaria de reparo e de direcionarem outras proteínas para seus respectivos complexos de reparo, eles são responsáveis pela interação direta com componentes de outros processos celulares (HUYTON *et al.*, 2000; GLOVER *et al.*, 2004; MOHAMMAD e YAFE, 2009).

O BRCA1 pode atuar em vários processos celulares como reconhecimento de danos no DNA, regulação na transcrição, regulação no ciclo celular, e principalmente no reparo do DNA (NAROD e FOULKES, 2004; FRIEDENSON, 2005). Esse envolvimento em todos esses processos celulares é devido a sua interação com várias proteínas através dos domínios BRCTs. Estes domínios se ligam especificamente a fosfopeptídeos contendo um resíduo de fosfoserina e outro de fenilalanina (WILLIAMS *et al.*, 2004; DRIKOS *et al.*, 2009). Dessa forma, a proteína BRCA1 interage com proteínas ativadoras e repressoras da transcrição, proteínas do ciclo celular e proteínas de reparo do DNA tais como as DNA helicase BACH1/FANCI, o fator CtIP, a proteína p300 e as proteínas Abraxas (DENG e BRODIE, 2000; YU *et al.*, 2003; MANKE *et al.*, 2003; HUEN *et al.*, 2010).

Uma série de estudos funcionais e estruturais têm proporcionado detalhes sobre o mecanismo de reconhecimento dos fosfopeptídeos empregado pelos domínios BRCTs. As duas repetições em tandem que apresentam estrutura semelhante, formam uma configuração head-to-tail que é característica de outras proteínas que também apresentam domínios BRCT envolvidas no reconhecimento de danos do DNA (WILLIAMS *et al.*, 2001; GLOVER *et al.*, 2004) (Figura 2).

Figura 2. Estrutura dos domínios BRCT do BRCA1 tipo selvagem complexado com um fosfopeptídeo. O domínio BRCT da região N-terminal está em verde, o domínio BRCT da região C-terminal está em marrom, a ligação entre os domínios em cinza e o fosfopeptídeo em azul. FONTE: Adaptado de Coquelle *et al.*, 2011.

O papel do BRCA1 no reconhecimento e no reparo do DNA é mais específico na resposta a quebras de fitas duplas no DNA (DSBs). Essas quebras são formadas não somente por exposição a agentes exógenos, como irradiação ou inibidores de topoisomerasas, mas também na vida natural de uma célula, em blocos da forquilha de replicação causados por adutos gerados em processos metabólicos. A proteína BRCA1 forma um complexo com outras proteínas que atuam no controle do ciclo celular e no reparo do DNA por meio da recombinação homóloga. Como descrito por Huen *et al.* (2010), em uma recente revisão, a proteína BRCA1 pode servir como uma proteína andaime para facilitar a localização dos fatores de reparo e coordenar a montagem e desmontagem de proteínas na quebra de fita dupla necessárias para um reparo eficiente. Além disso, o próprio recrutamento da proteína BRCA1 para os locais com dano no DNA ocorre através de uma complexa cascata envolvendo interações e modificações de proteínas (DOIL *et al.*, 2009). Assim, é compreensível que as células com mutações no BRCA1 que comprometam sua função de reparo estejam mais propensas a instabilidade genômica (WEBERPALS *et al.*, 2011).

A recombinação homóloga (RH) é um dos mecanismos predominantes no reparo das DSBs nas fases S e G2 do ciclo celular (BOULTON *et al.*, 2006), promovendo maior estabilidade genômica por meio de um reparo preciso das DSBs e de outras lesões que podem ocorrer durante o estresse da replicação celular. No entanto, alguns trabalhos já verificaram que o uso excessivo desse mecanismo de reparo pelas células pode também gerar instabilidade (MOYNAHAN e JASIN 2010; HICKS *et al.*, 2010; LIANG *et al.*, 2010).

A RH é iniciada por um processamento nucleolítico das DSB realizado pelo complexo de nucleases MRN e pela nuclease CtIP para gerar saliências de fita simples que são mantidas nesse estado pelas proteínas RPA e servem de substratos para a enzima recombinase RAD51.

Na presença de ATP, o complexo BRCA1-PALB2-BRCA2 auxilia o RAD51 a formar um filamento de nucleoproteína helicoidal de fita simples de DNA e catalisar a invasão da fita simples de DNA intacta em uma cromátide irmã doadora para formar uma molécula comum (holliday-junction molecule). Esta molécula atua como um primer para a síntese de DNA para estender o DNA heteroduplex levando ao reparo das DSB e a restauração da integridade do DNA (JEGGO, 1998; WEST *et al.*, 2000; BUISSON *et al.*, 2010; DAVIS e LIN, 2011) (Figura 3).

A colocalização de RAD51, BRCA1 e BRCA2 em focos nucleares significa que essas proteínas funcionam em conjunto nos processos de reparo do DNA (CHEN *et al.*, 1998). Além disso, o nível de expressão dessas três proteínas aumenta no início da fase S, indicando que a função desse complexo é exercida durante ou após a replicação do DNA (VAN der GROEP *et al.*, 2011).

Figura 3. Recombinação homóloga realizada pelo complexo de reparo BRCA1-PALB2-BRCA2. Em resposta a danos no DNA ocorre a formação de saliências de fita simples, por meio da atividade das nucleases MRN e CtIP, que servem de substratos para o RAD51. O complexo BRCA1-PALB2-BRCA2 ativa RAD51 a promover a invasão de uma fita simples não danificada para formação da Holliday junction, permitindo o reparo da quebra de fita dupla do DNA. RPA=Replication Protein A. PALB2= Partner and localizer of BRCA2. FONTE: Adaptado de Buisson *et al.*, 2010.

1.4 MODIFICAÇÕES PÓS-TRADUCIONAIS DO GENE BRCA1

Dois processos pós-traducionais que ocorrem na proteína BRCA1 merecem destaque: a ubiquitinação e a sumoilação.

A ubiquitinação, uma das modificações pós-traducionais do BRCA1, é o processo gradual pelo qual uma proteína alvo é modificada por ligação covalente de cadeias mono-Ub ou poli-Ub (WEISSMAN, 2001), para ser degradada por um proteossomo. Além disso, esse processo também pode direcionar proteínas para outros locais na célula para controle de outras proteínas e mecanismos celulares.

A ubiquitinação depende de ATP e é iniciada pela formação de uma ligação tiol-éster entre um resíduo de cisteína da enzima de ativação E1 e o resíduo C-terminal de glicina da ubiquitina (Ub). O segundo passo envolve a transferência de Ub da enzima E1 para a enzima de conjugação E2 através da formação de um novo tiol-éster. Finalmente, uma enzima E3 ligase catalisa a transferência de Ub para um resíduo de lisina na proteína alvo (BOULTON *et al.*, 2006; GALANTY *et al.*, 2009; MORRIS *et al.*, 2009) (Figura 4A). Portanto, como o heterodímero formado por BRCA1-BARD1 atua como uma ubiquitina-ligase E3, ele se torna capaz de transferir uma ubiquitina para uma proteína alvo. Alguns estudos indicaram que a heterodimerização BRCA1-BARD1 é importante também para a estabilidade das duas proteínas *in vivo* (BRZOVIC *et al.*, 2003).

Zhu *et al.* (2011), propõem que além de exercer um papel importante na regulação do ciclo celular e no reparo do DNA, a manutenção da integridade da heterocromatina via ubiquitinação da histona H2A também conta como uma das funções de supressor tumoral do gene BRCA1. Além disso, já foi verificado que a ubiquitinação de histonas não só afeta a estrutura da cromatina como também facilita o recrutamento de outros fatores responsáveis pela sinalização de dano ou reparo do DNA (BERGINK e JENTSCH, 2009).

Já o processo de sumoilação consiste na ligação covalente de uma família de pequenas proteínas denominadas SUMO a outras proteínas alvo com intuito de modificar a sua função. A sumoilação pode estar envolvida em vários processos celulares, como regulação da transcrição, apoptose, estabilidade da proteína, resposta ao estresse, e progressão do ciclo celular (HAY, 2005).

Há três formas conjugadas de SUMO: SUMO1, SUMO2 e SUMO3 (SUMO2 e SUMO3 diferem por apenas três aminoácidos, são consideradas funcionalmente equivalente, e são conhecidas como SUMO2/3). A sumoilação segue o mesmo requerimento enzimático da ubiquitinação ou seja, uma enzima de ativação E1 (SAE1/SAE2), uma enzima de conjugação E2 (Ubc9) e uma enzima de ligação E3 tais como PIAS1-4 e Polycomb2 (HAY, 2005; BERGINK e JENTSCH, 2009; MORRIS, 2010). Assim, um peptídeo C-terminal é clivado da proteína SUMO por uma protease (em humanos são as proteases SENP), usando ATP, permitindo assim a ligação de um resíduo de glicina C-terminal da SUMO e um resíduo de lisina na proteína alvo por uma enzima E3 (CHENG *et al.*, 2006) (Figura 4B). As PIAS sumoligases (E3) são necessárias na resposta a quebras duplas do DNA em mamíferos, pois são requeridas para a recombinação homóloga e influenciam o acúmulo de BRCA1 por meio do recrutamento de outras proteínas (MORRIS *et al.*, 2009).

Vialter *et al.* (2011), mostrou dados preliminares e argumentos a favor da conjugação entre SUMO-2/3 e o domínio RING e/ou o domínio BRCT da proteína BRCA1. Dependendo da linhagem celular, essa conjugação parece ser modulada pelo ciclo celular e pelo estresse oxidativo. Como conclusão do trabalho, a sumoilação pode afetar as vias de regulação do BRCA1 de várias maneiras, tais como na localização celular e no tráfico de proteínas-alvo, na antagonização do processo de ubiquitinação ou na estabilização de suas proteínas-alvo, e por aumentar ou diminuir as interações entre a proteína BRCA1 e outras proteínas.

Em fim, ambos os processos de modificações pós-traducionais de BRCA1 são reversíveis tornando-os ideais para fins regulatórios (BERGINK e JENTSCH, 2009).

Figura 4. Representação dos processos de ubiquitinação (acima) e sumoilação (abaixo). UBPs= proteases específicas de ubiquitina. ULPs= proteases específicas de proteína SUMO. FONTE: Adaptado de Bergink e Jentsch, 2009. O número aproximado das enzimas E1-E3, UBPs e ULPs estão entre parênteses.

1.5 TIPOS E PREVALÊNCIA DAS MUTAÇÕES NOS GENES BRCA1 E BRCA2

Mais de 1600 mutações distintas foram descritas no gene BRCA1 agrupadas no “Breast Cancer Information Core” (BIC); <http://research.nhgri.nihgov/projects/bic>. Todavia, os esforços para classificar os riscos de câncer associados a essas mutações têm sido dificultados pela falta do histórico familiar e dados clínicos precisos que liga mutações individuais à doença (COQUELLE *et al.*, 2011).

Desse total, observamos, qualitativamente, um amplo espectro de alterações que estão distribuídas como: mutações sinônimas, que consistem na troca de um nucleotídeo, mas não alteram o aminoácido codificado; mutações de sentido trocado (*missense*) que alteram um nucleotídeo ocasionando a substituição do aminoácido afetado; mutações de mudança de matriz de leitura (*frameshift*) como deleções e inserções que alteram a leitura do RNA; mutações sem sentido (*nonsense*) que consistem na troca de um nucleotídeo convertendo o códon afetado em um códon de terminação prematuro; e as mutações que afetam o processamento do RNA mensageiro (*splicing*) (Tabela 1).

As mutações que podem originar transcritos instáveis, alterar a leitura do RNA, afetar o processo de *splicing*, ou resultar na perda de domínios funcionais importantes da proteína são geralmente interpretadas como patogênicas, ou seja, mutações que causam perda de função da proteína (CHENEVIX-TRENCH *et al.*, 2006). Já as variantes neutras incluem as mutações que não alteram o aminoácido, as que ocorrem em regiões não codificantes e não afetam o processo de *splicing*, e também incluem as mutações em que ocorre a alteração de um aminoácido, entretanto tal alteração não tem efeito sobre a função da proteína. Rearranjos genômicos grandes foram identificados em famílias HBOC e representam uma pequena, mas significativa proporção de casos em várias populações. Essas mutações são normalmente patogênicas, já que deleções ou inserções de grandes seqüências genômicas nas regiões codificantes dos genes BRCA1 e BRCA2 geralmente levam a um peptídeo mutante de estrutura e/ou função anormal (PREISLER-ADAMS *et al.*, 2006). Grandes rearranjos genômicos de BRCA1 podem representar até um terço de todas as mutações causadoras de doenças em várias populações, enquanto grandes rearranjos genômicos no BRCA2 são menos freqüentes (HANSEN *et al.*, 2009).

As variantes mais difíceis de avaliar são as variantes *missense*. Cerca de 570 delas foram detectadas no gene BRCA1. No entanto, menos de 2% destas foram conclusivamente associadas ao câncer. Curiosamente, todas as mutações missense associadas a doença ocorrem dentro dos domínios da proteína, demonstrando a importância dessas regiões para a função de supressor tumoral do gene BRCA1 (COQUELLE *et al*, 2011).

Tabela 1 - Mutações nos genes BRCA1/2 descritas no HGMD (The Human Mutation Database)

Tipos	Número de mutações	
	BRCA1	BRCA2
Não-sinônima/Stop codon	381	270
Em sítios de splicing	95	58
Pequenas deleções	349	341
Pequenas inserções	120	126
In/dels	16	14
Grandes deleções	116	24
Grandes inserções/duplicações	22	8
Rearranjos complexos	15	6
Total	1114	847

A caracterização das mutações deletérias de alto ou baixo risco e das mutações neutras ou polimórficas, é sem dúvida o ponto-chave para determinar o significado clínico das mutações no gene BRCA1. A consulta de bancos de dados onde estão descritas e classificadas as mutações no gene BRCA1 é uma prática que auxilia sua caracterização. Um dos bancos mais consultados é o Breast Cancer Information Core (BIC) mutation database (<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>), cujo comitê revisa com frequência as mutações descritas na literatura e atualiza os índices de probabilidade de patogenicidade (GOLDGAR *et al.*, 2004). Assim, é possível definir a relevância clínica das mutações indicando se ela é patogênica, não-patogênica ou sem informação de patogenicidade. A segunda base de dados mais consultada é o Human Gene Mutation Database (HGMD) (STENSON *et al.*, 2009), que visa compilar a maioria das alterações gênicas responsáveis por doenças humanas hereditárias.

O HGMD foi criado originalmente para informar os efeitos das mutações na função dos genes (COOPER e KRAWCZAK, 1993). A terceira base de dados utilizada nesse trabalho foi o Universal Protein Resource (Uniprot) (CONSORTIUM, 2011), que se caracteriza pela alta qualidade e acesso livre das seqüências de proteínas e suas respectivas informações funcionais. Estas por sua vez, são derivadas de projetos de seqüenciamento do genoma. Ele contém uma grande quantidade de informações sobre a função das proteínas.

Os diferentes tipos de mutações encontradas no gene BRCA1 provocam diversas mudanças estruturais e funcionais da proteína. Assim, o amplo espectro de mutações encontradas nesse gene pode levar a diferentes fenótipos de cânceres (correlações genótipo-fenótipo) (THOMPSON e EASTON, 2002b).

Para saber sobre o significado clínico de uma variante, algumas informações devem ser consideradas, como: o tipo de mutação, a localização da mutação dentro do gene, a presença ou ausência da variante em uma população controle, o padrão de co-segregação da variante com a doença em membros da família afetados, a co-ocorrência da variante com uma mutação deletéria, o tipo de substituição do aminoácido, no grau de conservação do aminoácido entre as espécies e se possível ter acesso a análise bioquímicas ou funcionais (FRANK *et al.*, 2002; GOLDFAR *et al.*, 2004; TAVTIGIAN *et al.*, 2006).

Há poucas informações sobre a distribuição populacional das mutações nos genes BRCA1 (SZABO e KING, 1997; HAFFTY *et al.*, 2006; JOHN *et al.*, 2007). Esses estudos são mais restritos aos judeus Ashkenazi, por apresentarem um risco elevado de desenvolver a HBOC associada a mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 (2-4% das mulheres), principalmente as mutações 187delAG e 5385insC no gene BRCA1 e a 6184delT no gene BRCA2 (ODDOUX *et al.*, 1996; STRUEWING *et al.*, 1997; KING *et al.*, 2003).

1.6 PREDIÇÃO E AVALIAÇÃO DA PATOGENICIDADE DE MUTAÇÕES MISSENSE DO GENE BRCA1

Em situações em que há uma falta de dados clínicos e genéticos para classificar as variantes não-sinônimas do gene BRCA1, análises *in silico* e estudos funcionais específicos que avaliam propriedades bioquímicas da proteína podem contribuir com a classificação da variante como patogênica ou não (CARVALHO *et al.*, 2007; DOMCHEK e WEBER, 2008).

Uma forma de prever o impacto das mutações não-sinônimas na estrutura e função da proteína é aplicar abordagens computacionais para avaliar o efeito da mutação na estrutura primária e terciária das proteínas (HICKS *et al.*, 2011). Existem vários métodos computacionais disponíveis para a avaliação funcional dos efeitos das mutações não-sinônimas (NG e HENIKOFF, 2006; KARCHIN, 2009; JORDAN *et al.* 2010), sendo que muitos deles se baseiam em informações de homologia. Assim, a patogenicidade das mutações não-sinônimas pode ser avaliada a partir da conservação do aminoácido em um determinado resíduo após alinhamento múltiplo de sequências de aminoácidos (HICKS *et al.*, 2011). Entretanto, os programas computacionais tais como Align-GVGD (TAVTIGIAN *et al.* 2008), conseguem prever apenas o impacto e a probabilidade em favor da patogenicidade das mutações não-sinônimas que estão localizadas nos domínios da proteína BRCA1.

