## **Karina Augusto Escobar**

# Determinação de mutações e polimorfismos nos genes BRCA1 e BRCA2 em pacientes com câncer de mama com indicação para teste genético

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Oncologia Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Miriam Hatsue Honda Federico

São Paulo 2011

#### Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Escobar, Karina Augusto

Determinação de mutações e polimorfismos nos genes BRCA1 e BRCA2 em pacientes com câncer de mama com indicação para teste genético / Karina Augusto Escobar. -- São Paulo, 2011.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.

Orientadora: Miriam Hatsue Honda Federico.

Descritores: 1.Genes BRCA1 2.Genes BRCA2 3.Neoplasias de mama/genética 4.Mutação

USP/FM/DBD-162/11



Aos meus pais, Pedro e Maria da Conceição, por compreenderem meu esforço e dedicação, pela educação e apoio concedido em todos os momentos da minha vida.



À Profa. Dra. Miriam Hatsue Honda Federico, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e por toda a orientação.

À Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani e ao Prof. Dr. Roger Chammas, os chefes do laboratório durante o desenvolvimento do meu trabalho. Obrigada por acreditarem em mim e me admitirem no programa de pós-graduação.

À Dra. Maria del Pilar Estevez Diz por iniciar este belo trabalho, pelo fornecimento dos dados clínicos necessários e por toda a atenção, ajuda e simpatia.

Às Dras. Simone Maistro, Fátima Solange Pasini, Flávia Regina Rotea Mangone e ao Dr. Igor Moisés Longo Snitcovsky, pelo ensinamento e orientação na ausência da Dra. Miriam.

A Bruno Ferencz Papp Cadima, pois além de companheiro de grupo, bancada e estudos dentro e fora do laboratório é um namorado exemplar, que me apóia e acredita em meu potencial. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Às amigas e companheiras no grupo de Cabeça e Pescoço, Karen Cristina de Sant'anna Brunialti e Lilian Pires Barbeta, pelo apoio e incentivo que vocês sempre me deram. Vocês são muito especiais para mim.

Aos companheiros de bancada e estudos: Adriana Priscila Trapé, Laura Tojeiro Campos, Simone Crestoni Fernandes, Cintia Milani, Yuri Nagamine Urata, Mateus de Camargo Barros Filho, Paulo Roberto del Valle, Iara Sant'anna Rodrigues, Arthur William Alvarenga, Natália Bromberg, Elen Bastos, Victor Celso, Juliana Yamaguchi, Marcela Catanoso, Camila Faria, Camila Máximo, Maira

Martinez, Suzana Terumi Honda, Carla Pinheiro, Cristina Campofiorito, Leonardo "Saga", Cibele Ferrari, Ticiana Bevenutti e Rodrigo Guindalini. Obrigada pelo apoio, carinho e amizade, pelos momentos agradáveis que jamais esquecerei.

Às Dras. Maria Lúcia Hirata Katayama e Rosimeire Aparecida Roela, pelo companheirismo durante toda minha estadia no laboratório.

À Maria José Benevides, Rosilene Arruda e Elizangela Dias, pelo auxílio e atenção que sempre me dedicaram.

Aos funcionários Ivonete Lima, Jair Cláudio e Willame Macedo, por proporcionarem um ambiente de trabalho adequado e pelos momentos de descontração.

A todos dos grupos de Adesão Celular e Cultura Celular pelo companheirismo.

Ao LIM56 e à Profa. Dra. Maria Aparecida Nagai, por permitirem que eu utilizasse os seqüenciadores MegaBACE-1000 durante todo o meu trabalho.

Ao LIM15, por permitir que eu utilizasse a centrífuga refrigerada enquanto ainda não tínhamos uma no LIM24.

A todos os indivíduos que doaram o material biológico para que eu pudesse realizar meu trabalho. Sem vocês nada disso seria possível.

Aos meus pais, que além do incentivo verbal, sempre investiram em minha educação e proporcionaram condições para que eu chegasse até aqui. Vocês são os responsáveis por tudo que sou hoje, como profissional e ser humano. Completando o perfeito significado de "família", também devo agradecer

às minhas irmãs, Érika e Aline, e aos meus tios, Mariluce Augusto, Lucinda Augusto Braga e Dalmo Julio Braga, por me ajudarem a manter um dos pés no chão e me incentivarem quando eu precisei.

À Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela estrutura cedida.

À FAPESP e ao CNPq, pelo auxílio financeiro proporcionado.

# SUMÁRIO

1.	Int	trod	ução	0	1
	1.	1	BR	CA1, BRCA2 e o Câncer	2
		1.1	.1	BRCA1	2
		1.1	.2	BRCA2	4
		1.1	.3	Características em comum	5
	1.	2	Ide	ntificação de pacientes com predisposição ao câncer hereditário	8
		1.2	.1	Rastreamento, prevenção e tratamento	11
	1.	3	BR	CA1, BRCA2 e o Brasil	14
2.		Ob	jetiv	os	19
	2.	1	Obj	etivos Gerais	19
	2.	2	Obj	etivos Específicos	19
3.		Casuística e Métodos		tica e Métodos	21
	3.	1	Cas	suística	21
	3.	2	Mé	todos	23
		3.2	.1	Separação de leucócitos do sangue periférico	23
		3.2	.2	Extração de DNA de leucócitos	24
		3.2	.3	Determinação da concentração do DNA	25
		3.2	.4	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	25
		3.2	.5	Sequenciamento direto	30
		3.2	.6	Amplificação Dependente da Ligação de Múltiplas Sondas (MLPA)	33
4.		Resulta		ados	45
	4.	1	Car	acterização das amostras	45
	4.	2	Car	acterização molecular	48
5. Discussão					71
6.	5. Conclusões				

7. Referências	83
8. Anexos	102
Anexo 1: Termo de consentimento pós informação aplicado aos pacientes	102
Anexo 2: Tabela com o modelo proposto por Frank para calcular a preval	ência
de mutações em BRCA1 e BRCA2.	107
Anexo 3: Tabela com o modelo proposto por Evans para calcular a preval	ência
de mutações em BRCA1 e BRCA2.	108
Anexo 4: Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hos	spital.
	100

# **LISTA DE FIGURAS**

Figura 01: Estrutura do gene BRCA1, modificada de Narod & Foull	æ,
2004	3
Figura 02: Estrutura do gene BRCA2, modificada de Narod & Foull	æs,
2004	5
Figura 03: Esquema mostrando a incorporação aleatória dos dideoxinucleotío	deos
(ddNTPs)	31
Figura 04: Etapas referentes à reação de MLPA	35
Figura 05: Gel de agarose representativo da qualidade dos produtos de PCR	48
Figura 06: Mutação frameshift 5382insC, no exon 20 de BRCA1	50
Figura 07: Heredograma da família de uma das pacientes (indicada pela s	seta)
com a mutação 5382insC	50
Figura 08: Heredograma da outra paciente (seta) portadora de 5382insC	51
Figura 09: Mutação nonsense R1751X, também no exon 20 de BRCA1	52
Figura 10: Heredograma da paciente (seta) portadora de R1751X	52
Figura 11: Deleção in frame VV1809del, no exon 23 de BRCA1	53
Figura 12: Mutação R71G, no exon 5 do gene BRCA1	54
Figura 13: Heredograma correspondente à família da paciente portadora	a da
mutação R71G (seta)	55
Figura 14: Eletroferograma evidenciando a mutação R2318X no exon 13	3 de
BRCA2	58

Figura 15: Heredograma da paciente portadora da mutação R2318X (seta)	59
Figura 16: R3128X, do exon 25 de BRCA2, onde ocorre a troca de C	por T
(negrito)	60
Figura 17: Heredograma correspondente à paciente portadora de R3	3128X
(seta)	60
Figura 18: Mutação 5844del5, no exon 11 do gene BRCA2	61
Figura 19: Heredograma da paciente portadora da mutação 5844del5 (seta)	62
Figura 20: Mutação 6633del5, que ocorre no exon 11 de BRCA2	63
Figura 21: Heredograma da paciente portadora de 6633del5 (seta)	64
Figura 22: Mutação 6610insTT, também no exon 11 de BRCA2	65
Figura 23: Caracterização da mutação 6610insTT utilizando o software	Gene
Runner	66
Figura 24: Heredograma da paciente portadora de 6610insTT (seta)	67
Figura 25: Modelo de resultado de MLPA gerado pelo software Coffalyser p	oara o
kit P002C1, do gene BRCA1	70

# LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Oligonucleotídeos iniciadores para os exons do gene BRCA1	28
Tabela 02: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para BRCA2	29
Tabela 03: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para a reação	de
MLPA	36
Tabela 04: Sondas referentes a SALSA MLPA kit P002B	37
Tabela 05: Sondas referentes a SALSA MLPA kit P002C1	38
Tabela 06: Sondas referentes a SALSA MLPA kit P087	39
Tabela 07: Sondas referentes a SALSA MLPA kit P090	40
Tabela 08: Sondas referentes a SALSA MLPA kit P077	41
Tabela 09: Valores de risco relativos aos testes aplicados	46
Tabela 10: Dados clínico-patológicos dos pacientes com câncer de mama	47
Tabela 11: Lateralidade dos cânceres de mama	48
Tabela 12: Alterações encontradas em BRCA1	56
Tabela 13: Alterações encontradas em BRCA2	68

#### **RESUMO**

Introdução: Mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 são responsáveis por cerca de 50% dos casos de câncer de mama e/ou ovário hereditários. Atualmente não conhecemos o perfil de mutações destes genes na população brasileira, com exceção de mutações fundadoras que ocorrem em grupos étnicos específicos. Objetivos: Detectar mutações e polimorfismos nos genes BRCA1 e BRCA2 em 73 pacientes com câncer de mama selecionadas para o teste genético. Casuística e métodos: Realizamos o sequenciamento direto e o teste de MLPA para os genes BRCA1 e BRCA2 em 73 indivíduos, sendo 63 pacientes com câncer de mama com risco maior ou igual a 10% de acordo com os critérios de Frank, Evans e BRCAPRO, dois pacientes com câncer de ovário e oito indivíduos saudáveis com forte histórico familiar de câncer ligado a mutações em BRCA1 e/ou BRCA2. Resultados: Encontramos 60 mutações no gene BRCA1: 13 alterações missense (incluindo a deletéria R71G), sete mutações sinônimas, uma mutação frameshift (a deletéria 5382insC), uma mutação nonsense (a deletéria R1751X), uma deleção in frame, uma alteração 3'UTR e 36 variantes intrônicas. Em BRCA2 encontramos 57 mutações, entre as quais 26 mutações missense, uma alteração 5'UTR, 11 mutações sinônimas, 14 variantes intrônicas, duas mutações nonsense (as deletérias R2318X e R3128X) e três mutações frameshift deletérias (5844del5, 6633del5 e 6610insTT). Nenhuma mutação foi detectada pelo teste de MLPA. Discussão e considerações finais: Nove de 73 indivíduos estudados são portadores de mutações deletérias, sendo que a mutação fundadora Ashkenazi 5382insC foi encontrada em duas pacientes não aparentadas e que outro grupo de pesquisa já reportou sua alta frequência numa população paulistana. As alterações de significado clínico desconhecido foram encontradas em toda a extensão dos genes BRCA1 e BRCA2 e são inúmeras. Algumas apareceram em somente uma paciente, o que nos leva a pensar que talvez uma ou algumas destas mutações tenham algum efeito patogênico, como a mutação 6610insTT, que gera uma proteína incompleta e foi encontrada em três gerações de uma família. A técnica de MLPA não detectou grandes rearranjos em ambos os genes, mostrando que este tipo de alteração genética não é freqüente em nossa coorte e que talvez esta seja uma característica mais prevalente em populações menos miscigenadas. Salientamos, portanto, a importância de ampliar este estudo e de estimular pesquisas futuras, visando um aconselhamento genético eficiente, com a diminuição do número de casos inconclusivos gerados pelas variantes de significado indeterminado e o acompanhamento clínico das famílias.

#### **ABSTRACT**

Introduction: Mutation in BRCA1 and BRCA2 genes are responsible for more than 50% of hereditarian breast and ovarian cancer cases. Nowadays, we still don't know the Brazilian mutation profile for these genes, except when founder mutations occur in specific ethnic groups. Objetives: Detection of mutation and polymorphisms in BRCA1 and BRCA2 genes in 73 breast cancer patients selected for genetic testing. Casuistic and methods: we have realized direct sequencing of BRCA1 and BRCA2 in 73 patients, whose 63 have had breast cancer and showed at least 10% of risk according to Frank, Evans and BRCAPRO, two patients with ovarian cancer and eight healthy individuals of strong family history of cancer linked to mutations in BRCA1 and BRCA2. Results: We have found 60 mutations in BRCA1: 13 missense mutations (including the deleterious R71G), seven synonymous mutations, one frameshift mutation (the deleterious 5382insC), one nonsense mutation (the deleterious R1751X), one in-frame deletion, one 3'UTR mutation and 36 intronic variants. In BRCA2 we have found 57 mutations: 26 missense mutations, one 5'UTR mutation, 11 synonymous mutations, 14 intronic variants, two nonsense mutations (the deleterious R2318X and R3128X) and three frameshift mutations (5844del5, 6610insTT and 6633del5). No mutation was detected by MLPA technique. Discussion and final considerations: Nine of 73 studied individuals carry deleterious mutations. Among them, the Ashkenazi founder mutation 5382insC has been found in two unrelated patients and it was previously reported by another research group for its high prevalence on a population from São Paulo. Alterations of unknown clinical significance have been found all over BRCA1 and BRCA2 gene extension and are countless. Some of them are shown only in one patient, leading us to think that maybe one or a few might have a pathogenic effect, like 6610insTT, which leads to a BRCA2 incomplete protein and was shown in 3 generations of a family. MLPA technique have not detected large genomic rearrangements in both genes, showing that this kind of mutation is not frequent on our cohort and maybe this genetic alteration characterizes less miscigenated populations. So, we emphasize the importance of enlarge this study and stimulate future researches, aiming an efficient genetic counseling, decreasing inconclusive cases generated by unknown clinical significance variants, and follow up of affected families.

# 1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença resultante do acúmulo de múltiplos eventos genéticos, onde a inativação de genes supressores de tumor e a ativação de oncogenes levam à perda do controle do ciclo celular e ao acúmulo de erros no DNA. Estas alterações conferem certa vantagem de sobrevivência celular e transformam uma célula normal numa variante maligna. O câncer surge de um processo clonal destas variantes malignas, levando a deficiências imunológicas que permitem o seu desenvolvimento e debilitam o paciente (Foulds, 1954; Nowell 1976; Renan, 1993). É uma das principais causas de morte em todo o mundo e, 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 por câncer (de 7.9 milhões para 11.5 milhões) e que neste mesmo período o número de casos novos salte de 11.3 milhões para 15.5 milhões. O câncer é a segunda maior causa de morte na maioria dos países desenvolvidos, perdendo somente para as doenças cardiovasculares, e há fortes evidências de que o mesmo esteja acontecendo nos países em desenvolvimento, como o Brasil.