Em relação aos estudos funcionais, dois ensaios tem sido utilizado com frequência para o BRCA1: 1) o ensaio para verificar a ligação do BARD1 e a atividade de ubiquitina ligase, e 2) o ensaio de ativação da transcrição (TA). O primeiro ensaio proposto por Morris *et al.* (2006), mede o efeito das mutações, localizadas na região N-terminal (RING) do gene BRCA1, na interação entre os genes BRCA1 e BARD1 e entre o BRCA1 e Ubch5a (E2 enzima de conjugação da ubiquitina) (COUCH *et al.*, 2008). Enquanto que o segundo avalia a capacidade da região C-terminal (BRCT) funcionar como um domínio de transativação e sua integridade estrutural (VALLON-CHRISTERSSON *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2007).

Os ensaios podem ser realizados em células de leveduras e de mamíferos utilizando vetores de expressão (pLex9 e pcDNA3) codificando uma fusão DBD (DNA *binding domain*) dos resíduos 1396-1863 do BRCA1 (COUCH *et al.*, 2008). Variantes missense do BRCA1 associadas ao câncer apresentam perda de função com relação a atividade transcricional, enquanto variantes neutras mostraram atividade similar à proteína do tipo selvagem (CARVALHO *et al.*, 2007).

1.7 TESTE GENÉTICO PARA A SÍNDROME HEREDITÁRIA DE CÂNCER DE MAMA E/OU OVÁRIO

O diagnóstico molecular da HBOC é realizado com base em técnicas de biologia molecular para a detecção e caracterização das mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA2. O teste genético está indicado para todos os indivíduos com diagnóstico clínico ou suspeita diagnóstica da síndrome. Nos indivíduos afetados, ele permite avaliar a amplitude do fenótipo da doença, baseando-se no estudo de outras famílias com a mesma mutação. O teste genético pode também ser utilizado como método preditivo, principalmente naqueles casos assintomáticos considerados como de alto risco, para, em seguida, serem monitorados clinicamente. Assim, se uma mutação é detectada em mulheres saudáveis cujo histórico familiar apresenta mutações patogênicas no BRCA1 ou BRCA2, várias medidas preventivas podem ser oferecidas, incluindo a cirurgia profilática (ASCO, 2003).

Devido à complexidade dos procedimentos e do seu custo elevado, alguns questionários relacionados ao histórico familiar podem ser utilizados como ferramentas de identificação de indivíduos de alto risco para síndromes hereditárias de câncer de mama. Assim, o teste genético específico da Síndrome pode ser indicado afim de proporcionar o acompanhamento e manejo específico do indivíduo (ASHTON-PROLLA *et al.*, 2009).

1.8 A MUTAÇÃO R337H DO GENE TP53 E O CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO

O gene *TP53* (OMIM: 191170) está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13) e codifica uma fosfoproteína nuclear com 393 aminoácidos. É composto por onze éxons, sendo o primeiro deles não codificante. A sequência codificadora apresenta cinco domínios, sendo cada um responsável por uma função específica (MAY e MAY, 1999) (Figura 5).

O domínio inicial (aminoácidos 1 a 62) é denominado domínio de transativação. O segundo domínio, rico em resíduos de prolina (aminoácidos 63 a 97), é seguido da região central da p53 (aminoácidos 102 a 292), onde está contido o domínio de ligação ao DNA. Já foram descritas neste domínio mais de 90% das mutações somáticas, relacionadas aos cânceres esporádicos, e das mutações germinativas encontradas na Síndrome de Li-Fraumeni (SLF). O quarto domínio é o de oligomerização (aminoácidos 323 a 356), fundamental na configuração espacial da proteína p53, já que esta se une em tetrâmeros. Finalmente, o último domínio é o de regulação da transcrição (aminoácidos 363 a 393) (ACHATZ, 2008).

Figura 5. O gene TP53 e a proteína p53. (A): Representação dos éxons (cilindros) 1 a 11 do gene TP53; (B): Representação da proteína p53 e seus domínios. As diferentes cores correspondem aos domínios da proteína e seus respectivos éxons codificantes. FONTE: Adaptado de Achatz, M.I. 2008.

A proteína p53 exerce seus efeitos por meio do controle transcricional de genes específicos (ativação ou repressão), e por meio da formação de complexos com outras proteínas, sendo que mais de 400 proteínas que interagem com a p53 já foram descritas (STARK *et al.*, 2011). Esta proteína é ativada em resposta a várias formas de estresse celular exercendo funções antiproliferativas. Além disso, ela inibe o progresso do ciclo celular (checkpoint) e consequentemente, a multiplicação de células estressadas. Em muitos casos ainda promove a morte programada das células (apoptose) com a finalidade de conter o dano e proteger o organismo. Assim, o papel da proteína p53 é crítico no desenvolvimento do tumor, explicando por que é tão freqüentemente mutada em cânceres (VOGELSTEIN *et al.*, 2000).

Em 1990, a SLF foi associada a mutações germinativas no gene TP53 (MALKIN *et al.*, 1990). A SLF é uma síndrome hereditária de predisposição ao câncer, de alta penetrância, na qual portadores de mutações patogênicas no gene TP53 apresentam um risco cumulativo vital de até 90% para o desenvolvimento de um amplo espectro de cânceres diagnosticados geralmente antes dos 45 anos. Os tipos de cânceres mais freqüentes incluem câncer da mama, tumores cerebrais e carcinomas adrenocorticais, entretanto outros cânceres também são observados em uma menor freqüência, tais como linfomas, câncer de pulmão, câncer gástrico e melanoma (LI e FRAUMENI, 1969; NICHOLS *et al.*, 2001; BIRCH *et al.*, 2001). Famílias que não apresentam o fenótipo clássico da síndrome são denominadas Li-Fraumeni like (LFL) ou Li-Fraumeni variante (EELES, 1995; CHOMPRET *et al.*, 2002). Mutações germinativas do TP53 foram encontradas em aproximadamente 77% da SLF clássica e entre 40% a 20% das famílias com LFL (VARLEY *et al.*, 1997).

Mulheres com histórico pessoal de CM que se enquadram nos critérios diagnósticos da HBOC também podem se enquadrar nos critérios para o teste genético de LFL segundo dois critérios de Chompret do NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology v.1.2011.

O primeiro consiste de um indivíduo com CM diagnosticado antes dos 36 anos com no mínimo um parente de primeiro ou segundo grau com sarcoma, tumor cerebral ou carcinoma adrenocortical diagnosticado antes dos 46 anos ou com um parente com múltiplos cânceres primários em qualquer idade. Já o segundo se refere ao indivíduo com tumores primários múltiplos, sendo dois deles cânceres de mama diagnosticados antes dos 36 anos de idade, independente da história familiar.

Em estudo realizado recentemente foi possível determinar o padrão e prevalência de mutações germinativas no gene TP53 analisando 45 famílias brasileiras que preencheram os critérios diagnósticos da SLF (ACHATZ *et al.*, 2007). O estudo descreveu uma alta prevalência da mutação germinativa R337H localizada no éxon 10, na região do domínio de oligomerização da proteína p53. Essa mutação é responsável pela troca de uma arginina por uma histidina (R337H - CGC para CAC) no códon 337, e foi primeiramente associada com tumores adrenocorticais em crianças (ACT) (LATRONICO *et al.*, 2001; FIGUEIREDO *et al.*, 2006). Entretanto, ao verificarem o perfil tumoral de seis famílias portadoras dessa mutação Achatz *et al.* (2007), encontraram um total de 56 tumores confirmados histologicamente, sendo que 30,4% eram câncer de mama, 10,7% sarcomas de tecido mole, 10,7% tumores cerebrais, 8,9% carcinomas adrenocorticais e 8,9% cânceres de estômago. Além disso, em uma amostra de adenocarcinoma ductal invasivo de mama, foi verificada que a mutação R337H estava em homozigose no tecido tumoral e em heterozigose no sangue periférico, sugerindo um papel importante no desenvolvimento deste tumor.

Assumpção *et al.* (2008), analisaram 123 mulheres com histórico de CM, sendo 45 do tipo hereditário e 78 do tipo esporádico, e também verificaram a associação da mutação R337H com o CM em famílias LFL no Sul do Brasil. O estudo também sugere que tal mutação parece desempenhar um papel na tumorigênese do CM.

Como já dito anteriormente, a mutação germinativa R337H ocorre no domínio de oligomerização, composto por uma alfa-hélice responsável por essa função. A p53 liga-se ao DNA na forma de tetrâmero (McLURE e LEE, 1998). O contato das alfa-hélices de dois monômeros adjacentes é fundamental para a estabilidade do oligômero e, conseqüentemente, para a ligação de p53 a outras proteínas responsáveis pela supressão tumoral. O resíduo R337 é responsável por um destes contatos (Figura 6). Segundo Achatz (2008), o radical NH₂ da cadeia lateral da arginina doa um próton ao resíduo D352 da alfa-hélice do monômero de p53 adjacente, formando uma ponte de hidrogênio estável (Figura 6A). A substituição de uma arginina por uma histidina não altera este contato, pois esta também contém radicais NH₂ livres (Figura 6B). Entretanto, como a histidina possui pK_a inferior à arginina, em condições de pH aumentado (pH 8,3), ocorre sua desprotonação tornando-a incapaz de formar uma ponte de hidrogênio. Conseqüentemente, o oligômero tende a se desfazer, impedindo a ligação da proteína ao DNA (Di GIAMMARINO *et al.*, 2002) (Figura 6C).

Figura 6. Mutação R337H no gene TP53. A) Resíduo R337- radical NH₂ da cadeia lateral da arginina. B) Troca de uma arginina por uma histidina no resíduo R337. C) Troca de uma arginina por uma histidina no resíduo R337 com alteração de pH. FONTE: Adaptado de Achatz, M.I. 2008.

Assim, a substituição R337H é um exemplo de mutação que afeta as características bioquímicas da p53, favorecendo sua inativação frente ao aumento de pH.

O complexo de reparo formado pelas proteínas BRCA1, BRCA2, BARD1 e RAD51 atua em conjunto com a proteína p53 na resposta ao dano do DNA. A formação desse complexo é precedido pela fosforilação de BRCA1 pela quinase ATM. Em resposta ao dano no DNA, o complexo é direcionado para regiões cromossômicas submetidas a replicação do DNA que são marcadas pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Quando não há alteração em nenhum dos genes envolvidos, o dano no DNA é reparado e o ciclo celular continua normalmente. Já quando um dos genes de reparo está alterado, com sua função comprometida, as quebras de fita dupla do DNA não são reparadas e o p53 atua preferencialmente no processo de apoptose. Entretanto quando o gene p53, crítico para o checkpoint do ciclo celular, também está com sua função comprometida devido a alguma mutação, o gene p21 pode não ser ativado ocasionando assim a proliferação e a invasão celular (Figura 7).

Estudos em camundongos já verificaram que a inativação concomitante dos genes BRCA1 e TP53 em células epiteliais da superfície do ovário resultou em uma proliferação celular aumentada quando comparado a inativação de ambos os genes isoladamente (CLARK-KNOWLES *et al.*, 2007). Além disso, estudos em camundongos *knockout* sugerem que a perda do BRCA1 em células mamárias levam a proliferação incompleta, apoptose e a formação tumores numa frequência relativamente baixa. Nesses camundongos, a adição de uma mutação em heterozigose no gene p53 acarretou em uma frequência significativamente maior de tumores (XU *et al.*, 1999).

Dessa forma, é possível que mutações no gene TP53, incluindo a R337H em combinação com outras mutações no gene BRCA1 potencializem a deficiência do complexo de reparo aumentando a suscetibilidade tumoral.

Figura 7. O papel dos genes BRCA1 e BRCA2 no reparo do DNA. A) Complexo de reparo normal formado pelas proteínas BRCA1, BRCA2, BARD1 e RAD51 atuando no reparo eficaz do dano ao DNA. B) Perda da função do complexo de reparo pela deficiência do gene BRCA1 e/ou BRCA2 (indicado por linhas pontilhadas) levando à incapacidade de reparo do DNA danificado. Quando o gene TP53 está com sua função normal, a célula é induzida ao processo de apoptose, mas se o gene p53 está com sua função comprometida, ocorre a proliferação celular. FONTE: Adaptado de Arnold e Goggins, 2001.

Como parte das atividades científicas ligadas ao Ambulatório de Aconselhamento Genético do Câncer (AAGC) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP/USP), o presente estudo relata os resultados da análise de mutações germinativas no gene BRCA1 em famílias da região de Ribeirão Preto com suspeita de HBOC e atendidas no AAGC. Adicionalmente, devido ao fato de alguns critérios de HBOC se sobreporem aos critérios da LFL, a mutação R337H do gene TP53 também foi analisada nessas famílias por apresentar frequência elevada em pacientes com câncer de mama da região sul do Brasil e por esse gene ser um membro importante da via gênica do gene BRCA1. Em resumo, o estudo dará uma contribuição importante na caracterização molecular da HBOC no Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Identificar e caracterizar as mutações germinativas no gene BRCA1 em pacientes com suspeita de Síndrome Hereditária de Câncer de Mama e/ou Ovário provenientes do Ambulatório de Aconselhamento Genético do Câncer do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto da FMRP/USP selecionadas para o teste genético.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Rastrear mutações no gene BRCA1 através da técnica de HRM (High Resolution Melting), seguido do sequenciamento dos casos com curva de melting anormal.
- Rastrear grandes deleções e duplicações de regiões do gene BRCA1 usando a técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) nos pacientes com resultado negativo para mutações patogênicas.
- Identificar a composição de haplótipos com base nas mutações rastreadas no gene BRCA1 e estabelecer a frequência dos mesmos nos grupos de pacientes e controles sadios.
- Rastrear a mutação R337H no gene TP53 como informação adicional da causa do câncer de mama.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de 41 pacientes atendidas no AAGC do HCFMRP-USP. Para participar do teste genético, as pacientes preencheram os critérios do NCCN *Clinical Practice Guidelines in Oncology* v.1.2010 aplicado a HBOC. Durante a consulta do aconselhamento genético, todas concordaram em participar da pesquisa assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 1).

Para a análise de haplótipos, foram retiradas 8 das 41 pacientes em que foi realizado a investigação de mutações em todo gene BRCA1. Isso devido ao fato de algumas delas não apresentarem história pessoal de câncer de mama e/ou ovário ou por apresentarem outro membro da família já incluído na análise. Além disso, foram incluídas mais 12 pacientes com história pessoal de câncer de mama e/ou ovário. Assim, para a análise de haplótipos foram utilizadas 45 amostras de pacientes com suspeita de HBOC e 82 amostras de doadoras do Centro Regional de Hemoterapia de Ribeirão Preto do HCFMRP-USP. As amostras foram pareadas na proporção de aproximadamente dois controles para cada paciente de acordo com sexo, idade e etnia. De cada indivíduo, foi coletado 10 ml de sangue periférico em tubo contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. Após a extração de DNA, as amostras foram numeradas (para garantir o sigilo) e armazenadas no banco de amostras mantido pelo Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

3.2 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto FMRP/USP, processo número HCRP 4684/2010. As amostras coletadas foram usadas somente para o estudo em questão.

3.3 ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE BRCA1

3.3.1. EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico foi extraído de 10 mL de sangue periférico utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, EUA) obedecendo as instruções recomendadas pelo fabricante. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 260 nm (NanoDrop ND1000) e a qualidade do DNA foi checada em gel de agarose 1,5%. Os DNAs foram diluídos e utilizados para as reações de PCR na concentração de 100 ng/μL.

3.3.2. REAÇÃO DA CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A reação de PCR foi utilizada para estabelecer as condições ideais requeridas para a técnica de HRM. Nesse caso, a temperatura de anelamento é o parâmetro mais importante na análise.

Para o gene BRCA1 foram utilizados 43 pares de primers capazes de amplificar os 22 éxons codificantes do gene. As sequências dos primers foram as mesmas descritas por Leeneer *et al.* (2008).

Esses primers foram desenhados com base na sequência do gene disponível no banco de dados GenBank (número de acesso: NM_007294.3) e o tamanho máximo estabelecido dos fragmentos foi de 340 pb. No Anexo 1 podem ser vistos as sequências dos primers e o tamanho dos fragmentos gerados.

As amplificações foram realizadas com um volume total de 25 µL contendo 10,3 µL de água miliQ, 2,5 µL de tampão 10X ((NH₄)₂SO₄ 2M, Tris-HCl 2M, MgCl₂ 1M e Tween 20 a 1%), 2 µL de dNTP a 2,5 mM, 1,5 µL para cada primer a 2,5pmoles/ µL, 0,2 µL de Taq DNA Polimerase a 1U (Biotools, Madri, Espanha) e 2 µL de DNA. Os parâmetros de amplificação foram: 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de 94°C por 35 segundos, temperatura de anelamento por 40 segundos e 72°C por 40 segundos. Por fim, uma extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.3.3 HIGH RESOLUTION MELTING (HRM)

O método de *High Resolution Melting* vem sendo amplamente usado para triagem de mutações em substituição a outros métodos de triagem como o SSCP, DGGE e DHPLC (GUNDRY *et al.*, 2003). O procedimento consiste da PCR seguida da análise da curva de *melting* do fragmento de DNA amplificado. O HRM detecta variações da curva de “melting” causadas por mutações pontuais. Assim, as amostras que apresentaram padrão de melting diferente da curva normal foram sequenciadas para validar e caracterizar a mutação.

Nesse estudo foi utilizado o corante *MeltDoctor* (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA), um intercalante saturado de DNA cuja intensidade máxima de fluorescência (100%) é registrada quando todo DNA está em fita dupla. A medida que a temperatura aumenta, a fluorescência é diminuída devido a dissociação da fita de DNA.

Quando a intensidade de fluorescência atinge 50%, significa que 50% da fita está dissociada.

Este é o ponto ideal para detectar variações de melting causadas por mutações (Figura 8).

Figura 8. Esquema ilustrando a temperatura ideal para detecção de variações na temperatura de *melting* causada por mutações.