A WHO estima que, mundialmente, mais de um milhão de mulheres sejam anualmente acometidas pelo câncer de mama. Este é o segundo tipo de câncer mais freqüente em todo o mundo e o primeiro entre as mulheres. Destes casos, estima-se que cerca de 5% a 10% sejam familiares e que pelo menos

metade deles seja causada por mutações germinativas nos genes de alta penetrância BRCA1 e BRCA2, transmitidas de maneira autossômica dominante (Szabo & King, 1995) e que causam a Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de mama e Ovário (*Hereditary Breast and Ovarian Cancer*, ou HBOC). A princípio, estes números parecem pequenos, mas ao considerarmos a estimativa de quase 49.240 casos novos em 2010 e que as taxas de mortalidade continuam altas no Brasil, provavelmente porque muitas vezes o diagnóstico ainda é realizado em estádios avançados (INCA, 2010), o câncer familiar ou hereditário passa a constituir um problema a ser considerado.

### 1.1 BRCA1, BRCA2 E O CÂNCER

#### 1.1.1 BRCA1

O gene BRCA1 foi mapeado por Hall e colaboradores em 1990 a partir de análises de ligação envolvendo famílias com vários casos de câncer de mama, sendo clonado e caracterizado em 1994 por Miki e colaboradores. Este supressor tumoral atua em processos celulares de extrema importância, como o reparo de DNA por excisão de nucleotídeos, regulação dos pontos de controle do ciclo celular, ubiquitinação de proteínas, remodelamento da cromatina e silenciamento do cromossomo X (Wu, 1996; Buller, 1999; Xu, 1999; Bochar, 2000; Le Page, 2000; Wang, 2000; Hartman&Ford, 2002).

Localizado no cromossomo 17 (17q12-q21), este gene é composto de 81.155 pares de base, a região codificante é dividida em 22 exons com 5592 pares de base (os exons 1 e 4 não são traduzidos). A proteína codificada é composta de 1.863 aminoácidos, com um motivo dedo-de-zinco (zinc finger, ou ring finger domain) importante para a atividade de degradação via ubiquitina-ligase e interação com outras proteínas na porção amino-terminal. Além disso, encontramos dois domínios de localização nuclear importantes para a interação com proteínas de controle do ciclo celular, como a p53, um domínio de ligação ao DNA (DNA binding domain) na região central da proteína que permite a checagem do ciclo celular, uma região SCD (cluster de sequências de serinas e treoninas importantes para a fosforilação de ATM e, na porção carboxi-terminal, dois domínios BRCT formados por aminoácidos de carga negativa e importantes para a manutenção da estabilidade da proteína e processos de transcrição celular, conforme figura 01 (Monteiro, 1996; Wu, 1996; Scully, 1997a e 1997b; Deng & Brodie, 2000; Wang, 2000; Venkitaraman, 2002; Yarden, 2002; Narod&Foulkes, 2004).



Figura 01: Estrutura do gene BRCA1, modificada de Narod & Foulkes, 2004.

#### 1.1.2 BRCA2

O gene BRCA2, cujas mutações são responsáveis por 32% dos casos hereditários, foi mapeado em 1994 & 1995 por Wooster e colaboradores e caracterizado no ano seguinte por Tavtigian e colaboradores. Localiza-se no cromossomo 13 (13q12-q13), possui 84.193 pares de base, a região codificante é dividida em 26 exons (o exon 1 não é traduzido) que compreendem 10254 pares de base e sua proteína é formada de 3.418 aminoácidos. A figura 02 esquematiza a proteína: na região N-terminal há um sinal de localização nuclear e um domínio de transativação, que são seguidos por oito repetições (o chamado BRC repeats domain) que compreendem o exon 11 em sua quase totalidade e são responsáveis pela interação com a proteína Rad51 - ambas atuam no processo de reparo de quebras duplas no DNA por recombinação homóloga. Na sequência, há um domínio de ligação ao DNA que se liga ao DNA fita simples, e a região Cterminal, com um domínio de ligação à p53, outro domínio de ligação à proteína Rad51 dependente de fosforilação por Cdk, além de dois domínios de sinalização nuclear, onde também se liga a proteína dss1, que estabiliza BRCA2 e age como cofator regulando a atividade de recombinação homóloga. BRCA2 é essencial para a atividade de recombinação homóloga, checkpoint mitótico e localização do centrossomo durante a citocinese, mostrando sua grande importância na manutenção da estabilidade genômica (Bignell, 1997; Milner, 1997; Sharan, S. K., 1997; Wang, 1997; Wong, 1997; Blackshear, 1998; Smith, 1999; Deng&Brodie, 2000; Kojic, 2003; Daniels, 2004; Narod&Foulkes, 2004; Niwa, 2009).

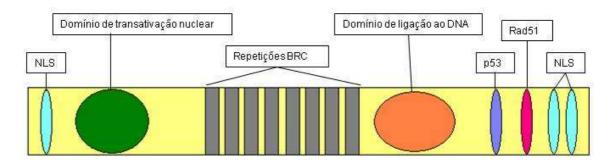


Figura 02: Estrutura do gene BRCA2, modificada de Narod & Foulkes, 2004.

#### 1.1.3 Características em comum

Os genes BRCA1 e BRCA2 estão envolvidos no reparo de quebras duplas no DNA por recombinação homóloga, contribuindo para a integridade do genoma e manutenção da estabilidade cromossômica. Ainda não se conhece muito sobre a função de BRCA2, mas sabe-se que mutações deletérias em ambos os alelos podem ser uma das causas da anemia de Fanconi-*like* ou causar morte durante o período embrionário. Já para o gene BRCA1, a homozigose neste caso é sempre letal durante a embriogênese (D'Andrea, 2007).

Diante do envolvimento em processos celulares de suma importância para a expressão gênica e a integridade genômica, não é difícil compreender que formas mutadas de BRCA1 e BRCA2 levam ao aparecimento de um câncer. Quando estes genes se apresentam de forma não funcional, a célula se torna incapaz de reparar as quebras duplas nas fitas de DNA pela recombinação homóloga (HR) e fica mais dependente de vias de reparo de DNA menos

eficientes, como a recombinação não homóloga e o anelamento de fita simples (Turner, Tutt & Ashworth, 2004). A instabilidade cromossômica originada pode promover a carcinogênese devido à perda da função destes genes, seja por silenciamento epigenético, mutação germinativa/somática ou aumento da transcrição de genes que exercem uma regulação negativa em sua expressão (Fasano & Muggia, 2009).

A penetrância das mutações em BRCA1 e BRCA2 ainda é um tema controverso, pois há uma variabilidade ente estudos realizados com diferentes populações e também entre famílias e familiares diferentes. No geral, o risco de desenvolver um câncer de mama aos 70 anos é de aproximadamente 60 a 70% para portadores de mutação BRCA1 e 45 a 55% para BRCA2. O risco de desenvolver um câncer de ovário aos 70 anos (incluindo carcinomas peritoneais e de tubas de falópio) é de 40% para portadores de mutações em BRCA1 e 20% para BRCA2 (Begg, 2008; Chen, 2007; Antoniou, 2003). A variabilidade desta penetrância não é muito bem compreendida até hoje, mas sabemos que fatores reprodutivos, riscos específicos de determinadas mutações e outros modificadores genéticos, como SNPs (polimorfismos de um único nucleotídeo) co-herdados, podem estar relacionados (Gayther, 1995 &1997; Antoniou, 2010).

A incidência de mutações em famílias de alto risco varia muito entre diferentes populações. Certas mutações podem ser específicas de uma família ou aparecer com alta freqüência em determinados grupos étnicos, o que é chamado de efeito fundador (Kuska, 1997). As mutações fundadoras têm origem em

populações que permanecem geneticamente isoladas por não se misturarem etnicamente, fazendo com que uma mutação normalmente rara continue presente e aumente sua freqüência neste grupo. Várias mutações fundadoras têm sido descritas na literatura (Thorlacius, 1996; Sarantaus, 2000; Vega, 2001). Exemplos clássicos são as mutações 185delAG e 5382insC em BRCA1 e 6174delT em BRCA2, que acometem de 2 a 2,5% dos judeus *Ashkenazi*, freqüência 10 a 50 vezes maior do que na população em geral (Friedman, 1995; Struewing, 1995 & 1997; Neuhausen, 1996; Roa, 1996; Szabo & King, 1997; Ferla, 2007). No final de 2010, Sagi e colaboradores publicaram um estudo provando que os judeus de origem Sefardita também são acometidos por mutações fundadoras: A1708E, no BRCA1, e IVS2+1G/A, no BRCA2. Além das mutações deletérias, os genes BRCA1 e BRCA2 podem apresentar polimorfismos que aumentam a predisposição ao câncer por afetar a expressão gênica, a tradução de proteínas e a estabilidade genômica (Spurdle, 2000).

Mutações nestes genes predispõem as portadoras ao aparecimento de tumores malignos de mama e, com uma freqüência um pouco menor, ao câncer de ovário e outros tumores associados (melanoma, leucemia, linfoma, trompas de Falópio e carcinomatose peritoneal para BRCA1 e mama masculina, próstata, pâncreas, colorretal, estômago, linfoma e melanoma para BRCA2), caracterizando a HBOC (Ford, 1998; Johansson, 1999; Niell, 2004).

Tipicamente, o câncer de mama em portadores de mutações em BRCA1 é um carcinoma ductal invasivo de alto grau nuclear e histológico, alta

proliferação e do tipo "triplo negativo" (negativo para a expressão de receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR) e Her2/neu (Her2)). O câncer de mama ligado a BRCA2 possui quase sempre morfologia semelhante ao esporádico, embora tenha um perfil de expressão gênica bastante distinto (Lakhani, 1998; Sobol, 2001; Perou, 2000; Sorlie, 2003).

# 1.2 IDENTIFICAÇÃO DE PACIENTES COM PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER HEREDITÁRIO

A partir da clonagem dos genes BRCA1 e BRCA2, surgiu um grande interesse na identificação de pacientes com predisposição para câncer hereditário e que poderiam ser encaminhados para um serviço de apoio, mas isto não é um processo simples. Este se inicia na identificação dos indivíduos acometidos, sendo necessárias várias sessões pré e pós-teste genético para esclarecer as possibilidades de prevenção e tratamento para os portadores de mutações identificadas. O conhecimento do grau de risco é importante para as decisões quanto à realização ou não do teste genético, indicação de condutas de rastreamento clínico e uso de medidas de prevenção (Loescher, 1999).

A seleção de indivíduos para o teste genético é uma das causas importantes para diferenças nas taxas de mutações descritas para estes genes, o que faz com que a porcentagem de mutações encontradas em BRCA1 e BRCA2 ainda varie de um estudo para outro. Cabe aqui dizer que várias dúvidas

persistem em relação à epidemiologia, entre elas a de que em pacientes com câncer de mama não se sabe qual a exata porcentagem de casos atribuíveis a mutações dos genes BRCA1 e BRCA2.

A abordagem mais comumente usada nos trabalhos encontrados na literatura para se encontrar indivíduos com alto risco de serem portadores de mutações deletérias que predispõem ao câncer é a de analisar indivíduos selecionados com base no número e no grau de parentesco de familiares com câncer, idade de diagnóstico de tumores de mama nos indivíduos e a existência de outros tumores. Este tipo de trabalho, feito em serviços de aconselhamento genético, segue critérios de inclusão específicos para selecionar indivíduos para análise genética. Dados publicados em 2009 pela NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*) no "O Guia de Práticas Clínicas em Oncologia para Acesso a Pacientes de Alto Risco Genético/Familiar: Mama e Ovário" preconizam que os candidatos ao aconselhamento e teste genético devem ter história pessoal de câncer de mama (incluindo carcinoma ductal *in situ*), além de um ou mais casos de:

- Câncer de mama diagnosticado antes dos 45 anos;
- Diagnóstico de câncer de mama antes dos 50 anos, com pelo menos um parente diagnosticado com câncer de mama antes dos 50 anos ou pelo menos um parente próximo com câncer de ovário;
- Dois cânceres de mama primários, sendo pelo menos um destes diagnosticado antes dos 50 anos;

- Ao menos dois parentes próximos com câncer de mama/ovário;
- Parente próximo do sexo masculino com câncer de mama;
- História pessoal de câncer de ovário;
- Nenhum dado adicional de histórico familiar deve ser requisitado para indivíduos de grupos étnicos associados a maiores taxas de mutações.

Existem vários guias disponíveis para determinar a probabilidade de detecção de mutações germinativas nos genes BRCA1 e BRCA2, mas a garantia de que estes indivíduos serão encontrados é variável. Esta probabilidade pode ser verificada por modelos matemáticos que consideram o histórico pessoal e familiar de câncer, dentre eles BRCAPRO (Parmigiani, 1998; Berry,2002), Couch (Couch, 1997), Evans (Evans, 2004) e Frank (Frank, 2002).

Além da diferença genética entre as várias populações estudadas, muitas alterações podem ser perdidas devido à diversidade de técnicas disponíveis para a pesquisa de mutações, que rastreiam regiões ou alterações gênicas distintas (Peto, 1999; Unger, 2000). Atualmente, nenhuma garante a identificação de todas as possíveis mutações em BRCA1 ou BRCA2 que predispõem um indivíduo ao câncer e entre as mais usadas estão o sequenciamento direto, teste da proteína truncada (PTT), amplificação dependente da ligação de múltiplas sondas (MLPA) e cromatografia líquida de alto desempenho desnaturante (DHPLC). O sequenciamento direto é ainda considerado como padrão para tal rastreamento, com taxa de detecção de 85%, apesar de não permitir a detecção de grandes rearranjos genômicos e ser uma

técnica de alto custo e análise trabalhosa, já que BRCA1 e BRCA2 são genes grandes sem *hotspots* definidos. Conforme Bellosillo e Tusquets (2006), o uso do sequenciamento aliado a outras técnicas, como PTT e MLPA, pode detectar 95% das alterações. Diversos estudos (Petrij-Bosch, 1997; Walsh, 2006; Meindl, 2008) têm mostrado que uma parcela dos casos negativos para mutações pontuais nestes genes resulta da ocorrência de grandes rearranjos genômicos, sendo a técnica de MLPA muito útil para a identificação destes rearranjos. O gene BRCA1 pode apresentar grandes deleções ou inserções em 7 a 40% dos casos, enquanto que BRCA2 possui uma freqüência menor, de 2 a 8% (Hogervorst, 2003; Montagna, 2003; Casilli, 2006).