O perfil da curva de melting depende principalmente do conteúdo GC e do tamanho do fragmento de DNA analisado. Os indivíduos heterozigotos apresentam um padrão distinto na forma e no deslocamento da curva de melting comparada a dos homozigotos, devido a formação dos heteroduplexes após a renaturação do DNA durante a reação da PCR. Já os indivíduos homozigotos mutantes são detectados apenas pelo deslocamento da curva de *melting* causado pela base mutante (LEENEER *et al.*, 2008) (Figura 9).

Figura 9. Perfil da curva de melting de indivíduos homozigotos selvagens (curva de *melting* em vermelho), heterozigotos (curva de *melting* em azul) e homozigotos mutantes (curva de *melting* em verde) referente a região amplificada do éxon 13 contendo a mutação Ser1436Ser.

As reações foram realizadas com um volume total de 20 µL contendo, 3,6 µL de água miliQ, 1,2 µL de cada primer a 5 pmoles/ µL, 10 µL de MeltDoctor HRMTM Master Mix (Applied Biosystems) e 4 µL de DNA a 5ng/ µL. Os parâmetros de amplificação foram: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e temperatura de anelamento por 1 minuto. Em seguida, para a análise da curva de melting, os parâmetros foram: 95°C por 10 segundos, 60°C por 1 minuto, 95°C por 15 segundos e 60°C por 15 segundos.

3.3.4. SEQUENCIAMENTO DE DNA

Os fragmentos que apresentaram variação da curva de melting em relação ao padrão normal foram sequenciadas no sequenciador automático 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Na reação de sequenciamento foram usados: 1 a 2 µL de DNA amplificado, 2 µL de Big Dye Terminator v3.1 Cycle 2 µL de 5X Sequencing Buffer (Applied Biosystems), 1 µL de primer e água em quantidade suficiente para completar 10 µL. Os parâmetros de amplificação da reação de sequenciamento foram: 95°C por 1 minuto, seguido de 25 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos cada.

3.3.5. MULTIPLEX LIGATION-DEPENDENT PROBE AMPLIFICATION (MLPA)

O kit utilizado nesse estudo foi o SALSA MLPA KIT P087-B1 BRCA1 (Mrc-Holland, Amsterdã, Holanda), composto por 36 sondas (Anexo 2) que geraram fragmentos de 130 pb a 454 pb, divididas em 10 sondas referências, 2 sondas para a região promotora, 1 sonda para o éxon 1 não codificante e 23 sondas para os 22 éxons codificantes do gene BRCA1 (2 sondas para o éxon 13 e 1 sonda para os demais éxons). Para essa metodologia, as amostras de DNA foram utilizadas em uma concentração de 200 ng (5µl de DNA a 40ng/ µl).

A reação de MLPA consiste na utilização de sondas compostas de dois oligonucleotídeos (A e B) localizados muito próximos e complementares a uma sequência alvo no gene. Além desta região de hibridação, as sondas possuem regiões complementares a um par de oligonucleotídeos iniciadores marcados com o fluoróforo FAM (estes oligonucleotídeos marcados são os mesmos para todas as sondas de todos os kits oferecidos pela MRC Holland, podendo variar o fluoróforo) e uma sequência coringa, que é específica para cada sonda e diferencia os fragmentos amplificados por tamanho. Quando as sequências alvo estão presentes na amostra, os oligonucleotídeos A e B se hibridam para posteriormente serem conectados pela enzima Ligase-65. Somente as sondas já ligadas são amplificadas por PCR, cada uma gerando um produto de tamanho único (Figura 10).

3.3.5.1 – Denaturação do DNA e hibridização com sondas SALSA MLPA

O DNA genômico foi diluído, aquecido a 98°C e resfriado a 25°C. Em seguida foi adicionado o SALSA probe mix e o tampão de MLPA em cada tubo. A mistura foi cuidadosamente homogeneizada e incubada a 95°C por 1 minuto e 17 horas a 60°C no termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Figura 10A e B).

3.3.5.2 – Reação de Ligação

Após a denaturação, a temperatura do termociclador foi reduzida a 54°C. Em seguida, 32 µl do mix Ligase-65 foram acrescentados a cada amostra, com posterior ressuspensão. O mix Ligase é composto de 3 µl de Ligase-65 buffer A, 3 µl Ligase-65 buffer B, 25 µl de H₂O e 1 µl Ligase-65. O ciclo para a reação de ligação foi de 54°C por 15 minutos e a 98°C por 5 minutos (Figura 10C).

3.3.5.3 – Reação da PCR Multiplex

Finalmente, 10 µl da reação de ligação de MLPA, juntamente com 4 µL do tampão SALSA PCR 10X e 26 µl de H₂O, foram transferidos para termociclador a 60°C. Em seguida, 10 µl de Mix Polymerase foram acrescentados a cada tubo, para assim iniciar a reação da PCR com parâmetro de ciclagem de 30 segundos a 95°C; 30 segundos a 60°C e 60 segundos a 72°C por 35 ciclos, seguido de 72°C por 20 minutos (Figura 10D).

O mix Polymerase é composto de 2 µl de SALSA PCR-primers, 2 µl SALSA Enzyme Dilution buffer, 5,5 µl de H₂O e 0,5 µl de SALSA Polymerase.

As diferenças nos valores relativos de amplificação são devido a variação no tamanho ou área dos picos de amplificação entre amostras de pacientes e controles negativos. Segundo o protocolo da MRC-Holland, cada placa de MLPA deve conter no mínimo três DNAs controle. Além dos controles externos, cada kit contém seus controles internos que consistem de sondas que hibridam a regiões cromossômicas diferentes: uma para o cromossomo X e outra para o cromossomo Y e controles de quantidade e denaturação do DNA: fragmentos-Q e fragmentos-D, respectivamente. Os quatro fragmentos-Q (64, 70, 76 e 82 nt) estão presentes em todos os kits de MLPA e não dependem da ligação de sondas, assim, seus picos maiores que a metade do tamanho dos picos dos fragmentos-D e das sondas de MLPA é indicativo de uma quantidade de DNA insuficiente ou falha na reação. Os fragmentos-D, presentes na maioria dos kits, são três sondas dependentes de ligação (88, 92 e 96 nt) como qualquer outra do kit de MLPA. Sendo assim, seus picos devem ser de tamanho semelhante ao das outras sondas do kit, indicando que o DNA foi devidamente denaturado e houve ligação das sondas.

Figura 10: Na Parte I: Representação esquemática das sondas de MLPA. Para cada região a ser analisada são desenhadas duas sondas: a esquerda e a direita que se anelam de maneira adjacente. Cada sonda tem a região que é reconhecida por primers universais. A sonda direita tem uma sequência denominada coringa que varia de tamanho diferenciando os pares de sonda e permitindo a visualização dos fragmentos por eletroforese capilar. Na Parte II: A) Oligonucleotídeos sintéticos que compõem o kit P087-B1 e DNA genômico; B) Hibridização adjacentes dos pares de sondas de MLPA nas sequências alvo; C) Reação de Ligação onde ocorre a união das sondas adjacentes com a enzima ligase; D) Reação de PCR Multiplex: amplificação com primers universais gerando 36 fragmentos de tamanhos diferentes, onde somente o primer direto é marcado com o corante FAM; E) Separação por eletroforese Capilar dos fragmentos únicos amplificados. FONTE: Adaptado de Coeli, F.B. 2009.

3.3.5.4 - Separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar

Os produtos da PCR foram identificados utilizando o equipamento 3500 XL Genetic Analyser (Applied Biosystem), com filtros de fluorescência específicos, seguindo o protocolo desenvolvido por MRC-Holland v31; 17-6-2007.

Posteriormente à reação da PCR foram misturados às amostras 0,7 µl da reação de PCR, 0,2 µL de 500 LIZ, 9,1 µl Formamida Hi-Di. A leitura foi realizada no equipamento de eletroforese capilar 3500 XL Genetic Analyzer com 24 capilares. Os tamanhos dos fragmentos foram visualizados utilizando o Software GeneScan (Applied Biosystem) (Figura 10E).

3.3.5.5 – Análise dos dados obtidos por MLPA

Foi utilizado o software Coffalyser MLPA DAT (<http://www.mrc-holland.com.>), desenvolvido e recomendado pelo fabricante especialmente para a análise de várias amostras. Este software foi desenvolvido numa planilha de Excel e é constantemente atualizado, podendo ser obtido gratuitamente na página de internet da empresa. Tecnicamente, os dados foram normalizados dividindo a área do pico de cada sonda pela soma dos picos de todas as sondas na amostra. Em seguida, esse valor normalizado foi dividido pela área do pico da sonda correspondente, obtida a partir do DNA controle. Quando houver a presença de deleções e duplicações em heterozigose, os valores devem ser de aproximadamente 0,5 e 1,5, respectivamente, se comparados com o valor normal de 1,0.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A distribuição das mutações incluídas na análise de haplótipos foi avaliada por meio do desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg e o teste do qui-quadrado ($p < 0,05$) utilizando o programa GENEPOP (RAYMOND e ROUSSET, 1995). A associação dos genótipos e alelos de cada mutação polimórfica foi avaliada pelo software GraphPad Prism 5, usado para calcular odds ratio (OR) e intervalos de confiança de 95% (ICs).

O programa Haplo.stats (versão 1.4; cran.r-project.org/web/packages/haplo.stats/index.html) foi utilizado para identificar e estimar a frequência dos haplótipos, baseado em estimativas de máxima verossimilhança. O software calcula ainda a associação de cada haplótipo específico com a doença (SCHAID *et al.*, 2002), sendo o valor de $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo. Apenas haplótipos com frequência maior que 1% foram aceitos nesta análise. A correção de Bonferroni foi utilizada após os cálculos de associação entre os haplótipos e o câncer de mama e/ou ovário.

4. RESULTADOS

As 41 pacientes pertencem a 37 famílias distintas e os critérios de inclusão de cada paciente podem ser vistos no Apêndice 2. A maioria dessas pacientes tem história pessoal de câncer de mama (76%) ou ovário (12%). Das pacientes com história pessoal de câncer, 58% não possuem histórico familiar dos cânceres frequentes na HBOC. Além disso, 12% das pacientes apresentam apenas histórico familiar de câncer de mama e/ou ovário.

4.1. AMPLIFICAÇÃO DO GENE BRCA1 POR PCR

Inicialmente a PCR foi usada para a padronização das temperaturas de anelamento dos 43 pares de primers antes de serem analisadas pelo método de HRM. Os produtos das PCRs foram verificados por eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,5% (Figura 11).

Figura 11. Gel de agarose representativo da qualidade dos produtos da PCR referentes a amplificação do fragmento de 201 bp do éxon 18 do gene BRCA1. M= marcador de peso molecular. B = branco.

4.2. DETECÇÃO DE MUTAÇÕES POR HRM

O rastreamento das mutações pelo método de HRM e sequenciamento de DNA identificou um total de 19 mutações no gene BRCA1, sendo 10 mutações *missense*, 4 mutações sinônimas, 4 mutações intrônicas e uma deleção de um aminoácido (Tabela 2; Apêndice 2). O estudo descreveu pela primeira vez a mutação Val1117Ile (Figura 12).

Tabela 2 - Mutações encontradas no gene BRCA1

Designação	Exon	Nucleotídeo	Base Trocada	Aminoácido Trocado	Tipo de mutação	Pacientes acometidas (%)
IVS7-34C>T		26456	C>T		IVS	13 (32)
IVS8-57delT		29023	del T		IVS	7 (17)
Gln356Arg	11	31906	A>G	Gln→Arg	M	2 (5)
Ser616del	11	32684-32686	del TCT		IFD	1 (2)
Asp693Asn	11	32916	G>A	Asp→Asn	M	2 (5)
Ser694Ser	11	32921	C>T		Syn	22 (54)
Leu771Leu	11	33150	T>C		Syn	19 (46)
Pro871Leu	11	33451	C>T	Pro→Leu	M	26 (63)
Glu1004Glu	11	33851	G>A		Syn	1 (2)
Glu1038Gly	11	33952	A>G	Glu→Gly	M	21 (51)
Ser1040Asn	11	33958	G>A	Ser→Asn	M	5 (12)
Val1117Ile	11	34188	G>A	Val→Ile	M	1 (2)
Ser1140Gly	11	34257	A>G	Ser→Gly	M	2 (5)
Lys1183Arg	11	34387	A>G	Lys→Arg	M	20 (49)
Ser1436Ser	13	43917	T>C		Syn	20 (49)
Ser1613Gly	16	55292	A>G	Ser→Gly	M	20 (49)
Met1652Ile	16	55412	G>A	Met→Ile	M	2 (5)
IVS17-53C>T		62366	C>T		IVS	3 (7)
IVS21+15G>C		75322	G>C		IVS	1 (2)

IVS = sequência interferente (*intervening sequence*); M = mutação com troca de sentido (*missense*); Syn = mutação sinônima (*synonymous*); IFD = mutação por deleção sem mudança na pauta de leitura (*in frame deletion*). A mutação descrita pela primeira vez em nosso estudo está destacada em negrito.

No éxon 11 do gene BRCA1, foram detectadas a maior parte das mutações, sendo 10 mutações do tipo missense, 3 mutações do tipo sinônima e uma mutação do tipo deleção *in frame* onde uma serina é deletada sem alteração na matriz de leitura. Sete mutações ocorreram com frequência superior a 40%, sendo três do tipo sinônima (**Ser694Ser**, **Leu771Leu** e **Ser1436Ser**) e quatro não-sinônimas (**Pro871Leu**, **Glu1038Gly**, **Lys1183Arg** e **Ser1613Gly**). Destas, duas atingiram frequência acima de 50% (**Pro871Leu** e **Glu1038Gly**).

Figura 12. A) Curvas de melting específicas para cada genótipo identificado no éxon 11 do gene BRCA1. B) Representação esquemática da região amplificada do éxon 11 contendo a mutação Val117Ile; B1) Resultado do sequenciamento de uma amostra com genótipo normal (curvas de melting em azul); B2) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Val117Ile em heterozigose (curva de melting em roxo).

As figuras 12 e 13 exemplificam as abordagens usadas para o rastreamento das mutações no gene BRCA1 pelo método de HRM seguido do sequenciamento de DNA. No caso da figura 13, as múltiplas curvas de melting são devidas as combinações entre os genótipos relativos as duas mutações presentes no mesmo fragmento analisado (Figura 13B). Os resultados de HRM e sequenciamento de DNA das outras mutações descritas na Tabela 2 podem ser consultadas no Apêndice 3.

Figura 13. Abordagem usada para identificação das mutações no gene BRCA1. A) Representação esquemática da região amplificada do exon 16 contendo as mutações Ser1613Gly e Met1652Ile. B) Curvas de *melting* específicas para cada associação de genótipos identificados. C) Resultado do sequenciamento das amostras com genótipos A/G, G/A e G/G, G/A.

Em algumas situações o método de HRM não foi eficiente para identificar as mutações. Por exemplo, a deleção de uma timina (IVS8 -57delT) em uma sequência de sete timinas (T₇) no íntron 9, presente em 10 pacientes (Figura 14), só foi identificada pelo sequenciamento de DNA.

Figura 14. A) Curvas de melting específicas para ambos os genótipos não diferenciados no íntron 9 do gene BRCA1. B) Representação esquemática da região amplificada do íntron 9 contendo a mutação IVS7-34C>T; B1) Resultado do sequenciamento de uma amostra com genótipo normal (curvas de melting em verde); B2) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação IVS7-34C>T em heterozigose (curva de melting em verde).

Em outro exemplo, contendo mais de uma mutação no mesmo fragmento analisado, o HRM não diferenciou o genótipo de indivíduos normais (A/A) e indivíduos heterozigotos (A/G) para a mutação Glu1038Gly. Nesse caso, o padrão das curvas de melting de cada genótipo eram idênticas (Figura 15), sendo discriminadas apenas por sequenciamento de DNA.

Figura 15. A) Curvas de melting específicas para cada genótipo identificado no éxon 11 do gene BRCA1. B) Representação esquemática da região amplificada do éxon 11 contendo as mutações Glu1038Gly e Ser1040Asn; B1) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Glu1038Gly em homozigose (curvas de melting em roxo); B2) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Ser1040Asn em heterozigose (curvas de melting em verde); B3) Resultado do sequenciamento de uma amostra com ambas as mutações, Glu1038Gly e Ser1040Asn, em heterozigose (curvas de melting em vermelho); B4) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Glu1038Gly em heterozigose (curvas de melting em azul); B5) Resultado do sequenciamento de uma amostra com genótipo normal (curvas de melting em azul). Os dois últimos grupos não foram distinguidos pela técnica de HRM (ambos representados pela curva de melting em azul).

4.2.1 SIGNIFICADO CLÍNICO DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS

Após a identificação das mutações não-sinônimas e da deleção *in frame*, três bancos de dados foram consultados afim de verificar a prévia descrição das mutações e seus respectivos significados clínicos (Tabela 3). A mutação Ser616del foi caracterizada como patogênica apenas na base de dados HGMD. No UNIPROT não há informação sobre a mutação, enquanto que no BIC a patogenicidade da mutação é desconhecida.

Tabela 3 - Significado clínico das mutações no gene BRCA1 de acordo com BIC, HGMD e UNIPROT

Mutações	Importância Clínica			Referências
	BIC	HGMD	UNIPROT	
Gln356Arg	?	?	Polimorfismo	Schoumacher <i>et al.</i> , (2001), Friedman <i>et al.</i> , (1994)
Ser616del	?	Patogênica	----	Ellis <i>et al.</i> , (2000)
Asp693Asn	Não-patogênica	?	Polimorfismo	Durocher <i>et al.</i> , (1996), Claes <i>et al.</i> , (2004)
Pro871Leu	Não-patogênica	----	Polimorfismo	Seo <i>et al.</i> , (2004)
Glu 1038Gli	Não-patogênica	?	Polimorfismo	Goumenou <i>et al.</i> , (2003), Seo <i>et al.</i> , (2004)
Ser1040Asn	?	?	Polimorfismo	Friedman <i>et al.</i> , (1994), Claes <i>et al.</i> , (2004)
Val1117Ile	----	----	----	Descrita no presente estudo
Ser1140Gli	?	----	Polimorfismo	
Lis1183Arg	Não-patogênica	----	Polimorfismo	(Seo <i>et al.</i> , 2004)
Ser1613Gli	Não-patogênica	?	Polimorfismo	Majdak <i>et al.</i> , (2005), Zhi <i>et al.</i> , (2002)
Met1652Ile	?	?	Polimorfismo	Schoumacher <i>et al.</i> , (2000), Deffenbaugh <i>et al.</i> , (2002)

? = sem informação sobre patogenicidade. BIC (Breast Cancer Information Core), HGMD (Human Gene Mutation Database) e UNIPROT (Universal Protein Resource).

4.3. ANÁLISE POR MLPA

Considerando que 10% das mutações no gene BRCA1 são grandes deleções, as 41 amostras foram analisadas pelo método de MLPA, amplamente usado para caracterização de duplicações e deleções no DNA. Por meio dessa técnica, foi possível diagnosticar uma paciente com deleção nos éxons 16 e 17 (Figura 16) e uma paciente com deleção no éxon 19 (Figura 17). Esta última, foi descrita em famílias da Dinamarca de alto risco para HBOC (Hansen *et al.*, 2009). O resultado de sete amostras não foram conclusivos, devido a má qualidade do DNA. As restantes, de 32 pacientes, foram negativos para deleção em regiões do gene BRCA1 (Figura 18).

Figura 16. MLPA realizado com o kit SALSA MLPA KIT P087-B1 BRCA1 e com 200 ng de DNA evidenciando uma amostra com a presença de deleção em heterozigose dos éxons 16 e 17.

Figura 17. MLPA realizado com o kit SALSA MLPA KIT P087-B1 BRCA1 e com 200 ng de DNA evidenciando uma amostra com a presença de deleção em heterozigose do éxon 19.

Figura 18. MLPA realizado com o kit SALSA MLPA KIT P087-B1 BRCA1 e com 200 ng de DNA evidenciando uma amostra sem a presença de deleções ou duplicações.

4.4. ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS

Um haplótipo pode ser definido como um conjunto de marcadores genéticos, localizados em uma região cromossômica com baixa taxa de recombinação, que segregam juntos. No presente estudo, o haplótipo analisado foi definido por quatro mutações não-sinônimas e polimórficas presentes simultaneamente em aproximadamente 50% das pacientes, sugerindo uma segregação conjunta. As mutações são as seguintes: Pro871Leu (CCG→CTG), Glu1038Gly (GAA→GGA) e Lys1183Arg (AAA→AGA) situadas no éxon 11 do gene BRCA1 e a Ser1613Gly (AGT→GGT) situada no éxon 16. Nenhuma delas é considerada patogênica pelos bancos de dados consultados (HMGD, BIG e Uniprot). Com o intuito de verificar a associação dos haplótipos com o aumento do risco para o câncer de mama e/ou ovário, realizamos uma análise comparando os grupos de pacientes e controles.

As características clínicas das 45 pacientes e 82 controles analisados no presente estudo estão descritas na Tabela 4. A Tabela 5 mostra as frequências genotípicas e alélicas dos 4 polimorfismos usados para a caracterização dos haplótipos. As frequências genotípicas das mutações estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto para a mutação Glu1038Gly no grupo controle (0,034).

Tabela 4. Características clínicas dos grupos estudados

Características	Grupo de Pacientes	Grupo Controle
Número	45	82
Idade (anos)	41,7 (±9,78)	41,1 (±11,04)
Sexo	F: 45 (100%)	F: 82 (100%)
Etnia	Branco: 45 (100%)	Branco: 82 (100%)

As diferenças na distribuições genotípicas dos polimorfismos Pro871Leu ($p=0,0041$) e Glu1038Gly ($p=0,0124$) foram significativas para os genótipos TT e AG respectivamente, quando comparado pacientes e controles. Já em relação as frequências alélicas, apenas o polimorfismo Lys1183Arg apresentou diferença significativa ($p=0,0324$) entre os grupos de pacientes e controles. As demais análises para os quatro polimorfismos não foram significativas ($p>0,05$; Tabela 5).

Tabela 5. Frequência genotípica e alélica dos controles e pacientes com HBOC

Polimorfismo	Controles (n=82)	Pacientes (n=45)	P	OR 95% IC
Pro871Leu (C→T)				
CC	38(0,46)	18(0,4)	--	1.0000 (Reference)
CT	40(0,49)	17(0,38)	Ns	0,8972 (0.4039 a 1.993)
TT	4(0,05)	10(0,22)	0,0073	5,278 (1.455 a 19.14)
Alelo C	116(0,7)	53(0,59)	--	1.0000 (Reference)
Alelo T	48(0,29)	37(0,41)	Ns	1,687 (0.9850 a 2.890)
Glu1038Gly (A→G)				
AA	57(0,7)	22(0,49)	--	1.0000 (Reference)
AG	19(0,23)	20(0,44)	0,0124	2,727 (1.228 a 6.057)
GG	6(0,07)	3(0,07)	Ns	1,295 (0.2976 a 5.640)
Alelo A	133(0,81)	64(0,71)	--	1.0000 (Reference)
Alelo G	31(0,19)	26(0,29)	Ns	1,743 (0.9559 a 3.178)
Lys1183Arg (A→G)				
AA	55(0,67)	22(0,49)	--	1.0000 (Reference)
AG	24(0,29)	19(0,42)	Ns	1,979 (0.9081 a 4.314)
GG	3(0,04)	4(0,09)	Ns	3,333 (0.6887 a 16.13)
Alelo A	134(0,82)	63(0,7)	--	1.0000 (Reference)
Alelo G	30(0,18)	27(0,3)	0,0324	1,914 (1.050 a 3.488)
Ser1613Gly (A→G)				
AA	50(0,6)	23(0,51)	--	1.0000 (Reference)
AG	27(0,33)	18(0,4)	Ns	1,449 (0.6680 a 3.144)
GG	5 (0,06)	4(0,09)	Ns	1,739 (0.4268 a 7.087)
Alelo A	127(0,77)	64(0,71)	--	1.0000 (Reference)
Alelo G	37(0,23)	26(0,29)	Ns	1,394 (0.7770 a 2.503)

ns= não significativo

Como a HBOC é uma síndrome com padrão de herança dominante, ou seja, uma mutação patogênica em heterozigose já é capaz de aumentar o risco de desenvolvimento do câncer de mama e/ou ovário, também realizamos as análises das frequências genotípicas considerando os indivíduos heterozigotos e os homozigotos mutados como um único grupo. Por essa análise, foram significativas as diferenças na distribuições genotípicas dos polimorfismos Glu1038Gly ($p=0,0219$) e Lys1183Arg ($p=0,0448$). As frequências alélicas não sofreram alterações (Tabela 6).

Tabela 6. Frequência genotípica dos controles e pacientes com HBOC

Polimorfismo	Controles (n=82)	Pacientes (n=45)	P	OR 95% IC
Pro871Leu (C→T)				
CC*	38(0,46)	18(0,4)	--	
CT + TT	44(0,54)	27(0,6)	Ns	1,295 (0.6194 a 2.709)
Glu1038Gly (A→G)				
AA*	57(0,7)	22(0,49)	--	
AG + GG	25(0,3)	23(0,51)	0,0219	2,384 (1.126 a 5.048)
Lys1183Arg (A→G)				
AA*	55(0,67)	22(0,49)	--	
AG + GG	27(0,33)	23(0,51)	0,0448	2,130 (1.012 a 4.483)
Ser1613Gly (A→G)				
AA*	50(0,6)	23(0,51)	--	
AG + GG	32(0,4)	22(0,49)	Ns	1,495 (0.7174 a 3.114)

ns= não significativo, * genótipos referência (1.0000)

A análise de haplótipos pelo programa Haplo.Stats identificou seis haplótipos com frequência acima de 1%, considerando os nucleotídeos mutados: Pro-Glu-Lys-Ser, Pro-Glu-Lys-Gly, Pro-Gly-Lys-Ser, Leu-Glu-Arg-Gly, Leu-Glu-Lys-Ser e Leu-Gly-Arg-Gly (Tabela 7).

O haplótipo 1 (Pro-Glu-Lys-Ser), considerado o selvagem, apresentou frequência de 62%. Entre os haplótipos com pelo menos um dos resíduos mutados, o sexto (Leu-Gly-Arg-Gly), composto por todos os resíduos mutados, foi o que apresentou maior frequência (20%). Além disso, o haplótipo 6 foi o único que apresentou diferença significativa ($p=0,026$; $OR=1.95$ $IC_{95\%}: 1.016-3.757$) entre o grupo das pacientes (~28%) e o grupo controle (~16%), sugerindo uma possível associação com o aumento de risco para a HBOC. Entretanto, quando aplicada a correção de Bonferroni (p corrigido <0.0083), essa diferença deixou de ser significativa (Tabela 7).

Tabela 7: Frequências estimadas dos haplótipos em controles e pacientes com câncer de mama e/ou ovário

Hp	Pro871Leu (CCG→CTG)	Glu1038Gly (GAA→GGA)	Lys1183Arg (AAA→AGA)	Ser1613Gly (AGT→GGT)	Hap. Freq	Ctl	Pacientes	p.val
1	Pro	Glu	Lys	Ser	0.620	0.640	0.578	0.313
2	Pro	Glu	Lys	Gly	0.024	0.038	NA	0.146
3	Pro	Gly	Lys	Ser	0.014	0.024	NA	0.158
4	Leu	Glu	Arg	Gly	0.020	0.025	0.011	0.471
5	Leu	Glu	Lys	Ser	0.107	0.108	0.111	0.889
6	Leu	Gly	Arg	Gly	0.200	0.158	0.278	0.026

Hp: Haplótipos, P correção Bonferroni: $P^c=0.05/6 = 0.0083$, Ctl=controles, NA= não encontrado

4.5 ANÁLISE DA MUTAÇÃO R337H (Arg337His) NO GENE TP53

Adicionalmente ao rastreamento das mutações no gene BRCA1, decidimos investigar a mutação R337H do gene TP53 em todas pacientes, por se tratar de uma mutação que se apresenta numa frequência elevada (46%) em mulheres com câncer de mama, principalmente em famílias do sul do Brasil com suspeita da Síndrome de Li-Fraumeni (ACHATZ *et al.*, 2007). Por outro lado, é importante estudar o gene TP53 por ser um componente chave que participa da mesma via de reparo do BRCA1/2 (Figura 7).

Usando o método de HRM e sequenciamento de DNA identificamos quatro pacientes com a mutação R337H (Figura 19), sendo que três delas são da mesma família. Analisando o histórico de câncer das duas famílias, observa-se que apesar da presença do câncer de mama e de outros cânceres nos indivíduos de ambas as famílias, sugerindo uma relação com a Síndrome de Li-Fraumeni, nenhuma das quatro pacientes apresentou critério para o teste genético relacionado a SLF ou para LFL (Figuras 20 e 21), segundo NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology v.1.2011.

Figura 19. A) Curvas de melting específicas para cada genótipo identificado no éxon 10 do gene TP53. B) Representação esquemática da região amplificada do éxon 10 contendo a mutação R337H; B1) Resultado do sequenciamento de uma amostra com genótipos normal (curvas de melting em verde); B2) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação R337H em heterozigose (curva de melting em azul).

Figura 20. Heredograma da família das três pacientes portadoras da mutação R337H em heterozigose. Setas indicam os probandos; idade atual está indicada abaixo dos indivíduos, dx= idade ao diagnóstico; ob= idade de óbito.

Figura 21. Heredograma da família da paciente 2692 portadora da mutação R337H em heterozigose. Seta indica o probando; idade atual está indicada abaixo dos indivíduos, dx= idade ao diagnóstico.

5. DISCUSSÃO

O diagnóstico molecular da HBOC é um processo de alta complexidade e requer a análise completa dos genes BRCA1 e BRCA2. Essa dificuldade resulta do tamanho desses genes e da extensa heterogeneidade molecular observada nesta síndrome (BIC). Visto essa dificuldade, o presente trabalho associou uma técnica de identificação de mutações pontuais (HRM) e uma técnica de rastreamento de grandes rearranjos (MLPA) que segundo Walsh *et al.* (2006), aumenta a sensibilidade do teste (PALMERO *et al.*, 2009).

Apesar da grande quantidade de mutações identificadas em pacientes com HBOC, apenas um número restrito é caracterizada como patogênica. A estas, incluímos principalmente as do tipo *nonsense*, *frameshift*, e grandes e pequenas deleções. No presente estudo, foram identificadas duas mutações patogênicas (deleção dos éxons 16-17 e deleção do éxon 19) e uma outra mutação com informações controversas sobre sua patogenicidade (Ser616del). Todas elas são denominadas deleções *in frame*, onde ocorre a deleção de um ou vários códons completos.

Mutações “Patogênicas”

Casuística 1

A primeira mutação patogênica (deleção dos éxons 16-17) foi detectada em uma paciente com carcinoma ductal invasivo bilateral. O primeiro diagnosticado aos 35 anos na mama direita e o segundo na mama esquerda aos 36 anos. Em relação ao histórico familiar, a paciente tem uma irmã com câncer de mama diagnosticado aos 35 anos e que veio a óbito aos 58 anos, uma sobrinha (filha dessa irmã que foi a óbito) que foi diagnosticada com câncer de mama aos 32 anos de idade e uma tia avó que também faleceu devido a neoplasia mamária.

Não há registro da idade de óbito ou diagnóstico da tia avó (Apêndice 4). Esta mutação foi descrita por Carvalho *et al.*, 2009 em uma paciente Australiana sem nenhuma outra mutação no BRCA1 ou BRCA2. A consequência dessa mutação é a perda dos aminoácidos 1559-1692 que representam os éxons 16 e 17 do gene BRCA1. A perda desses éxons afeta drasticamente a função do gene e por isso é descrita como patogênica, levando a uma pré disposição ao câncer.

Casuística 2

A segunda mutação (deleção do éxon 19) foi identificada em uma paciente com carcinoma ductal invasivo na mama direita, aos 29 anos de idade. O tumor era pouco diferenciado (grau 3) e, em relação a características imuno-histoquímicas, era do tipo triplo negativo, ou seja, negativo para anticorpos anti receptores de estrógeno, progesterona e Her-2 (C-erbB-2). Em relação ao histórico familiar (Apêndice 5), a paciente possui uma prima do lado paterno com câncer de mama, diagnosticado aos 30 anos. Além disso, a tia avó da paciente teve um câncer de mama diagnosticado aos 34 anos e um câncer de ovário diagnosticado aos 54 anos. Sua filha, já falecida, foi diagnosticada com o câncer de mama aos 23 anos de idade. Do lado materno, a paciente possui outra tia avó com câncer de mama diagnosticado aos 34 anos de idade. A mutação em questão, descrita pela primeira vez por Hansen *et al.* (2009), está localizada na região do domínio BRCT do gene BRCA1, afetando assim a ligação de outras fosfoproteínas que são fundamentais para a ativação do complexo de reparo do DNA. Além disso, essa mutação favorece o aparecimento de um stop códon no aminoácido 1732, devido a um erro na matriz de leitura provocado pela ausência do éxon 19. Considerando a posição e tipo da mutação, bem como o histórico familiar da paciente, sugerimos que esta mutação pode ser descrita como patogênica.

Casuística 3

A mutação Ser616del foi detectada pela primeira vez em uma paciente de 27 anos de origem africana (ELLIS *et al.*, 2000). Nesse estudo, a mutação foi descrita como patogênica por preencher os critérios de patogenicidade descrito por Greenman *et al.* (1998), que são os seguintes: 1) segregação com a doença (a avó da paciente foi diagnosticada com câncer de mama aos 60 anos), 2) ausência em controles pareados etnicamente (a mutação não foi detectada nos 350 controles analisados) e 3) o resíduo deve ser conservado em murinos e caninos (o aminoácido serina na posição 616 é conservado).

Em 2005, McKean-Cowdin *et al.* identificaram a mesma mutação S616del em duas famílias Afro-americanas. Ambas as famílias tinham um membro portador da mutação diagnosticado com câncer de mama após os 60 anos. Entretanto, haviam também indivíduos saudáveis com mais de 70 anos portadores da mesma mutação. Por essas evidências, os autores sugeriram que a Ser616del se tratava de uma mutação não patogênica, ou de baixa penetrância. Assim, sugerimos que um estudo funcional é necessário para determinar a patogenicidade dessa mutação.

Mutações “Não-patogênicas”

Um total de quatro mutações intrônicas (IVS7-34C>T, IVS8-57delT, IVS17-53C>T e IVS21+15G>C) e quatro mutações sinônimas (Ser694Ser, Leu771Leu, Glu1004Glu e Ser1436Ser) foram identificadas no presente estudo. Em geral essas mutações não tem importância clínica no câncer de mama e ovário, pois não alteram a função protéica. No entanto, em algumas situações as mutações intrônicas e sinônimas podem comprometer a função das proteínas, alterando o mecanismo de “splicing” (criando ou excluindo sítios de “splicing”) e o enovelamento da proteína nascente devido a mudança na cinética da tradução

das proteínas (criação de códons raros) (TSAI, 2008), respectivamente. Nenhuma das mutações intrônicas e sinônimas descritas no presente estudo possuem tais propriedades.

Além disso, dez mutações não-sinônimas (*missense*) foram descritas nesse estudo, sendo a mutação Val1117Ile descrita pela primeira vez. Todas elas estão localizadas no éxon 11 do gene BRCA1 corroborando com a literatura que relata uma frequência elevada de mutações nesse éxon. A nova mutação, Val1117Ile, pode ser considerada não patogênica por estar localizada em uma região do éxon 11 fora da região de localização nuclear. Além disso, tanto a valina quanto a isoleucina são aminoácidos hidrofóbicos, com uma estrutura semelhante formada por um grupo amino, um grupo carboxila e uma cadeia lateral alifática. No entanto, estudos funcionais ou de associação são necessários para de fato caracterizar o efeito da mutação na função da proteína. As nove mutações restantes não possuem significado clínico conhecido de acordo com os bancos de dados BIC e HGMD. Entretanto, segundo o UNIPROT, todas elas são descritas como polimórficas, ou seja, mutação com frequência acima de 1% na população.