#### 1.2.1 Rastreamento, prevenção e tratamento

A identificação de indivíduos de alto risco se mostra essencial ao observarmos que o rastreamento customizado e as estratégias de prevenção reduzem as taxas de morbidade e mortalidade devido aos cânceres de mama e ovário. Mulheres portadoras de mutações deletérias em BRCA1 ou BRCA2 devem ser monitoradas de perto para um diagnóstico precoce de câncer de mama, iniciando o rastreamento aos 25 anos. As recomendações anuais da NCCN (2009) incluem mamografia e ressonância magnética anualmente, exame clínico da mama duas vezes ao ano e auto-exame mensal. Apesar de haver uma preocupação quanto ao fato da mamografia induzir o aparecimento do câncer, visto que BRCA1 e BRCA2 são genes que atuam no reparo de quebras duplas do

DNA que podem ser induzidas por radiação, não há uma comprovação de que haja este risco e, portanto, os benefícios da mamografia nesta população devem ser levados em consideração. O que se pode dizer é que, pelo menos em relação ao BRCA1, a mamografia tem pouca sensibilidade para detectar o câncer de mama e a ressonância magnética tem se mostrado mais sensível, detectando o câncer mais precocemente (Leach, 2005; Kuhl, 2010; Rijnsburger, 2010). Quanto ao câncer de ovário, ainda não há um rastreamento efetivo, porém é recomendado que as portadoras de mutações em BRCA1 e BRCA2 façam um ultrassom transvaginal duas vezes ao ano e comecem a fazer o teste sanguíneo de CA-125 aos 30 anos, também duas vezes ao ano, até o momento de uma cirurgia eventual (Van der Velde, 2009).

Algumas estratégias de prevenção estão disponíveis para portadores de mutação em BRCA1 e BRCA2. Em mulheres de alto risco, os moduladores seletivos dos receptores de estrógeno tamoxifeno e raloxifeno mostraram reduzir o risco de câncer de mama invasivo em até 50% (Vogel, 2006; Fisher, 2005). Os contraceptivos orais têm mostrado diminuir o risco para o câncer de ovário, mas alguns estudos sugerem um aumento do risco de câncer de mama, mostrando que o uso destas pílulas deve ser personalizado de acordo com a situação (Narod, 2002; Whittemore, 2004; Brohet, 2007).

Cirurgias profiláticas reduzem bastante os riscos de portadores de mutações deletérias em BRCA1 e BRCA2. A mastectomia bilateral pode reduzir o risco de câncer de mama em até 90% (Hartmann, 2001; Meijers-Heijboer, 2001;

Kaas, 2010; Domchek, 2010). Em inúmeros estudos, a salpingo-ooforectomia tem mostrado diminuir o risco para este tipo de câncer em até 50% e em até 85% para o câncer de ovário. Quando consideramos a ausência de estratégias efetivas de prevenção para o câncer de ovário, esta profilaxia é fortemente recomendada para todas as portadoras de mutações deletérias, em especial acima dos 40 anos ou após a idade fértil. Este tratamento leva à menopausa prematura e pode estar associado a uma osteoporose prematura, eventos cardiovasculares, demência e aumento da mortalidade se a terapia de reposição hormonal não é realizada (Kramer, 2005; Kauff, 2008; Rebbeck, 2009; Eisen, 2005; Parker, 2009; Rocca, 2006; Madalinska, 2006).

O tratamento quimioterápico em portadores de mutações deletérias em BRCA1 e BRCA2 é semelhante à aplicada a pessoas com cânceres esporádicos, porém alguns estudos in vitro sugerem um aumento da sensibilidade aos derivados de platina e uma diminuição da sensibilidade aos taxanos (Bordeleau, 2010; Tutt, 2010). Quando falamos de terapia alvo molecular, devemos destacar os inibidores da polimerase poly(ADP-ribose), ou inibidores da PARP. Este agente causa acúmulos de quebras simples no DNA que levam ao aparecimento de quebras duplas nas forquilhas de replicação, levando a um efeito sintético letal. O representante desta classe, olaparib, tem sido muito estudado e suas respostas de eficácia e tolerabilidade têm sido observadas somente em portadores de mutações em BRCA1 e BRCA2 com câncer de mama e ovário (Ashworth, 2008; Bryant, 2005; Fong, 2009; Audeh, 2010).

#### 1.3 BRCA1, BRCA2 E O BRASIL

O Brasil é o maior e mais populoso país da América Latina, porém pouco se sabe sobre o perfil de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 nesta população. Isto se deve, em parte, à escassez de estudos realizados e à diversidade da nossa população. O alto grau de contribuição de diferentes grupos étnicos em locais distintos pode fazer com que os padrões descritos em outras populações não sejam aplicáveis aqui (Salzano, 1997). Esta mistura de etnias e a pouca idade de nossa população também fazem com que a probabilidade de se encontrar uma mutação fundadora especificamente brasileira seja pequena. Diante da contribuição de diversos povos para a nossa formação, podemos considerar que seja mais provável o encontro de mutações fundadoras características de portugueses, espanhóis, italianos, entre outros.

Um dos principais motivos, se não o mais importante, para este desconhecimento do perfil mutacional em BRCA1 e BRCA2 é o fato do teste genético não estar disponível no Sistema Único de Saúde (SUS) e não ser acessível à maior parte da população. Trata-se de um exame caro e são os poucos os centros habilitados para realizar, localizados em hospitais universitários que disponibilizam o teste genético sem cobrar os pacientes. Isto é realizado nos laboratórios de pesquisa destes hospitais universitários utilizando de verba proveniente de projetos de pesquisa e colaborações com outras instituições.

O perfil dos pacientes que procuram um serviço de aconselhamento genético também não é muito bem conhecido na população brasileira. Em 2007, Palmero e colaboradores realizaram um estudo multicêntrico sobre o perfil dos pacientes que procuram um serviço de aconselhamento genético, incluindo 264 indivíduos de 219 famílias. Este grupo verificou que a população em geral conhece pouco sobre seus riscos genéticos e as medidas de prevenção que reduzem estes riscos. Além disso, os profissionais da área da saúde não são bem orientados para a identificação de um forte histórico familiar e um possível risco genético. Assim, o grupo concluiu que uma porção significante de indivíduos com alto risco para síndromes hereditárias de predisposição ao câncer podem não ter acesso aos serviços e benefícios do aconselhamento genético.