Análise de Haplótipos

Quatro mutações (éxon 11: Pro871Leu, Glu1038Gly e Lys1183Arg; e éxon 16: Ser1613Gly), descritas como polimórficas e não patogênicas quando analisadas individualmente, foram identificadas simultaneamente em 50% das pacientes. Essa alta frequência é um resultado interessante que nos leva a supor que as quatro mutações estejam segregando juntas em haplótipos. Freedman *et al.* (2005), também observaram a segregação desses haplótipos. A diferença em relação aos nossos dados foi a análise de duas outras mutações não-sinônimas (Gln356Arg, Ser1140Gly) e de 22 mutações sinônimas.

Considerando apenas as mutações incluídas na análise de haplótipos do presente estudo, apenas os haplótipos 1 (Pro-Glu-Lys-Ser), 5 (Leu-Glu-Lys-Ser) e 6 (Leu-Gly-Arg-Gly) foram identificados por Freedman *et al.* (2005). Eles concluíram que os três haplótipos não conferiam risco aumentado de câncer de mama esporádico nas populações estudadas. No mesmo ano, Cox *et al.* (2005), após sequenciamento completo do gene BRCA1 de 1.323 pacientes e 1.910 controles sadios, seguido da análise de haplótipos formados por quatro polimorfismos (uma mutação não-sinônima: Pro871Leu, e três mutações intrônicas: rs8176166, rs3737559 e rs8176267), verificou que o haplótipo 2 (CAGG) do seu trabalho conferia um risco aumentado de 20% de câncer de mama esporádico. Um dado interessante apresentado por Cox e colaboradores foi a evidência do risco maior em mulheres homozigotas para o haplótipo 2 e com histórico familiar de câncer de mama. Dunning *et al.* (1997), analisaram a associação de três haplótipos formados pelos resíduos mutados Gln356Arg, Pro871Leu, Glu1038Gly e Ser1613Gly com câncer de mama e ovário. A análise não encontrou associação desses haplótipos com risco aumentado de câncer, mas sugeriram que o resíduo Arg356 conferia proteção contra o câncer de mama e ovário.

No presente estudo, nós identificamos uma associação do câncer de mama e ovário ($p=0.026$) com o haplótipo 6, formado pelos quatro resíduos mutados (Leu871, Gly1038, Arg1183 e Gly1613). Por outro lado, quando aplicamos a correção de Bonferroni (p corrigido <0.0083), o resultado deixa de ser significativo. A correção de Bonferroni é um método clássico excessivamente rigoroso usado para ajustar os valores de p (ZINTZARAS e LAU *et al.*, 2008). Ele se baseia numa hipótese nula geral, considerando: 1) nenhuma diferença entre os grupos, 2) nenhum efeito de tratamento e 3) nenhuma relação entre as variáveis (PERNEGER, 1998). Este ajuste é visto como desnecessário por alguns autores quando o objetivo do estudo é explorar a importância relativa de cada variável (ROTHMAN, 1990).

Comparando com os trabalhos relatados acima, o nosso estudo se diferencia por analisar amostras de pacientes diagnosticados com HBOC e não com câncer de mama esporádico. Vale ressaltar que 50% das pacientes eram portadoras das quatro mutações em heterozigose. Apesar da forte associação ($p=0.026$), nós acreditamos que o número amostral de pacientes com suspeita de HBOC e controles saudáveis deve ser aumentado para a confirmação de nossos dados. Uma questão a ser discutida é a possibilidade de haplótipos formados por mutações polimórficas do tipo não-sinômina conferirem risco aumentado de HBOC ou câncer esporádico pelo efeito cumulativo das mutações não-sinônimas na estrutura da proteína BRCA1.

Todas as mutações que compõem o haplótipo descrito no presente estudo são caracterizadas, quando analisadas individualmente, polimórficas sem conferir risco aumentado para a HBOC. No entanto, vale ressaltar que os resíduos 871Leu e 1038Gly (Tabela 5) apresentaram diferenças significativas quanto a frequência nos pacientes com HBOC em relação aos controles sadios, quando os genótipos são analisados individualmente. Já na análise dos genótipos seguindo o padrão de herança dominante da síndrome, os resíduos que apresentaram diferenças significativas foram o 1038Gly e o 1183Arg (Tabela 6). Assim, sugerimos que os resíduos 871Leu, 1183Arg e principalmente o 1038Gly podem conferir um peso maior para o resultado significativo ($p=0,026$) do haplótipo 6. Em relação ao desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg observado para a mutação Glu1038Gly no grupo controle, acreditamos que ele pode ser explicado por um evento ao acaso. Em termos populacionais, esse desvio geralmente é devido a eventos micro-evolutivos de migração, seleção, mutação, ou por endogamia (MUNAFO e FLINT, 2004). Até o presente momento, nenhum estudo levantou a hipótese do efeito cumulativo das mutações não-sinônimas quando segregadas em haplótipos.

Polimorfismos ligados ao gene BRCA1

Uma mutação é considerada polimórfica quando sua frequência na população é igual ou maior que 1%, independentemente da sua natureza, ou seja, se for do tipo sinônima (sem substituição de aminoácidos) ou não-sinônima (com substituição de aminoácidos). A condição de ser polimórfica está restrita a sua frequência na população, ao contrário do que é encontrado muitas vezes na literatura a menção de polimorfismo apenas para mutações não patogênicas. A maioria das mutações relatadas no gene BRCA1 é polimórfica e do tipo não-sinônima, sem evidência experimental de causar deficiência na proteína, principalmente quando está situada fora dos domínios RING-finger e BRCTs. Quando localizada em um desses domínios, há uma grande chance de afetar a função desse gene. No entanto, a patogenicidade dessas mutações devem ser suportadas por análises *in silico* e estudos funcionais com intuito de buscar informações sobre tipo e local da mutação, sua conservação entre as espécies e o efeito bioquímico gerado por ela.

Por meio desses ensaios é possível verificar se determinada variante resulta na diminuição ou na perda total da função de supressor tumoral do gene BRCA1, levando a pré-disposição do câncer de mama e/ou ovário (COUCH *et al.*, 2008). Uma análise abrangente da meia-vida do mRNA e da proteína também deve ser considerada, além dos ensaios funcionais, já que um subconjunto de variantes podem inativar as proteínas BRCA1 ou BRCA2 e predispor ao câncer através da influência na estabilidade das proteínas e do mRNAs, ao invés de proporcionar mudanças estruturais ou funcionais nas proteínas (LOVELOCK *et al.*, 2007). Além disso, a observação de sua ocorrência em grupos controles, co-segregação entre os membros de uma família e a possível associação à presença de alguma mutação deletéria também contribuem para a avaliação de patogenicidade da mutação (JUDKINS, 2005).

A mutação Met1652Ile foi encontrada em apenas duas pacientes e está localizada no domínio BRCT do gene BRCA1. Estudos recentes analisaram essa região e verificaram a presença de ligação com fosfopeptídeos de outras proteínas que fazem parte do complexo de reparo do DNA (WILLIAMS *et al.*, 2004). Entretanto, o efeito dessa mutação no yeast growth assay (ensaio de crescimento de leveduras) e nas propriedades de ligação a fosfopeptídeos foi similar a proteína do tipo selvagem (HUMPHREY *et al.*, 1997; WILLIAMS *et al.*, 2004). Mais recentemente, estudos com o transcription activation assay (ensaio de ativação transcricional) realizados por Carvalho *et al.*, (2009) não detectaram nenhum impacto funcional dessa variante. Além disso, a mutação Met1652Ile é polimórfica e com taxa de heterozigotos de 4,1% na população controle (DEFFENBAUGH *et al.*, 2002). Assim, os dados publicados a partir de fontes independentes indicam que a mutação Met1652Ile constitui uma variante neutra, mesmo localizada na região do domínio BRCT da proteína BRCA1.

Em 2007, Carvalho *et al.* realizaram os mesmos ensaios com a mutação Ser1613Gly, localizada próxima do domínio BRCT, concluindo também que esta mutação não confere risco aumentado de câncer de mama e de ovário.

Muitos estudos sugerem que mutações dentro de domínios funcionais da proteína BRCA1 podem resultar na perda da função do gene levando a instabilidade genômica e consequentemente ao aparecimento do câncer de mama e ovário (SHEN e VADGAMA, 1999; DEVER *et al.*, 2011). Em 2011, Dever *et al.* demonstraram que a interrupção da ligação de fosfoproteínas ao domínio BRCT, devido a mutações, causava o aumento do processo de ubiquitinação de outras proteínas envolvidas na resposta ao dano do DNA, além do aumento do processo de hiper recombinação. Essas alterações contribuem para o aumento da instabilidade genômica e, possivelmente, o aparecimento do câncer de mama.

Frequência de mutações patogênicas

Das 41 pacientes analisadas nesse trabalho, apenas duas apresentaram mutações deletérias no gene BRCA1 (deleção no éxon 16 e 17 e deleção do éxon 19). A maior frequência de mutações deletérias encontradas por outros autores, pode ser resultado da utilização de critérios de seleção dos pacientes mais rigorosos que os nossos como por exemplo a presença de pacientes de descendência *Ashkenazi*, já que muitos deles apresentam a mutação fundadora 5382insC. Além disso, nesse trabalho, para o diagnóstico clínico de HBOC, foram utilizados os critérios do NCCN, considerados menos restritivos quando comparados aos critérios da ASCO já que a probabilidade mínima de mutação conferida a uma família que preencha os critérios da ASCO é de 16% quando o modelo de probabilidade de mutação de Frank *et al.* (2002), é utilizado (PALMERO *et al.*, 2009). Modelos de probabilidade de mutação germinativa nos genes BRCA1 e BRCA2 baseados na história familiar auxiliam na classificação das famílias com fenótipo sugestivo de HBOC em diferentes faixas de risco, facilitando a indicação aos testes diagnósticos (SHATTUCK-EIDENS *et al.*, 1997; FRANK *et al.*, 2002). A tabela de prevalência de mutação dos Laboratórios Myriad (<https://www.myriadpro.com/bracanalysis-prevalence-tables>) é um dos modelos que leva em consideração a história familiar de primeiro e segundo graus de câncer de mama feminino e masculino, câncer de ovário e idades ao diagnóstico (PALMERO *et al.*, 2009). Das 41 pacientes analisadas nesse trabalho, apenas dez (24,4%), pelas tabelas do Myriad, apresentam probabilidade de mutação nos genes BRCA1 e BRCA2 maior que 16%, sendo que nove delas tem uma probabilidade de 21,2% por apresentarem o câncer de mama antes dos 50 anos de idade e por apresentarem mais de um parente (1º ou 2º grau) também com câncer de mama diagnosticado antes dos 50 anos.

A outra paciente apresenta probabilidade de 26,6% por apresentar o câncer de mama antes dos 50 anos e por apresentar uma parente de segundo grau com câncer de mama antes dos 50 anos e câncer de ovário. As duas pacientes com mutações patogênicas encontradas nesse estudo enquadram-se nessas duas últimas categorias, sendo que a paciente portadora da deleção dos éxons 16 e 17 atingiu a probabilidade de 21,2% e a paciente portadora da deleção do éxon 19 foi a que atingiu a maior probabilidade de 26,6%.

Outra causa da baixa frequência de mutações deletérias é a inclusão de algumas mulheres com uma história familiar debilitada, ou seja, uma família de tamanho pequeno, morte prematura na família, perda de contato com os membros da família, e informação inadequada (EDWARDS *et al.*, 2009). Entretanto, em casos isolados de câncer de mama, com estrutura familiar limitada, diagnóstico em idade precoce (menor do que 50 anos) e histologia característica, a pesquisa de mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA2 deve ser indicada (ACHATZ, 2009).

Ademais, a ausência de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 não significa que o câncer de mama e ovário seja esporádico. Mutações germinativas em outros genes também envolvidos na manutenção da integridade genômica, como TP53, PTEN, ATM, Nbs1, RAD51, BRIP1 e PALB2, tem sido associadas a carcinogênese de mama e ovário (EWALD *et al.*, 2009). O gene RAD51 encontra-se mutado em aproximadamente 1,5% a 4% das famílias predispostas para o câncer de mama e de ovário, com penetrância alta ou moderada (MEINDL *et al.*, 2010). Já em relação ao PALB2, foi verificado que este gene se liga diretamente ao BRCA1 e atua como uma ponte molecular na formação do complexo BRCA1-PALB2-BRCA2. Em células depletadas para PALB2, o reparo do DNA por recombinação homóloga dependente de BRCA1/2 é defeituoso, sugerindo que a inativação do gene PALB2 pode causar mudanças fenotípicas e biológicas similares a inativação dos genes BRCA1 e BRCA2 (SY *et al.*, 2009; DANSONKA-MIESZKOWSKA *et al.* 2010).

Análise da mutação R337H do gene TP53

A mutação germinativa R337H do gene TP53 foi investigada nesse estudo devido sua alta prevalência em famílias brasileiras com histórico de câncer de mama (ACHATZ *et al.* 2007; ASSUMPÇÃO *et al.*, 2008). Das quatro mulheres positivas para a mutação R337H, três pertenciam a mesma família.

As duas famílias portadoras da mutação possuem histórico familiar de outros tipos de cânceres, sendo o câncer de próstata e o câncer de pulmão comum entre elas. Além disso, a família com as três mulheres com câncer de mama diagnosticados antes dos 45 anos, também apresenta histórico de câncer de pele, câncer de intestino, lipoma e carcinoma espinocelular (Figura 20). Já a outra família apresenta, além do câncer de mama no probando diagnosticado na mama esquerda aos 61 anos e na mama direita aos 62 anos, outras duas primas diagnosticadas com câncer de mama aos 50 anos e histórico de câncer de parótida, câncer de bexiga e câncer de Sistema Nervoso Central (Figura 21). A variedade de tipos de tumores encontrados em famílias com a mutação R337H pode ser explicada por meio da hipótese do efeito tecido específico, ou seja, como tal mutação afeta as características bioquímicas da proteína p53, favorecendo sua inativação frente ao aumento de pH, a proteína mutante pode ter sua atividade interrompida em um determinado tecido dependendo de alterações bioquímicas locais. Assim, a predisposição a tumores ocorre exclusivamente em sítios nos quais este efeito possa ocorrer (ACHATZ *et al.*, 2007).

A alta frequência de indivíduos com câncer nessas famílias leva a suspeita da SLF, utilizando o critério de Eeles, entretanto, nenhuma das quatro mulheres apresentava critério para o teste diagnóstico dessa Síndrome, de acordo com o NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology v.1.2011.

Diante desses fatos, seria interessante sugerir mudanças nos critérios de investigação da SLF com a inclusão de outros tipos de tumores ou mudanças na idade ao diagnóstico nos critérios já estabelecidos, ou ainda a definição de critérios específicos para famílias brasileiras devido a alta frequência da mutação R337H e a alta diversidade de tumores observada nas famílias portadoras desta mutação.

6. CONCLUSÃO

A abordagem metodológica usada no estudo foi informativa, pois em 90% das pacientes foi encontrada pelo menos uma mutação no gene BRCA1. O resultado descreveu 10 mutações não-sinônimas, uma deleção de um aminoácido e 4 mutações sinônimas na região codificadora. Nas regiões intrônicas, foram identificadas 4 mutações, sendo uma deleção de um nucleotídeo e 3 substituições, duas do tipo transição e uma transversão (Tabela 3). O estudo descreve uma nova mutação do tipo não-sinônima, Val1117Ile, localizada no éxon 11 do gene BRCA1 em uma região fora do domínio RING-finger e dos domínios BRCTs da proteína, além da valina e da isoleucina serem aminoácidos com características físico-químicas semelhantes. Essas informações e o fato da mutação ter sido encontrada em uma única paciente, sugere um caráter não patogênico. Entretanto, estudos funcionais são necessários para validar seu efeito na estrutura protéica. As demais mutações não-sinônimas encontradas nesse estudo também não conferem patogenicidade quando analisadas individualmente, de acordo com a literatura disponível. Já a mutação S616del, presente também em uma paciente, necessita de ensaio funcional já que apresenta informações controversas sobre sua patogenicidade. No entanto, em duas pacientes foram encontradas mutações comprovadamente patogênicas, sendo uma delas com deleção dos éxons 16 e 17 em heterozigose e a outra com deleção do éxon 19 também em heterozigose.

A análise de haplótipos revelou que um deles, o haplótipo formado pelos quatro resíduos mutados (Leu-Gly-Arg-Gly), apresentou diferença significativa ($p=0.026$) entre o grupos de pacientes e controle sadios, sugerindo uma associação com o risco aumentado para HBOC. Entretanto, um estudo com um maior número amostral deve ser realizado para confirmação desse resultado, que consideramos o mais relevante do estudo.

O estudo também contribui com a informação de que mulheres brasileiras com câncer de mama e histórico familiar com múltiplos tumores devem ser indicadas para a investigação da mutação R337H no gene TP53 como informação adicional da causa do câncer de mama, mesmo não obedecendo exatamente os critérios para SLF ou LFL, por ser uma mutação mais frequente no Brasil nessas síndromes quando comparada a outros países.

A investigação e a classificação de variantes que afetam a função do gene BRCA1 e/ou BRCA2 é um processo trabalhoso, entretanto necessário para melhorar as condições de acompanhamento e manejo dos portadores de mutações patogênicas, atendidos nos serviços de aconselhamento genético do câncer.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

AMERICAN CANCER SOCIETY. Breast Cancer Facts & Figures 2007-2008. Disponível em : www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/BreastCancerFactsFigures/breast-cancer-facts--figures-2007-2008 . Acesso em: 10 jan. 2012.

AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY. Policy statement update: genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol*, v.21, n.12, Jun 15, p.2397-406. 2003.

ACHATZ, M. I., *et al.* The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett*, v.245, n.1-2, Jan 8, p.96-102. 2007.

ACHATZ, M.I. Modificadores de penetrância de mutações germinativas no gene TP53 em famílias brasileiras com diagnóstico clínico da Síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni like: impacto dos polimorfismos intragênicos do TP53 e de genes que regulam a atividade da p53. 2008. 228 f. Tese (Doutorado em Ciência: Oncologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ACHATZ, M. I. Síndrome de Li-Fraumeni. In: SEUÁNEZ, H.N. REDE NACIONAL DE CâNCER FAMILIAL MANUAL OPERACIONAL. Rio de Janeiro: CNPq, 2009. p.107-112.

AL-MULLA, F., *et al.* Age-dependent penetrance of different germline mutations in the BRCA1 gene. *J Clin Pathol*, v.62, n.4, Apr, p.350-6. 2009.

ANTONIOU, A., *et al.* Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet*, v.72, n.5, May, p.1117-30. 2003.

ARMES, J. E., *et al.* The histologic phenotypes of breast carcinoma occurring before age 40 years in women with and without BRCA1 or BRCA2 germline mutations: a population-based study. *Cancer*, v.83, n.11, Dec 1, p.2335-45. 1998.

ARMES, J. E., *et al.* Distinct molecular pathogeneses of early-onset breast cancers in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a population-based study. *Cancer Res*, v.59, n.8, Apr 15, p.2011-7. 1999.

ARNOLD, M. A. e GOGGINS, M. BRCA2 and predisposition to pancreatic and other cancers. *Expert Rev Mol Med*, v.2001, May 14, p.1-10. 2001.

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

ASSUMPCAO, J. G., *et al.* Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. *BMC Cancer*, v.8, p.357. 2008.

¹ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AUDEH, M. W., *et al.* Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. Lancet, v.376, n.9737, Jul 24, p.245-51. 2010.

BEGG, C. B., *et al.* Variation of breast cancer risk among BRCA1/2 carriers. Jama, v.299, n.2, Jan 9, p.194-201. 2008.

BERGINK, S. e JENTSCH, S. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair. Nature, v.458, n.7237, Mar 26, p.461-7. 2009.

BIC - Breast Cancer Information Core Database. Disponível em: http://www.research.nhgri.nih.gov/projects/bic/Member/brca1_mutation_database.shtml. Acesso em: 20 fev. 2012.

BIRCH, J. M., *et al.* Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. Oncogene, v.20, n.34, Aug 2, p.4621-8. 2001.

BOULTON, S. J. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. Biochem Soc Trans, v.34, n.Pt 5, Nov, p.633-45. 2006.

BRZOVIC, P. S., *et al.* Binding and recognition in the assembly of an active BRCA1/BARD1 ubiquitin-ligase complex. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.10, May 13, p.5646-51. 2003.

BUISSON, R., *et al.* Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. Nat Struct Mol Biol, v.17, n.10, Oct, p.1247-54. 2010.

BYRSKI, T., *et al.* Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. J Clin Oncol, v.28, n.3, Jan 20, p.375-9. 2010.

CARVALHO, M., *et al.* Analysis of a set of missense, frameshift, and in-frame deletion variants of BRCA1. Mutat Res, v.660, n.1-2, Jan 15, p.1-11. 2009.

CARVALHO, M. A., *et al.* Determination of cancer risk associated with germ line BRCA1 missense variants by functional analysis. Cancer Res, v.67, n.4, Feb 15, p.1494-501. 2007.

CHACON, R. D. e COSTANZO, M. V. Triple-negative breast cancer. Breast Cancer Res, v.12 Suppl 2, p.S3. 2010.

CHEN, J., *et al.* Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. Mol Cell, v.2, n.3, Sep, p.317-28. 1998.

CHEN, S., *et al.* Characterization of BRCA1 and BRCA2 mutations in a large United States sample. J Clin Oncol, v.24, n.6, Feb 20, p.863-71. 2006.

CHENEVIX-TRENCH, G., *et al.* Genetic and histopathologic evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA sequence variants of unknown clinical significance. Cancer Res, v.66, n.4, Feb 15, p.2019-27. 2006.

CHENG, C. H., *et al.* SUMO modifications control assembly of synaptonemal complex and polycomplex in meiosis of *Saccharomyces cerevisiae*. Genes Dev, v.20, n.15, Aug 1, p.2067-81. 2006.

CHOMPRET, A., *et al.* P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. Br J Cancer, v.82, n.12, Jun, p.1932-7. 2000.

CLAES, K., *et al.* BRCA1 and BRCA2 germline mutation spectrum and frequencies in Belgian breast/ovarian cancer families. Br J Cancer, v.90, n.6, Mar 22, p.1244-51. 2004.

CLARK-KNOWLES, K. V., *et al.* Conditional inactivation of *Brcal* in the mouse ovarian surface epithelium results in an increase in preneoplastic changes. Exp Cell Res, v.313, n.1, Jan 1, p.133-45. 2007.

CLAUS, E. B., *et al.* The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. Cancer, v.77, n.11, Jun 1, p.2318-24. 1996.

COELI, F.B. Análise Molecular do Loco C4/CYP21: Impacto da Variabilidade Alélica provocada por Recombinações sobre os métodos de Avaliação de Mutações. 2008. 194 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2009.

CONSORTIUM, T. U. Ongoing and future developments at the Universal Protein Resource. Nucleic Acids Res, v.39, n.Database issue, Jan, p.D214-9. 2011.

COOPER, D. N. e KRAWCZAK, M. Human Gene Mutation. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 1993. 402 p.

COQUELLE, N., GREEN, R. e GLOVER, J. N. Impact of BRCA1 BRCT domain missense substitutions on phosphopeptide recognition. Biochemistry, v.50, n.21, May 31, p.4579-89. 2011.

COUCH, F. J., *et al.* Assessment of functional effects of unclassified genetic variants. Hum Mutat, v.29, n.11, Nov, p.1314-26. 2008.

COX, D. G., *et al.* Haplotype analysis of common variants in the BRCA1 gene and risk of sporadic breast cancer. Breast Cancer Res, v.7, n.2, p.R171-5. 2005.

DANSONKA-MIESZKOWSKA, A., *et al.* A novel germline PALB2 deletion in Polish breast and ovarian cancer patients. BMC Med Genet, v.11, p.20. 2010.

DAVIS, J. D. e LIN, S. Y. DNA damage and breast cancer. World J Clin Oncol, v.2, n.9, Sep 10, p.329-38. 2011.

DEFFENBAUGH, A. M., *et al.* Characterization of common BRCA1 and BRCA2 variants. Genet Test, v.6, n.2, Summer, p.119-21. 2002.

DEFFENBAUGH, A. M., *et al.* Characterization of common BRCA1 and BRCA2 variants. Genet Test, v.6, n.2, Summer, p.119-21. 2002.

DENG, C. X. e BRODIE, S. G. Roles of BRCA1 and its interacting proteins. Bioessays, v.22, n.8, Aug, p.728-37. 2000.

DENT, R., *et al.* Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. Clin Cancer Res, v.13, n.15 Pt 1, Aug 1, p.4429-34. 2007.

DEVER, S. M., *et al.* Mutations in the BRCT binding site of BRCA1 result in hyper-recombination. Aging (Albany NY), v.3, n.5, May, p.515-32. 2011.

DIGIAMMARINO, E. L., *et al.* A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. Nat Struct Biol, v.9, n.1, Jan, p.12-6. 2002.

DOIL, C., *et al.* RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. Cell, v.136, n.3, Feb 6, p.435-46. 2009.

DOMCHEK, S. e WEBER, B. L. Genetic variants of uncertain significance: flies in the ointment. J Clin Oncol, v.26, n.1, Jan 1, p.16-7. 2008.

DRIKOS, I., NOUNESIS, G. e VORGIAS, C. E. Characterization of cancer-linked BRCA1-BRCT missense variants and their interaction with phosphoprotein targets. Proteins, v.77, n.2, Nov 1, p.464-76. 2009.

DUNNING, A. M., *et al.* Common BRCA1 variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population. Hum Mol Genet, v.6, n.2, Feb, p.285-9. 1997.

DUROCHER, F., *et al.* Comparison of BRCA1 polymorphisms, rare sequence variants and/or missense mutations in unaffected and breast/ovarian cancer populations. Hum Mol Genet, v.5, n.6, Jun, p.835-42. 1996.

PALMERO, E. I., ASHTON-PROLLA, P. e RIBEIRO, P.I. Cânceres de Mama e Ovário Hereditários (HBOC). In: H. N. Seuánez. Rede Nacional de Câncer Familiar Manual Operacional. Rio de Janeiro: CNPq, 2009. p.77-90.

EDWARDS, E., *et al.* Identification of a de novo BRCA1 mutation in a woman with early onset bilateral breast cancer. Fam Cancer, v.8, n.4, p.479-82. 2009.

EELES, R. A. Germline mutations in the TP53 gene. Cancer Surv, v.25, p.101-24. 1995.

EEROLA, H., *et al.* Relationship of patients' age to histopathological features of breast tumours in BRCA1 and BRCA2 and mutation-negative breast cancer families. Breast Cancer Res, v.7, n.4, p.R465-9. 2005.

ELLIS, D., *et al.* Low prevalence of germline BRCA1 mutations in early onset breast cancer without a family history. J Med Genet, v.37, n.10, Oct, p.792-4. 2000.

EVANS, D. G., *et al.* A new scoring system for the chances of identifying a BRCA1/2 mutation outperforms existing models including BRCAPRO. J Med Genet, v.41, n.6, Jun, p.474-80. 2004.

EWALD, I. P., *et al.* Genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2: A literature review. Genet Mol Biol, v.32, n.3, Jul, p.437-46. 2009.

FADARE, O. e TAVASSOLI, F. A. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. Adv Anat Pathol, v.14, n.5, Sep, p.358-73. 2007.

FIGUEIREDO, B. C., *et al.* Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. J Med Genet, v.43, n.1, Jan, p.91-6. 2006.

FORD, D., *et al.* Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. Am J Hum Genet, v.62, n.3, Mar, p.676-89. 1998.

FRANK, T. S., *et al.* Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. J Clin Oncol, v.20, n.6, Mar 15, p.1480-90. 2002.

FREEDMAN, M. L., *et al.* A haplotype-based case-control study of BRCA1 and sporadic breast cancer risk. Cancer Res, v.65, n.16, Aug 15, p.7516-22. 2005.

FRIEDENSON, B. BRCA1 and BRCA2 pathways and the risk of cancers other than breast or ovarian. MedGenMed, v.7, n.2, p.60. 2005.

FRIEDMAN, L. S., *et al.* Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. Nat Genet, v.8, n.4, Dec, p.399-404. 1994.

GALANTY, Y., *et al.* Mammalian SUMO E3-ligases PIAS1 and PIAS4 promote responses to DNA double-strand breaks. Nature, v.462, n.7275, Dec 17, p.935-9. 2009.

GLOVER, J. N., WILLIAMS, R. S. e LEE, M. S. Interactions between BRCT repeats and phosphoproteins: tangled up in two. Trends Biochem Sci, v.29, n.11, Nov, p.579-85. 2004.

GOLDGAR, D. E., *et al.* Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. Am J Hum Genet, v.75, n.4, Oct, p.535-44. 2004.

GOODWIN, P. J., *et al.* Breast Cancer Prognosis in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: An International Prospective Breast Cancer Family Registry Population-Based Cohort Study. J Clin Oncol, v.30, n.1, Jan 1, p.19-26. 2011.

GOUMENOU, A. G., *et al.* Mutation analysis of BrCA1, BrCA2, and p53 versus soluble HLA class I and class II in a case of familial endometriosis. Fertil Steril, v.79, n.2, Feb, p.445-8. 2003.

GRAESER, M. K., *et al.* Contralateral breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. J Clin Oncol, v.27, n.35, Dec 10, p.5887-92. 2009.

GREENMAN, J., *et al.* Identification of missense and truncating mutations in the BRCA1 gene in sporadic and familial breast and ovarian cancer. Genes Chromosomes Cancer, v.21, n.3, Mar, p.244-9. 1998.

GUNDRY, C. N., *et al.* Amplicon melting analysis with labeled primers: a closed-tube method for differentiating homozygotes and heterozygotes. Clin Chem, v.49, n.3, Mar, p.396-406. 2003.

HAFFTY, B. G., *et al.* Racial differences in the incidence of BRCA1 and BRCA2 mutations in a cohort of early onset breast cancer patients: African American compared to white women. J Med Genet, v.43, n.2, Feb, p.133-7. 2006.

HALL, J. M., *et al.* Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science, v.250, n.4988, Dec 21, p.1684-9. 1990.

HANSEN, T. O., *et al.* Large BRCA1 and BRCA2 genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. Breast Cancer Res Treat, v.115, n.2, May, p.315-23. 2009.

HAY, R. T. SUMO: a history of modification. Mol Cell, v.18, n.1, Apr 1, p.1-12. 2005.

HICKS, S., *et al.* Prediction of missense mutation functionality depends on both the algorithm and sequence alignment employed. Hum Mutat, v.32, n.6, Jun, p.661-8. 2011.

HICKS, W. M., KIM, M. e HABER, J. E. Increased mutagenesis and unique mutation signature associated with mitotic gene conversion. Science, v.329, n.5987, Jul 2, p.82-5. 2010.

HODGSON, S., FOULKES, W., ENG, C. e EAMONN, M. Practical Guide to Human Cancer Genetics. London: Cambridge University Press, 2007. 410 p.

HONRADO, E., BENITEZ, J. e PALACIOS, J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. Mod Pathol, v.18, n.10, Oct, p.1305-20. 2005.

HUEN, M. S., SY, S. M. e CHEN, J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. Nat Rev Mol Cell Biol, v.11, n.2, Feb, p.138-48. 2010.

HUMPHREY, J. S., *et al.* Human BRCA1 inhibits growth in yeast: potential use in diagnostic testing. Proc Natl Acad Sci U S A, v.94, n.11, May 27, p.5820-5. 1997.

HUYTON, T., *et al.* The BRCA1 C-terminal domain: structure and function. Mutat Res, v.460, n.3-4, Aug 30, p.319-32. 2000.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro (disponível em <http://www.inca.gov.br>), 2008.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro (disponível em <http://www.inca.gov.br>), 2012.

JEGGO, P. A. DNA breakage and repair. Adv Genet, v.38, p.185-218. 1998.

JEMAL, A., *et al.* Global cancer statistics. CA Cancer J Clin, v.61, n.2, Mar-Apr, p.69-90. 2011.

JOHANSSON, O. T., *et al.* Tumour biological features of BRCA1-induced breast and ovarian cancer. Eur J Cancer, v.33, n.3, Mar, p.362-71. 1997.

JOHN, E. M., *et al.* Prevalence of pathogenic BRCA1 mutation carriers in 5 US racial/ethnic groups. Jama, v.298, n.24, Dec 26, p.2869-76. 2007.

JORDAN, D. M., RAMENSKY, V. E. e SUNYAEV, S. R. Human allelic variation: perspective from protein function, structure, and evolution. Curr Opin Struct Biol, v.20, n.3, Jun, p.342-50. 2010.

JUDKINS, T., *et al.* Single nucleotide polymorphisms in clinical genetic testing: the characterization of the clinical significance of genetic variants and their application in clinical research for BRCA1. Mutat Res, v.573, n.1-2, Jun 3, p.168-79. 2005.

KARCHIN, R. Next generation tools for the annotation of human SNPs. Brief Bioinform, v.10, n.1, Jan, p.35-52. 2009.

KARP, S. E., *et al.* Influence of BRCA1 mutations on nuclear grade and estrogen receptor status of breast carcinoma in Ashkenazi Jewish women. Cancer, v.80, n.3, Aug 1, p.435-41. 1997.

KING, M. C., MARKS, J. H. e MANDELL, J. B. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. Science, v.302, n.5645, Oct 24, p.643-6. 2003.

LAFARGE, S., *et al.* Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. Oncogene, v.20, n.45, Oct 4, p.6597-606. 2001.

LATRONICO, A. C., *et al.* An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. J Clin Endocrinol Metab, v.86, n.10, Oct, p.4970-3. 2001.

LEENEER, K., *et al.* Rapid and sensitive detection of BRCA1/2 mutations in a diagnostic setting: comparison of two high-resolution melting platforms. Clin Chem, v.54, n.6, Jun, p.982-9. 2008.

LI, F. P. e FRAUMENI, J. F., JR. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? Ann Intern Med, v.71, n.4, Oct, p.747-52. 1969.

LIANG, Y., *et al.* BRIT1/MCPH1 is essential for mitotic and meiotic recombination DNA repair and maintaining genomic stability in mice. PLoS Genet, v.6, n.1, Jan, p.e1000826. 2010.

LIEDE, A., KARLAN, B. Y. e NAROD, S. A. Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. J Clin Oncol, v.22, n.4, Feb 15, p.735-42. 2004.

LITWINIUK, M. M., *et al.* Expression of estrogen receptor beta in the breast carcinoma of BRCA1 mutation carriers. BMC Cancer, v.8, p.100. 2008.

LOVELOCK, P. K., *et al.* Identification of BRCA1 missense substitutions that confer partial functional activity: potential moderate risk variants? Breast Cancer Res, v.9, n.6, p.R82. 2007.

LUIZ, B. E. A. Estudo Epidemiológico de Pacientes com Tumor de Ovário no Município de Jundiaí no Período de Junho de 2001 a Junho de 2006. . Revista Brasileira de Cancerologia, v.55, n.3, p.247-253 2009.

MAHFOUDH, W., *et al.* Hereditary breast cancer in Middle Eastern and North African (MENA) populations: identification of novel, recurrent and founder BRCA1 mutations in the Tunisian population. Mol Biol Rep, v.39, n.2, Feb, p.1037-46. 2011.

MAJDAK, E. J., *et al.* Prevalence and clinical correlations of BRCA1/BRCA2 unclassified variant carriers among unselected primary ovarian cancer cases - preliminary report. Eur J Cancer, v.41, n.1, Jan, p.143-50. 2005.