Em 1998, Koifman, Koifman e Vieira publicaram um artigo relatando dados epidemiológicos sobre a data de acometimento de pacientes com câncer de mama ou ovário em famílias brasileiras com vários casos de ambos os tumores em diversas gerações. Observaram 260 famílias com 2 ou mais casos de câncer de mama/ovário com uma idade média de acometimento de 52 anos e 64 com mais de 4 casos com idade média de 48 anos. Houve forte correlação entre a idade de acometimento, em especial nas famílias com maior número de casos de câncer, com uma tendência à diminuição de 8 a 10 anos da idade de acometimento de uma geração para a outra. Quanto aos achados moleculares, Lourenço e colaboradores publicaram em 2004 um estudo com 47 pacientes com câncer de mama e/ou ovário com história familiar sugestiva de HBOC. Este grupo

verificou encontrou mutações germinativas em BRCA1 em sete de 47 pacientes selecionadas (14,9%) de acordo com a idade de acometimento (menor que 50 anos), histórico familiar, localização do tumor, casos de câncer de mama em homens e de ovário e descendência Ashkenazi. Em 2005, Dufloth e colaboradores analisaram os exons 2, 3, 5, 11 e 20 de BRCA1 e 10 e 11 de BRCA2 em 31 mulheres com história pessoal de câncer de mama e histórico familiar altamente sugestivo de HBOC. Quatro pacientes apresentaram mutação, o que corresponde a uma prevalência de 13%. Em 2007, Gomes e colaboradores publicaram um estudo com 402 mulheres com câncer de mama, em que investigaram quanto à presença das mutações de BRCA1 185delAG e 5382insC e de BRCA2 6174delT, além de variações presentes nos exons 11 de BRCA1 e 10 e 11 de BRCA2. O següenciamento completo de ambos os genes foi feito em 12 pacientes. Apesar de ser uma população com câncer de mama não selecionada, mutações foram encontradas em 2,3% das pacientes e 5382insC corresponde a 56% das alterações deletérias encontradas. Em 2009, Esteves e colaboradores selecionaram 612 indivíduos de acordo com o histórico familiar: 18 apresentaram mutações deletérias em BRCA1 e 3 apresentaram em BRCA2. Destas 21 mutações (3,4% dos selecionados), 13 são mutações fundadoras (5382insC e ins6kb, no exon 13 de BRCA1), totalizando 61,9% das mutações deletérias detectadas.

Diante da carência de estudos nacionais dedicados ao estudo dos genes BRCA1 e BRCA2, pretendemos neste projeto identificar alterações de

ambos os genes em indivíduos de alto risco para a HBOC, recrutados no Ambulatório de Aconselhamento Genético do Serviço de Oncologia do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InRad-HCFMUSP), utilizando as técnicas de sequenciamento direto e MLPA.

#### 2. OBJETIVOS

#### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Identificar mutações e/ou polimorfismos em pacientes com câncer de mama/ovário e alto risco para câncer hereditário atendidos no Ambulatório de Oncologia do InRad-HCFMUSP e selecionados para o teste genético.

#### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Tendo em vista que, de um total de 300 pacientes com câncer de mama, 63 pacientes foram selecionados pelos critérios de Frank, Evans e BRCAPRO como suspeitos de serem portadores de mutações deletérias nos genes BRCA1 e BRCA2, assim como duas pacientes com câncer de ovário e oito indivíduos saudáveis com histórico altamente sugestivo para HBOC, pretendemos:

- Rastrear mutações e polimorfismos nos genes BRCA1 e BRCA2 através da técnica de sequenciamento direto nestes 73 pacientes.
- Rastrear grandes rearranjos genômicos dos genes BRCA1 e BRCA2 através da técnica de MLPA nos pacientes com diagnóstico negativo no seqüenciamento direto para a presença de mutações nestes genes.

Casuística e Métodos

# 3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

## 3.1 CASUÍSTICA

Nossa coorte foi de 300 pacientes com câncer de mama em seguimento clínico ou em tratamento com hormonioterapia, independente da presença de doença ativa, atendidos no Ambulatório de Oncologia do InRad-HCFMUSP entre 01 de setembro de 2005 e 31 de junho de 2006. Estes pacientes participavam de um projeto de cuidados paliativos e não tinham indicação para quimioterapia. Oferecemos uma consulta no grupo de câncer hereditário, onde os pacientes foram informados sobre os objetivos da pesquisa, as potencialidades e limitações do teste e tiveram suas dúvidas esclarecidas. 170 pacientes concordaram e foram incluídos no estudo após assinarem um termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1). Coletamos a história familiar de câncer de cada paciente e estes foram submetidos aos testes de risco de Frank, Evans e BRCAPRO.

O teste proposto por Frank em 2002 (anexo 2) foi elaborado a partir da análise de 10.000 sequenciamentos consecutivos dos genes BRCA1 e BRCA2. O risco é determinado em uma tabela que correlaciona mutações deletérias nestes genes com dados de história pessoal e familiar em indivíduos de ascendência *Ashkenazi* e não *Ashkenazi*. O teste de Evans (anexo 3) foi proposto em 2004 a partir da análise de dados de histórico pessoal e familiar e de mutações deletérias

obtidas por sequenciamento direto dos genes BRCA1 e BRCA2 em 422 famílias não judias da Inglaterra. Foi validado também em um grupo com 192 e em outro com 298 famílias, além de incorporar em sua análise de risco a presença de câncer de ovário, próstata e pâncreas. BRCAPRO é um modelo estatístico associado a um software (*Cancer Gene*, versão 4.2) que utiliza uma abordagem Mendeliana para presumir uma herança autossômica dominante. A penetrância e a prevalência, dependentes da idade do probando, são assumidas a partir de uma revisão sistemática da literatura. Este modelo determina a probabilidade de um indivíduo ser portador de mutação germinativa deletéria nos genes BRCA1 e BRCA2 a partir do histórico pessoal de câncer de mama e/ou ovário do(a) paciente, incluindo câncer de mama masculino e câncer de mama bilateral sincrônico ou metacrônico.

No total, 63 pacientes (sendo 60 mulheres e três homens) apresentaram um risco mínimo de 10% em pelo menos um dos três testes realizados e foram encaminhados para a avaliação genética. Dez indivíduos, sendo duas pacientes com câncer de ovário e outros oito indivíduos sem câncer foram também incluídos no estudo por apresentarem histórico familiar de câncer altamente sugestivo para a síndrome de câncer de mama/ovário hereditário. Para o teste genético de cada paciente realizamos duas coletas de 10 mL de sangue periférico utilizando ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como anticoagulante. Estas coletas foram realizadas em dias diferentes, as quais foram numeradas para garantir o sigilo.

Este projeto está vinculado ao projeto FAPESP nº 0 6/51709-06 e foi aprovado pelo Comitê de Ética do HCFMUSP (anexo 4).

#### 3.2 MÉTODOS

## 3.2.1 Separação de leucócitos do sangue periférico

Para a separação dos leucócitos por lise de eritrócitos, adicionamos 30 mL da solução de Tris-EDTA (TE) pH 8,0 aos 10 mL das amostras de sangue de cada paciente, completando 40 mL, e agitamos por 1 minuto. Em seguida, centrifugamos por 7 minutos a 1100 rpm (centrífuga *Eppendorf*, modelo 5804R) e descartamos o sobrenadante, restando no tubo cerca de 5 mL (solução e precipitado). Estes foram agitados por 10 segundos e sofreram uma nova adição de TE, completando o volume para 30 mL. Agitamos por mais 1 minuto e centrifugamos por 5 minutos a 1100 rpm (centrífuga *Eppendorf*, modelo 5804R). Novamente, descartamos o sobrenadante e deixamos 5 mL no tubo, correspondendo ao sobrenadante e ao precipitado de leucócitos. Estes foram agitados por 10 segundos e divididos em 5 alíquotas, contendo 1 mL cada. Centrifugamos por 1 minuto a 12000 rpm (centrífuga *Eppendorf*, modelo 5804R) e descartamos o sobrenadante. Caso a extração de DNA não fosse realizada logo após a separação de leucócitos do sangue, as células eram armazenadas a -70°C.