MALKIN, D., *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science, v.250, n.4985, Nov 30, p.1233-8. 1990.

MANKE, I. A., *et al.* BRCT repeats as phosphopeptide-binding modules involved in protein targeting. Science, v.302, n.5645, Oct 24, p.636-9. 2003.

MARCUS, J. N., *et al.* Hereditary breast cancer: pathobiology, prognosis, and BRCA1 and BRCA2 gene linkage. Cancer, v.77, n.4, Feb 15, p.697-709. 1996.

MARTIN, A. M., *et al.* Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in breast-ovarian families from a breast cancer risk evaluation clinic. J Clin Oncol, v.19, n.8, Apr 15, p.2247-53. 2001.

MAY, P. e MAY, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. Oncogene, v.18, n.53, Dec 13, p.7621-36. 1999.

MCKEAN-COWDIN, R., *et al.* BRCA1 variants in a family study of African-American and Latina women. Hum Genet, v.116, n.6, May, p.497-506. 2005.

MCLURE, K. G. e LEE, P. W. How p53 binds DNA as a tetramer. Embo J, v.17, n.12, Jun 15, p.3342-50. 1998.

MCPHERSON, K., STEEL, C. M. e DIXON, J. M. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. Bmj, v.321, n.7261, Sep 9, p.624-8. 2000.

MEINDL, A., *et al.* Germline mutations in breast and ovarian cancer pedigrees establish RAD51C as a human cancer susceptibility gene. Nat Genet, v.42, n.5, May, p.410-4. 2010.

MENKISZAK, J., *et al.* Hereditary ovarian cancer: summary of 5 years of experience. Ginekol Pol, v.69, n.5, May, p.283-7. 1998.

MIKI, Y., *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science, v.266, n.5182, Oct 7, p.66-71. 1994.

MOHAMMAD, D. H. e YAFFE, M. B. 14-3-3 proteins, FHA domains and BRCT domains in the DNA damage response. DNA Repair (Amst), v.8, n.9, Sep 2, p.1009-17. 2009.

MORRIS, J. R. More modifiers move on DNA damage. Cancer Res, v.70, n.10, May 15, p.3861-3. 2010.

MORRIS, J. R., *et al.* The SUMO modification pathway is involved in the BRCA1 response to genotoxic stress. Nature, v.462, n.7275, Dec 17, p.886-90. 2009.

MORRIS, J. R., *et al.* Genetic analysis of BRCA1 ubiquitin ligase activity and its relationship to breast cancer susceptibility. Hum Mol Genet, v.15, n.4, Feb 15, p.599-606. 2006.

MOYNAHAN, M. E. e JASIN, M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. Nat Rev Mol Cell Biol, v.11, n.3, Mar, p.196-207. 2010.

MUNAFO, M. R. e FLINT, J. Meta-analysis of genetic association studies. Trends Genet, v.20, n.9, Sep, p.439-44. 2004.

NAROD, S. A. e FOULKES, W. D. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. Nat Rev Cancer, v.4, n.9, Sep, p.665-76. 2004.

NATHANSON, K. L., WOOSTER, R. e WEBER, B. L. Breast cancer genetics: what we know and what we need. Nat Med, v.7, n.5, May, p.552-6. 2001.

NCCN - National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology TM. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. V.I.2010. Disponível em: www.nccn.org. Acesso em: 28 jan. 2010.

NCCN - National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology TM. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. V.I.2011. Disponível em: www.nccn.org. Acesso em: 28 jan. 2012.

NG, P. C. e HENIKOFF, S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. Annu Rev Genomics Hum Genet, v.7, p.61-80. 2006.

NICHOLS, K. E., *et al.* Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.10, n.2, Feb, p.83-7. 2001.

ODDOUX, C., *et al.* The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. Nat Genet, v.14, n.2, Oct, p.188-90. 1996.

OHTA, T., SATO, K. e WU, W. The BRCA1 ubiquitin ligase and homologous recombination repair. FEBS Lett, v.585, n.18, Sep 16, p.2836-44. 201

OSBORNE, C., WILSON, P. e TRIPATHY, D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. Oncologist, v.9, n.4, p.361-77. 2004.

PERNEGER, T. V. What's wrong with Bonferroni adjustments. Bmj, v.316, n.7139, Apr 18, p.1236-8. 1998.

PLAKHINS, G., *et al.* Genotype-phenotype correlations among BRCA1 4153delA and 5382insC mutation carriers from Latvia. BMC Med Genet, v.12, p.147. 2011

PRAT, A. e PEROU, C. M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. Mol Oncol, v.5, n.1, Feb, p.5-23. 2011.

PREISLER-ADAMS, S., *et al.* Gross rearrangements in BRCA1 but not BRCA2 play a notable role in predisposition to breast and ovarian cancer in high-risk families of German origin. Cancer Genet Cytogenet, v.168, n.1, Jul 1, p.44-9. 2006.

QUINN, J. E., *et al.* BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. Cancer Res, v.63, n.19, Oct 1, p.6221-8. 2003.

RAYMOND, M. e ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. . Journal of Heredity, v.86, p.248-49. 1995.

RISCH, H. A., *et al.* Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. J Natl Cancer Inst, v.98, n.23, Dec 6, p.1694-706. 2006.

ROTHMAN, K. J. No adjustments are needed for multiple comparisons. Epidemiology, v.1, n.1, Jan, p.43-6. 1990.

SATAGOPAN, J. M., *et al.* The lifetime risks of breast cancer in Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.10, n.5, May, p.467-73. 2001.

SCHAID, D. J., *et al.* Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. Am J Hum Genet, v.70, n.2, Feb, p.425-34. 2002.

SCHNEIDER, K. Counseling about cancer: strategies for genetic counseling. Second Edition. New York: Wiley-Liss, 2002. 333 p.

SCHOUMACHER, F., *et al.* BRCA1/2 mutations in Swiss patients with familial or early-onset breast and ovarian cancer. Swiss Med Wkly, v.131, n.15-16, Apr 21, p.223-6. 2001.

SEO, J. H., *et al.* BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Korean patients with sporadic breast cancer. Hum Mutat, v.24, n.4, Oct, p.350. 2004.

SHATTUCK-EIDENS, D., *et al.* BRCA1 sequence analysis in women at high risk for susceptibility mutations. Risk factor analysis and implications for genetic testing. Jama, v.278, n.15, Oct 15, p.1242-50. 1997.

SHEN, D. e VADGAMA, J. V. BRCA1 and BRCA2 gene mutation analysis: visit to the Breast Cancer Information Core (BIC). Oncol Res, v.11, n.2, p.63-9. 1999.

SILVA-FILHO, A. E. A. Cirurgia não ginecológica em pacientes com câncer de ovário. Rev Bras Ginecol Obstet., v.26, n.5, p.411-416. 2004.

SIMCHONI, S., *et al.* Familial clustering of site-specific cancer risks associated with BRCA1 and BRCA2 mutations in the Ashkenazi Jewish population. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.10, Mar 7, p.3770-4. 2006.

SMITH, A., *et al.* Phenocopies in BRCA1 and BRCA2 families: evidence for modifier genes and implications for screening. J Med Genet, v.44, n.1, Jan, p.10-15. 2007.

STARK, C., *et al.* The BioGRID Interaction Database: 2011 update. Nucleic Acids Res, v.39, n.Database issue, Jan, p.D698-704. 2011

STENSON, P. D., *et al.* The Human Gene Mutation Database: 2008 update. Genome Med, v.1, n.1, p.13. 2009.

STRUEWING, J. P., *et al.* The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. N Engl J Med, v.336, n.20, May 15, p.1401-8. 1997.

SY, S. M., HUEN, M. S. e CHEN, J. PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. Proc Natl Acad Sci U S A, v.106, n.17, Apr 28, p.7155-60. 2009.

SZABO, C. I., WORLEY, T. e MONTEIRO, A. N. Understanding germ-line mutations in BRCA1. Cancer Biol Ther, v.3, n.6, Jun, p.515-20. 2004.

TAVTIGIAN, S. V., *et al.* Classification of rare missense substitutions, using risk surfaces, with genetic- and molecular-epidemiology applications. Hum Mutat, v.29, n.11, Nov, p.1342-54. 2008.

TAVTIGIAN, S. V., *et al.* Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. J Med Genet, v.43, n.4, Apr, p.295-305. 2006.

THOMPSON, D. e EASTON, D. Variation in BRCA1 cancer risks by mutation position. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.11, n.4, Apr, p.329-36. 2002b.

THOMPSON, D. e EASTON, D. F. Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. J Natl Cancer Inst, v.94, n.18, Sep 18, p.1358-65. 2002a

TSAL, C. J., *et al.* Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima. J Mol Biol, v.383, n.2, Nov 7, p.281-91. 2008.

TUTT, A., *et al.* Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. Lancet, v.376, n.9737, Jul 24, p.235-44. 2010.

VALLON-CHRISTERSSON, J., *et al.* Functional analysis of BRCA1 C-terminal missense mutations identified in breast and ovarian cancer families. Hum Mol Genet, v.10, n.4, Feb 15, p.353-60. 2001.

VAN DER GROEP, P., *et al.* High frequency of HIF-1 α overexpression in BRCA1 related breast cancer. Breast Cancer Res Treat, v.111, n.3, Oct, p.475-80. 2008.

VAN DER GROEP, P., VAN DER WALL, E. e VAN DIEST, P. J. Pathology of hereditary breast cancer. Cell Oncol (Dordr), v.34, n.2, Apr, p.71-88. 2011.

VARLEY, J. M., EVANS, D. G. e BIRCH, J. M. Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. Br J Cancer, v.76, n.1, p.1-14. 1997.

VIALTER, A., *et al.* Cell cycle-dependent conjugation of endogenous BRCA1 protein with SUMO-2/3. Biochim Biophys Acta, v.1810, n.4, Apr, p.432-8. 2011.

VOGELSTEIN, B., LANE, D. e LEVINE, A. J. Surfing the p53 network. Nature, v.408, n.6810, Nov 16, p.307-10. 2000.

WALSH, T., *et al.* Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in families at high risk of breast cancer. Jama, v.295, n.12, Mar 22, p.1379-88. 2006.

WEBERPALS, J. I., *et al.* The effect of the histone deacetylase inhibitor M344 on BRCA1 expression in breast and ovarian cancer cells. Cancer Cell Int, v.11, n.1, p.29. 2011.

WEISS, J. R., MOYSICH, K. B. e SWEDE, H. Epidemiology of male breast cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, v.14, n.1, Jan, p.20-6. 2005.

WEISSMAN, A. M. Themes and variations on ubiquitylation. Nat Rev Mol Cell Biol, v.2, n.3, Mar, p.169-78. 2001.

WEST, S. C., *et al.* Double-strand break repair in human cells. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, v.65, p.315-21. 2000.

WHITTEMORE, A. S., HARRIS, R. e ITNYRE, J. Characteristics relating to ovarian cancer risk: collaborative analysis of 12 US case-control studies. IV. The pathogenesis of epithelial ovarian cancer. Collaborative Ovarian Cancer Group. Am J Epidemiol, v.136, n.10, Nov 15, p.1212-20. 1992.

WILLIAMS, R. S., GREEN, R. e GLOVER, J. N. Crystal structure of the BRCT repeat region from the breast cancer-associated protein BRCA1. Nat Struct Biol, v.8, n.10, Oct, p.838-42. 2001.

WILLIAMS, R. S., *et al.* Structural basis of phosphopeptide recognition by the BRCT domain of BRCA1. Nat Struct Mol Biol, v.11, n.6, Jun, p.519-25. 2004.

WHO. World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 5 dez. 2011.

WOOSTER, R., *et al.* Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature, v.378, n.6559, Dec 21-28, p.789-92. 1995.

WU, L. C., *et al.* Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. Nat Genet, v.14, n.4, Dec, p.430-40. 1996.

XU, X., *et al.* Conditional mutation of Brca1 in mammary epithelial cells results in blunted ductal morphogenesis and tumour formation. Nat Genet, v.22, n.1, May, p.37-43. 1999.

YU, X., *et al.* The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. Science, v.302, n.5645, Oct 24, p.639-42. 2003.

ZHI, X., *et al.* BRCA1 and BRCA2 sequence variants in Chinese breast cancer families. Hum Mutat, v.20, n.6, Dec, p.474. 2002.

ZHU, Q., *et al.* BRCA1 tumour suppression occurs via heterochromatin-mediated silencing. Nature, v.477, n.7363, Sep 8, p.179-84. 2011.

ZINTZARAS, E. e LAU, J. Synthesis of genetic association studies for pertinent gene-disease associations requires appropriate methodological and statistical approaches. J Clin Epidemiol, v.61, n.7, Jul, p.634-45. 2008.

APÊNDICE 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Realização de Teste Genético

Título do Projeto: Base Molecular da Síndrome Hereditária do Câncer de Mama e/ou Ovário associada aos genes BRCA1 e BRCA2

Este projeto pretende identificar e caracterizar as mutações (alterações) nos genes BRCA1 e BRCA2 em pacientes e em seus familiares com suspeita da Síndrome Hereditária de Câncer de Mama e/ou Ovário, em atendimento no Ambulatório de Aconselhamento Genético no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Para participar da pesquisa, será realizada a retirada de 10 ml de sangue por uma punção de uma veia do braço. O local da punção pode apresentar leve dor ou inchaço que regredem espontaneamente. No laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, o sangue será utilizado para extração de DNA e análise dos genes BRCA1 e BRCA2. O material ficará estocado em freezer por tempo indeterminado e não será disponibilizado para outras pesquisas sem sua prévia autorização.

A sua identidade e as informações obtidas durante a pesquisa serão confidenciais e somente membros da equipe terão acesso durante o processo, entretanto, você não é obrigado a continuar participando do projeto e pode a qualquer momento pedir para que os seus dados não façam parte da pesquisa, sem que deixe de ser tratado como os demais pacientes assistidos na instituição. Também poderá requisitar, particularmente, seus dados, os dados referentes à análise do seu DNA e orientação adicional, fornecidas pelo pesquisador. Además, não haverá qualquer custo por você estar participando deste trabalho, portanto não haverá nenhuma forma de pagamento pela sua participação.

Assim, declaro que fui esclarecido:

- Sobre as características da Síndrome Hereditária do Câncer de Mama e/ou Ovário;
- Sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento sobre procedimentos, riscos, benefícios e as limitações do teste genético ao qual serei submetido;
- Sobre a minha liberdade em retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo ao acompanhamento médico e continuidade do meu tratamento;
- Sobre o não recebimento de nenhum tipo de remuneração financeira;
- Sobre a segurança de que minha identidade será preservada, que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais e que o DNA do meu sangue armazenado no hospital será utilizado apenas para este projeto;

Concordo em participar deste estudo.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Nome do paciente: _____

Local de Nascimento: _____ Data de nascimento: __/__/__

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____ Fone: _____

Assinatura do paciente ou responsável: _____

Assinatura do pesquisador responsável: _____

Fone para contato: (16) 3602-2598 ou 2101-9368

APÊNDICE 2 – História pessoal e familiar de câncer de mama e/ou ovário e o perfil das mutações encontradas no grupo de pacientes.

Pacientes	História Pessoal	Histórico Familiar	Mutações Patogênicas	Mutações Não Patogênicas
2692	Ca de mama bilateral aos 61 e 62 anos.	Duas irmãs com Ca de mama aos 53 e 55 anos		IVS7-34C>T ; Asp693Asn; Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu1038Gly;Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly; IVS17-53C>T
2697	Ca de mama aos 45 anos	-----		Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu 1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly
2699	Ca de mama aos 35 anos	Duas primas com Ca de mama aos 30 e 43 anos		IVS7-34C>T ; Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu1038Gly; Ser1040Asn;Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly
2719	Ca de mama aos 37 anos	Mãe com Ca de mama aos 33 anos		Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu1038Gly; Ser1140Gly;Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly
2723	Ca de mama aos 31 anos	Mãe com Ca de mama aos 52 anos e avó com Ca mama		-----
2724	Ca de mama aos 28 anos	Duas tias avós maternas com Ca mama aos 42 e 70 anos e uma tia avó paterna com Ca de mama aos 50 anos		IVS7-34C>T ; Gln356Arg; His771His; Pro871Leu
2726	Ca de mama aos 25 anos	-----		Pro871Leu
2727	-----	Três irmãs com Ca de mama aos 32, 33 e 40 anos. Mãe com Ca de mama bilateral aos 78 anos e duas tias paternas com Ca de mama		Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly; Met1652Ile
2730	Ca de mama aos 32 anos	Duas irmãs com Ca de mama aos 33 e 40 anos. Mãe com Ca de mama bilateral aos 78 anos e duas tias paternas com Ca de mama		Ser694Ser; Pro871Leu; Glu1004Glu;Glu1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly; Met1652Ile
2731	Ca de mama aos 30 anos	-----		S616del; Pro871Leu; Ser1140Gly
2739	Ca de mama aos 43 anos	Uma prima e uma irmã com Ca de mama aos 35 e 30 anos		IVS8-57delT; Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu 1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly
2740	Ca de mama aos 30 anos	Uma prima e uma irmã com Ca de mama aos 35 e 43 anos		IVS7-34C>T ; Pro871Leu

Continua...

APÊNDICE 2 – História pessoal e familiar de câncer de mama e/ou ovário e o perfil das mutações encontradas no grupo de pacientes.