## 3.2.2 Extração de DNA de leucócitos

Para a extração de DNA de leucócitos, utilizamos o *Wizard Genomic*DNA Purification Kit (Promega), que se baseia na lise de membranas celulares.

Após descongelar o precipitado de leucócitos, adicionamos 900 µL da solução cell lysis buffer, homogeneizamos gentilmente por inversão, deixamos em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos e centrifugamos por 20 segundos 12000 rpm (centrífuga Eppendorf, modelo 5804R). Descartamos o sobrenadante, restando cerca de 20 µL para agitarmos, desfazendo o precipitado. 300 µL de nuclei lysis buffer foram então adicionados e homogeneizados por pipetagem e, caso houvesse grumos, deixávamos por 1 hora a 37°C. Em seguida, adicionamos 1,5 µL de RNase para digerir o RNA em solução, homogeneizamos por inversão e deixamos por 15 minutos a 37°. Após esfriar à temperatura ambiente, precipitamos as proteínas com o uso de uma solução salina, adicionando 100 µL de protein precipitation solution, agitamos fortemente e centrifugamos por 3 minutos a 12000 rpm (centrífuga Eppendorf, modelo 5804R). O sobrenadante foi passado para outro tubo contendo 300 µL de isopropanol: homogeneizamos por inversão haver precipitação do DNA genômico e centrifugamos por 1 minuto a 12000 rpm (centrifuga Eppendorf, modelo 5804R). Após descartar o sobrenadante, adicionamos 700 µL de etanol 70% para eliminar os sais em solução, agitamos e centrifugamos sob as mesmas condições anteriores, descartamos o sobrenadante e deixamos os tubos em repouso à temperatura ambiente por 15 minutos para evaporar todo o etanol. Adicionamos 100 µL de *rehidratation solution* ao precipitado de DNA e deixamos em repouso na bancada por 16 horas. As amostras de DNA em solução foram então armazenadas a -20℃.

# 3.2.3 Determinação da concentração do DNA

Após a extração, determinamos a concentração dos DNAs no equipamento *Nanodrop 1000 Spectrophotometer* (*Thermo Fisher Scientific Inc*). Para tal é necessário 1 μL de amostra, utilizando solução de TE como branco (a mesma solução em que o DNA está diluído) e um comprimento de onda de 260 nm. O mesmo processo nos permite avaliar a pureza da amostra em relação à proteínas (a relação 260/280 nm deve estar em torno de 1,8) e reagentes utilizados no processo de extração do DNA (a relação 260/230 nm deve estar entre 1,8 e 2,2).

#### 3.2.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR foi realizada para amplificar e isolar todos os exons dos genes BRCA1 e BRCA2 de cada paciente. Como reagentes, utilizamos deoxinucleotídeos (dNTPs) a 0,16 mM, oligonucleotídeos iniciadores senso e antisenso a 0,4 μM cada, enzima *AmpliTaq Gold* (*Applied Biosystems*) a 0,4 U/μL, tampão para *AmpliTaq Gold* 1X, cloreto de magnésio para *AmpliTaq Gold* (MgCl<sub>2</sub>; concentração variando de 1,5 mM a 3 mM, de acordo com o fragmento

amplificado) e DNA a 50 ηg. O volume final de 15 μL é completado com água livre de RNAses e DNAses. A reação é submetida a: 95°C por 10 minutos (ativação da enzima); 40 ciclos: 94°C por 50 segundos (desnaturação das fitas), 56 a 66°C por 50 segundos (anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores – a temperatura exata depende do exon a ser amplificado), 72°C por 50 segundos (extensão da fita pela ação da enzima); 72°C por 7 minutos (extensão final); 4°C por tempo indeterminado (fim da reação). Uma alíquota do produto (4 μL) é avaliada qualitativamente por eletroforese em gel de agarose diluída a 1,5% em Tris-Borato-EDTA 1X (TBE) e corado com brometo de etídio, que se intercala ao DNA e pode ser observado sob luz ultravioleta: espera-se que forme uma banda única e sem rastros para que seja utilizado no sequenciamento direto.

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores dos fragmentos dos genes BRCA1 e BRCA2 estão localizados a uma distância de 50 a 100 pares de bases de cada exon. Isto permite que toda a área de interesse seja rastreada, inclusive regiões intrônicas próximas aos exons, onde eventuais alterações podem ser importantes por estarem localizadas em sítios de *splicing* alternativo. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores para BRCA1 foram retiradas do trabalho de Kiechle e colaboradores (1999) e Friedman e colaboradores (1994), e as sequências referentes ao gene BRCA2, são de Oefner e colaboradores, em 1999 (tabelas 01 e 02, respectivamente). Contudo, o sequenciamento do exon 20 do gene BRCA1 apresentou um resultado insatisfatório e precisamos determinar um novo par de oligonucleotídeos. Isto foi feito utilizando a sequência referência

NM\_007294, depositada no *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information*, ou NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), com o auxílio do programa Primer3 Input, disponível online no endereço http://www.cgi.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3. Este novo par de oligonucleotídeos consta na tabela 01.