2742	Ca de mama aos 41 anos	-----		Ser694Ser; Pro871Leu; Glu 1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly
2746	Ca de mama bilateral aos 35 e 36 anos	Uma irmã com Ca de mama aos 35 anos e uma sobrinha com Ca de mama aos 32 anos	Deleção dos éxons 16 e 17 em heterozigose	Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly
2750	Ca de mama aos 35 anos	-----		Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu 1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly
2753	Ca de mama aos 40 anos	-----		Ser694Ser; Pro871Leu; Glu 1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly
2754	Ca de mama aos 41 anos	Tia paterna com Ca de mama aos 50 anos		-----
2756	Ca de ovário aos 57 anos	-----		IVS7-34C>T
2760	Ca de mama aos 35 anos	-----		Ser694Ser; Pro871Leu; Glu 1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly
2761	Ca de ovário aos 30 anos	-----		-----
2766	-----	Mãe com Ca de mama e ovário aos 35 anos		Ser1613Gly
2767	Ca de mama aos 33 anos	-----		IVS7-34C>T; Ser1040Asn; Ser1613Gly
2774	Ca de mama aos 35 anos	Mãe e avó materna com Ca de mama aos 57 anos, duas tias avós maternas com Ca de mama ≥ 50 anos. Uma delas teve três filhas falecidas com Ca mama diagnostiCados ≥ 50 anos		Ser694Ser; Lis1183Arg
2775	Ca de mama aos 57 anos	Uma irmã com Ca de ovário aos 64 anos e outra irmã com Ca de mama aos 52 anos e Ca de ovário aos 64 anos		IVS7-34C>T; Gln356Arg
2779	Ca de mama aos 35 anos	-----		IVS8-57delT; Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu 1038Gly; Ser1436Ser
2781	Ca de ovário aos 51 anos	-----		-----
2783	Ca de mama aos 26 anos	Irmã com Ca de mama aos 36 anos, tia paterna e materna com Ca de mama <40		IVS7-34C>T; Pro871Leu

Continua...

APÊNDICE 2 – História pessoal e familiar de câncer de mama e/ou ovário e o perfil das mutações encontradas no grupo de pacientes.

2784	Ca de mama aos 36 anos	Irmã com Ca de mama aos 26 anos, tia paterna e materna com Ca de mama <40		IVS8-57delT; Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu 1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly
2785	Ca de ovário aos 42 anos	-----		IVS7-34C>T; Ser1040Asn
2794	Ca de mama aos 34 anos	-----		IVS8-57delT; Ser694Ser; Pro871Leu; Glu 1038Gly; Ser1613Gly
2801	Ca de mama aos 30 anos	-----		IVS8-57delT; Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu 1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly
2802	-----	Mãe falecida com Ca de mama aos 38 anos		Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu 1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly
2811	-----	Quatro tias maternas com Ca de mama < 50 anos		IVS7-34C>T; IVS8-57delT; Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu 1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly Pro871Leu; IVS17-53C>T
2812	Ca de mama aos 26 anos	Avó falecida com Ca de mama aos 42 anos		IVS7-34C>T ; Asp693Asn; Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu 1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly; IVS17-53C>T
2815	Ca de mama aos 34 anos	-----		
2817	Ca de mama aos 36 e Ca de ovário aos 37 anos	-----		IVS21+15G>C
2821	Ca de ovário aos 42 anos	-----		IVS7-34C>T
2847	Ca de mama aos 23 anos	-----		IVS7-34C>T ; Ser1040Asn; Val1117Ile
2848	Ca de mama aos 29 anos	Do lado paterno, uma prima com Ca de mama aos 30 anos e uma tia avó com Ca de mama aos 34 anos e Ca de ovário aos 54 anos que teve uma filha, já falecida, com Ca de mama aos 23 anos. Do lado materno, uma tia avó com Ca de mama aos 34 anos	Deleção do éxon 19 em heterozigose	IVS8-57delT; Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu 1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly
2850	Ca de mama aos 36 anos	-----		IVS8-57delT; Ser694Ser; His771His; Pro871Leu; Glu1038Gly; Lis1183Arg; Ser1436Ser; Ser1613Gly

Ca= câncer

APÊNDICE 3 - Resultados de HRM e sequenciamento de DNA das demais mutações descritas na Tabela 2 em ordem crescente em relação aos éxons.

Figura A3.1. A) Curvas de melting específicas para cada genótipo identificado no íntron 8 do gene BRCA1. B) Representação esquemática da região amplificada do íntron 8 contendo a mutação IVS7-34C>T; B1) Resultado do sequenciamento de uma amostra com genótipo normal (curvas de melting em roxo); B2) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação IVS7-34C>T em heterozigose (curva de melting em azul).

Figura A3.2. A) Curvas de melting específicas para cada genótipo identificado no éxon 11 do gene BRCA1. B) Representação esquemática da região amplificada do éxon 11 contendo a mutação Gln356Arg; B1) Resultado do sequenciamento de uma amostra com genótipo normal (curvas de melting em verde); B2) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Gln356Arg em heterozigose (curva de melting em azul).

Figura A3.3. A) Curvas de melting específicas para cada genótipo identificado no éxon 11 do gene BRCA1. B) Representação esquemática da região amplificada do éxon 11 contendo a mutação S616del; B1) Resultado do sequenciamento da amostra com genótipo normal (curvas de melting em verde); B2) Resultado do sequenciamento da amostra com a mutação S616del em heterozigose (curva de melting em vermelho), onde a deleção de três bases nitrogenadas (TCT) acarreta em um erro de leitura evidenciado pela formação de picos duplos no eletroferograma a partir do ponto onde ocorre a mutação.

Figura A3.4. A) Curvas de melting específicas para cada genótipo identificado no éxon 11 do gene BRCA1. B) Representação esquemática da região amplificada do éxon 11 contendo as mutações Asp693Asn e Ser694Ser; B1) Resultado do sequenciamento de uma amostra com genótipo normal para (curvas de melting em marrom); B2) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Ser694Ser em heterozigose (curva de melting em amarelo); B3) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Ser694Ser em homozigose (curva de melting em vermelho); B4) Resultado do sequenciamento de uma amostra com ambas as mutações, Asp693Asn e Ser694Ser, em heterozigose (curva de melting em verde).

Figura A3.5. Leu771Leu A) Curvas de melting específicas para cada genótipo identificado no éxon 11 do gene BRCA1. B) Representação esquemática da região amplificada do éxon 11 contendo a mutação Leu771Leu; B1) Resultado do sequenciamento de uma amostra com genótipo normal (curvas de melting em azul); B2) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Leu771Leu em heterozigose (curva de melting em vermelho); B3) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Leu771Leu em homozigose (curva de melting em verde).

Figura A3.6. A) Curvas de melting específicas para cada genótipo identificado no éxon 11 do gene BRCA1. B) Representação esquemática da região amplificada do éxon 11 contendo a mutação Pro871Leu; B1) Resultado do sequenciamento de uma amostra com genótipo normal (curvas de melting em verde); B2) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Pro871Leu em heterozigose (curva de melting em azul); B3) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Leu771Leu em homozigose (curva de melting em vermelho).

Figura A3.7. A) Curvas de melting específicas para cada genótipo identificado no éxon 11 do gene BRCA1. B) Representação esquemática da região amplificada do éxon 11 contendo a mutação Glu1004Glu; B1) Resultados do sequenciamento de uma amostra com genótipo normal (curvas de melting em azul); B2) Resultados do sequenciamento de uma amostra com a mutação Glu1004Glu em heterozigose (curva de melting em roxo).

Figura A3.8. A) Curvas de melting específicas para cada genótipo identificado no éxon 11 do gene BRCA1. B) Representação esquemática da região amplificada do éxon 11 contendo as mutações Ser1140Gli e Lis1183Arg; B1+B3) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Ser1140Gli em heterozigose (curvas de melting em azul); B1+B4) Resultado do sequenciamento de uma amostra com as mutações Ser1140Gli e Lis1183Arg, ambas em heterozigose (curva de melting em rosa); B2+B3) Resultado do sequenciamento de uma amostra com genótipo normal (curvas de melting em laranja); B2+B4) Resultado do sequenciamento de uma amostra contendo a mutação missense Lis1183Arg em heterozigose (curva de melting em verde); B2+B5) Resultado do sequenciamento de uma amostra contendo a mutação missense Lis1183Arg em homozigose (curva de melting em verde claro).

Figura A3.9. A) Curvas de melting específicas para cada genótipo identificado no éxon 13 do gene BRCA1. B) Representação esquemática da região amplificada do éxon 13 contendo a mutação Ser1436Ser; B1) Resultado do sequenciamento de uma amostra com genótipo normal (curvas de melting em vermelho); B2) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Ser1436Ser em heterozigose (curva de melting em azul); B3) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação Ser1436Ser em homozigose (curva de melting em verde).

Figura A3.10. A) Curvas de melting específicas para cada genótipo identificado no íntron 18 do gene BRCA1. B) Representação esquemática da região amplificada do íntron 18 contendo a mutação IVS17-53C>T; B1) Resultados do sequenciamento de uma amostra com genótipo normal (curvas de melting em azul); B2) Resultados do sequenciamento de uma amostra com a mutação IVS17-53C>T em heterozigose (curva de melting em verde).

Figura A3.11. A) Curvas de melting específicas para cada genótipo identificado no íntron 22 do gene BRCA1. B) Representação esquemática da região amplificada do íntron 22 contendo a mutação IVS21+15G>C; B1) Resultado do sequenciamento de uma amostra com genótipo normal para essa mutação (curvas de melting em vermelho); B2) Resultado do sequenciamento de uma amostra com a mutação IVS21+15G>C em heterozigose (curva de melting em azul).

APÊNDICE 4 - Heredograma da família da paciente 2746 com a deleção em heterozigose dos éxons 16 e 17 do gene BRCA1. Seta indica o probando; idade atual está indicada abaixo dos indivíduos, Dx= idade ao diagnóstico. Ob= idade de óbito.

APÊNDICE 5 - Heredograma da família da paciente 2848 com a deleção em heterozigose do éxon 19 do gene BRCA1. Seta indica o probando; idade atual está indicada abaixo dos indivíduos, Dx= idade ao diagnóstico.

ANEXO 1- Lista das sequências de primers para o gene BRCA1 modificada de Leeneer *et al.*, 2008.

Éxon	Tam. Frag. (pb)	Nome dos Primers	Sequência
2	326	2.1/2F	ATGATAAAATGAAGTTGTC
		2.1/2R	CTTCCCTAGTATGTAAGGTC
3	191	3F	GCTCAAAGTTGAACTTATTCAC
		3R	CAAAAGCTAATAATGGAGCCAC
5	193	5F	GCCTTTTGAGTATTCTTTCTAC
		5R	TCCTACTGTGGTTGCTTCC
6	173	6F	GGTTGATAATCACTTGCTG
		6R	CACTTGAGTGTCATTCTTG
7	334	7F	GAGCATACATAGGGTTTCTCTTGG
		7R	GAAGAAGAAGAAGAAAACAAATGG
8	240	8F	GTCAAGTTTCTCTTCAGGAG
		8R	CTATAAGATAAGGAATCCAGC
9	213	9F	CCTGCCACAGTAGATGCTCAG
		9R	GGAAAATACCAGCTTCATAGACAAAGG
10	180	10F	CATTTGACAGTTCTGCATAC
		10R	CTTTCAGTGCCTGTAAAGTTG
11	340	11.1/2F	CCAAGGTGTATGAAGTATG
		11.1/2R	ATAAACTGCTGTTCTCATGC
	271	11.3F	GCACAAATACTCATGCCAGCTC
		11.3R	CTAGGATTCTCTGAGCATGGC
	221	11.4F	GTGTGAGAGAAAAGAATGG
		11.4R	CATCTACCTCATTTAGAACG
	281	11.5F	GAATCAAATGCCAAAGTAGC
		11.5R	CGCTTTAATTTATTTGTGAGGG
	289	11.6F	CTAATTATAGGAGCATTTGTTAC
		11.6R	CTTTTTTCGAGTGATTCTATTGG
	236	11.7F	CAAAAGGTGATTCTATTTCAG
		11.7R	ATTAGGTGGGCTTAGATTTC
	241	11.8F	GGAAGTCTTCTACCAGGC
		11.8R	GTAACTTCAGCTCTGGGAAA
	265	11.9F	GGTAAAGAACCTGCAACTGGAG
		11.9R	GCAAAACCCTTTCTCCACTTAAC
	289	11-10F	CCTAGCCTTCCAAGAGAAG
		11-10R	CCATGAATTAGTCCCTTGG
	273	11-11F	GGAAGGC AAAACAGAAC
		11-11R	CACATTCCTCTTCTGCATTTC
	202	11-12F	CATTCAAGGTTTCAAAGCGCC
		11-12R	CCAACCACAGGAAAGCCT
	211	11-13F	CCAAAAGTCACTTTTGAATGTG
		11-13R	TAATGAGTCCAGTTTCGTTG
	221	11-14F	GCCAAATGTAGTATCAAAGGAGG
		11-14R	CCCATTCTCTTTCAGGTGA

Continua...

ANEXO 1 Lista das sequências de primers para o gene **BRCA1** modificada de Leeneer *et al.*, 2008. Continuação.

Éxon	Tam. Frag. (pb)	Nome dos Primers	Sequência
11	213	11-15F	GAAAAATCTGCTAGAGGAAAAC
		11-15R	TCATCACTGGAACCTATTTC
	253	11.16F	GTAGGTTCAGTACTAATGAAG
		11.16R	CTGAAATCAGATATGGAGAGAAATC
	141	11.17F	GCAAGAATATGAAGAAGTAGTTC
		11.17R	CCATCATCTAACAGGTCATC
	234	11.18F	CCATATCTGATTTCAGATAACTTA
		11.18R	GATAAGTTCTCTTCTGAGGACTC
	258	11.19F	GCAGGAGTCCTAGCCCTTTC
		11.19R	GGTACTGCAGTCATTTAAGCTATTC
	178	11.20F	GTCTGTCTAAGAACACAGAGG
		11.20R	CCAATCAAGAAAGGATCCTGG
	251	11.21F	GTTTTCTTCACAGTGCAGTG
		11.21R	AAATAGACTGGGGCAAACAC
12	246	12F	GCAAGTTGCAGCGTTTATAG
		12R	GGATACATACTACTGAATGCAAAG
13	260	13F	GGAAAGCTTCTCAAAGTATTTC
		13R	GCTTAAGATATCAGTGTTTGG
14	216	14F	CAGAACAAAGCAGTAAAGTAG
		14R	AAGATGTCAGATACCACAGC
15	166	15.1F	CAATTGGTGGCGATGGTTTTTC
		15.1R	CTCCTCCACATCAACAACC
	163	15.2F	GAAACTACCCATCTCAAGAGGAG
		15.2R	CAGAGTAAAATCAAAGTGTTTGTTC
16	263	16.1F	CAGAGACCAGAACTTTGTAATTCAAC
		16.1R	CCAGCAGTATCAGTAGTATGAGC
	218	16.2F	GAAAGTTGCAGAATCTGCCC
		16.2R	GTTGTTAAGTCTTAGTCATTAGGG
17	173	17F	GTGCTAGAGGTAACATCATG
		17R	CAGCAGATGCAAGGTATTC
18	201	18F	GGCTCTTTAGCTTCTTAGGAC
		18R	TCTGAGGTGTAAAGGGAGG
19	162	19F	CCTCTCTATCTCCGTGAAAAGAG
		19R	CTATATGACTGAATGAATATCTCTGG
20	187	20F	CTGCTCCACTTCCATTGAAG
		20R	GAGATTTTTGTCAACTTGAGGG
21	142	21F	CCTTCTCTCCATTCCCCTG
		21R	AAGGCTGGTGCTGGAATC
22	170	22F	GCCTGGGTAAAGTATGCAG
		22R	ATTGTGTCCTCCCTCTCTG
23	155	23F	GTGACAGTTCCAGTAGTCCTAC
		23R	CCCATATAGCACAGGTACATGC
24	212	24F	GAGCCTAGTCCAGGAGAATG
		24R	TGTGGCTCTGTACCTGTGG

ANEXO 2 - Sondas contidas no kit SALSA MLPA KIT P087-B1 BRCA1.

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position reference BRCA1
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA	
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation	
100	X-fragment: Specific for the X chromosome	
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome	
130	Reference probe 02269-L01761	1p36
136	Reference probe 02283-L01774	13q13 (<i>BRCA2, exon 1</i>)
148	BRCA1 probe 02807-L01268	Promoter region
157	BRCA1 probe 02808-L02168	Promoter region
167	BRCA1 probe 02810-L02239	Exon 2
175	BRCA1 probe 02811-L02240	Exon 3
185	BRCA1 probe 03398-L02254	Exon 18
193	Reference probe 03217-L02642	10q25
200 *	BRCA1 probe 11457-L12189	Exon 22
208	BRCA1 probe 02813-L02242	Exon 6
219	BRCA1 probe 02814-L02243	Exon 7
226	BRCA1 probe 02815-L02244	Exon 8
234	BRCA1 probe 02816-L02245	Exon 9
244	BRCA1 probe 03411-L02074	Exon 13
256	Reference probe 02279-L01770	13q13 (<i>BRCA2, exon 11</i>)
263 *	BRCA1 probe 11802-L12190	Exon 14
276	BRCA1 probe 02818-L02247	Exon 11
287	BRCA1 probe 02819-L02248	Exon 12
295	BRCA1 probe 03890-L03337	Exon 13
310 *	Reference probe 09809-L10644	13q13 (<i>BRCA2, exon 5</i>)
319	Reference probe 00495-L03128	12p12
329	BRCA1 probe 02821-L02250	Exon 15
337	BRCA1 probe 02822-L02251	Exon 16
346 ¥	BRCA1 probe 03395-L12877	Exon 5
355	BRCA1 probe 03822-L03285	Exon 10
364	BRCA1 probe 02826-L02255	Exon 19
371	Reference probe 02667-L02134	11q22 (<i>ATM, exon 25</i>)
380	Reference probe 00655-L03268	4q27
390	BRCA1 probe 02827-L02256	Exon 20
397	BRCA1 probe 02828-L02257	Exon 21
408 ¥	BRCA1 probe 03397-L13116	Exon 17
416	BRCA1 probe 02830-L02259	Exon 23
425 *	BRCA1 probe 04578-L04795	Exon 24
436 ¥	BRCA1 probe 02100-L02537	Exon 1
445	Reference probe 02445-L01409	16p13
454	Reference probe 02355-L01415	9q34