Tab	ela 01: Oligonucleotídeos iniciadores para os exi	ons do gene BRCA	1
Exon	Oligonucleotídeos Foward (F) e Reverso (R)	Temperatura de anelamento (℃)	Tam anho
2	F: 5' GAAGTTGTCATTTTATAAACCTTT 3'	56	250
	R: 5' TGTCTTTTCTTCCCTAGTATG 3'		
3	F: 5' TCCTGACACAGCAGACATTTA3'	56	340
_	R: 5' TTGGATTTTTCGTTCTCACTTA3'	50	0.70
5	F: 5' GC TTGTAATTCACCTGCCAT 3' R: 5' TTCCTACTGTGGTGGCTTCC 3'	56	270
6	F: 5' AGGTTTTCTACTGTTGCTGCAT3'	66	308
•	R: 5' AAAAGGTCTTATCACCACGTCA 3'	00	000
7	F: 5' GGGTTTCTCTTGGTTTCTTTG 3'	66	329
	R: 5' GGAGGACTGCTTCTAGCCTG3'		
8	F: 5' AAGCACAGAACTGGCCAACAA 3'	66	274
	R: 5' CACTTCCCAAAGCTGCCTAC3'	64	202
9	F: 5' TGC CACAGTAGATGCTCAGT 3' R: 5' CACATACATCCCTGAACCTAAA 3'	64	292
10	F: 5' TTGGTCAGCTTTCTGTAATCG3'	62	348
	R: 5' CCATACCACGACATTTGACA 3'		
11A	F: 5' TAGCCAGTTGGTTGATTTCC 3'	64	394
	R: 5' CCCATCTGTTATGTTGGCTC 3'		
11B	F: 5' CCATGTGGCACAAATACTCA3'	64	399
11C	R: 5' TGATTCAGACTCCCCATCAT 3' F: 5' GAAACTGCCATGCTCAGAGA3'	64	437
110	R: 5' ATTTATTTGTGAGGGGACGC 3'	04	437
11D	F: 5' TCCCCAACTTAAGCCATGTA3'	64	437
	R: 5' AGAAGACTTC CTCCTCAGCC 3'		
11E	F: 5' TTCAAAACGAAAGCTGAACC 3'	64	444
	R: 5' TTGGAAGGCTAGGATTGACA 3'		440
11F	F: 5' GGTAAAGAAC CTGCAACTGG 3' R: 5' TCAAATGCTGCACACTGACT3'	64	416
116	F: 5' GAAAGGGTTTTGCAAACTGA3'	64	381
110	R: 5' TTCTCTTTCTGCATTTCCTG3'	04	001
11H	F: 5" TTTCGTTGCCTCTGAACTGA 3"	64	376
	R: 5' AACCACAGTCGGGAAACA3'		
111	F: 5' CTCAGGTTGCAAAACCCCTA3'	64	507
11J	R: 5' ATC AC TGC AGGCTTTCC TGT 3' F: 5' AC TAA TGAAGTGGGCTC CAG 3'	04	4.45
113	R: 5' CCAAATGTGTATGGGTGAAA 3'	64	445
11K	F: 5' GATGTTCCTGAGATGCCTTTG3'	64	401
	R: 5' TGATGACCTGTTAGATGATGGTG 3'		
11L	F: 5' AC CGTTGC TAC CGAGTGTCT 3'	64	438
	R: 5' GTGCTCCCCAAAAGCATAAA 3'		
12	F: 5' GTCCTGCCAATGAGAAGAAAAG 3'	64	267
13	R: 5' TGTCAGCAAACCTAAGAATGT 3' F: 5' AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA 3'	66	322
10	R: 5' ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC 3'	00	322
14	F: 5' TGTGTATCATAGATTGATGCTTTTG3'	60	360
	R: 5' GCAATAAAAGTGTATAAATGCCTGT3'		
15	F: 5' TTGC CAGTC ATTTC TGATCT 3'	60	484
16	R: 5' AAACCTTGATTAACACTTGAGC 3' F: 5' AATTCTTAACAGAGACCAGAAC 3'	60	452
10	R: 5' AAAAC TCTTTCCAGAATGTTGT 3'	00	432
17	F: 5' GTGTAGAACGTGCAGGATTG 3'	56	265
	R: 5' TCGCCTCATGTGGTTTTA3'		
18	F: 5' GGCTCTTTAGCTTCTTAGGAC3'	62	354
	R: 5' GAGACCCATTTTCCCAGCATC 3'		0.50
19	F: 5' CTGTCATTCTTCCTGTGCTC 3' R: 5' CATTGTTAAGGAAAGTGGTGC 3'	62	250
20	F: 5' TGACGTGTCTGCTCCACTTC 3'	62	322
20	R: 5' GGTTGGGATGGAAGAGTGAA3'	J.	
21	F: 5' CAGGTGGTGAACAGAAGAAA 3'	62	300
	R: 5' ACATTTCAGCAATCTGAGGA3'		
22	F: 5' CATCCGGAGAGTGTAGGGTA3'	58	240
	R: 5' CATCCATAGGGAC TGACAGG 3'	60	205
23	F: 5' CCCTGTCTCAAAAACAAACA3' R: 5' CAAGCACCAGGTAATGAGTG3'	60	235
24	F: 5' TGGAGTCGATTGATTAGAGC 3'	58	301
	R: 5' AGCCAGGACAGTAGAAGAAC3'		
	E = casco (formant) a B = asticasco (farrance)		

F = seuso (forward) e R = autiseuso (reverse)

Tabela 02: Oligonucleotideos iniciadores utilizados para BRCA2

	-	ela vz. oliyoliu	aveia uz. Vilgoliacieoliueus IIIIciauoles uliiizauus pala arte		SUUS PAIA CINCAZ		
Exon	Oligonucleotídeos Foward (F) e Reverso (R)	Temperatura de anelamento (°C)	Tam anho E>	Exon (	Oligonucleotídeos Foward (F) e Reverso ( R)	Temperatura de 1	Tamanho
2	F:5' CCAGGAGATGGGACTGAATTAG3'	84	311	11 M	F.S' GCCAGTATTGAAGAATGTTGAAGATC3'	68-61/61	843
e	K:S CIGIGACEGEGIIIIIAGUS F:S'TTCCTTATGATCTTTAACTGTTCTG 3'	84	408	z	KIS AAACCIIAIGIGAAIGCGIGCIACS Fistaacgaaattatggcaggttgttacg	68,6464	438
•	R:5' GCTAAGATTTTAACACAGGTTTGC 3'	5			R: 5' GCTTTCCACTTGCTGTACTAAATCC 3'	0	3
4	F:5' AGAATG CAAATTTATAATCCAGAGTA3'	62	249	110	F:5' CCAGCTCACAAGAGAAGAAATACTG 3'	68-61/61	503
	R:5' AATCAGATTGA				R:5'TTACGTTTTAGGTGAAGCCTGTTC3'		
5+6		62	362 11	1 -	F.5' AAACCCAGAGCACTGTGTAAACTC3'	68-61/61	487
•	RIST CICAGGGCAAAGGIALAACGGG	Č			R.S. TCI CCI CHI CHI I LCCARTICHES.	0000	
-	F.S. CCTTARTURICABUSELATICS R.S. CARCCTCATCTGCTCTTTCTTG 3'	\$	514	2	F:STACABALLELAAACIBECAABICALB3 R:STAACCATACTCCCCCAAACTGAC3	10/10-80	007
00	F:5' GTAGATGTGCTTTTTGATGTCTGAC 3'	84	315	12	F.5' AATTGACATTGAAGACTGACTTTACTC 3'	64	370
	R:5' GAGAGACAG CAGAG TTTCACAG G 3'			_	R:5' AG CACTTTGG AG AG GCAGG 3'		
8	F:5' CAGATAACTGAAATCACCAAAAGTG 3'	62	262	13	F:5'6CATCCGTTACATTCACTGAAA3'	64	310
				_	R:5' ACG GG AAGTGTT AACTTCTTAACG 3'		
10 A		54	374	14 A F	F:5' ACCATGTAGCAAATGAGGGTCT 3'	62	391
					R:5' GCITTIGTCTGTTTCCTCCAA3		
10 8		64	280	4 4 4	F:5' CACAGAGTTGAACAGTGTGTTAGG 3'	62	297
					R.S. GGGCTTTAAAATTACCACCS:		
9		62	242	5.	F:5' GGCCAGGGGTTGTGCTTTTT 3'	8	369
					R:5' ATTTCATTCATCCATTCCTGC3'		
100		8	295	16	F:5'TTTGGTAAATTCAGTTTTGGTTTG3'	8	386
	R:5'GIGGAIAIIAA	í			R.S. AGCCAACTTTTAGTTCGAGAG 3:		0
		8	807	- ·	7.3 CAGAGAA AGIIGIAGIIGIIGAAG	70	909
					R:5' AG AAACCTTAACCCATACTGC3'		
τ Τ		63-56/56	342	48 A 4	F:5'TCAGTTTTATTCTCAGTTATTCAGTG 3'	92	288
:					R:5' GCATACCACCCATCTGTAAGTTC 3'		
=		63-56/56	394	18 B	F:5'TGTTTCTGACATAATTTCATTGAGC3'	82	420
					R:5' AAACTTTAACTGTCTGAAGAATATGC 3'		
10		63-56/56	360	10	F:5' CTTATTACTGTCTTACTAATCTTCCT 3'	64	380
	R:5' ACCACAGTCTCAATAGAAACAAGG3'			_	R:5' GACCGAAACTCCATCTCAAAC 3'		
10		63-56/56	709	20 F	F:5' 6 6 T 6 A T C C A C T A A T C T C A 6 C C T C 3'	99	154
				_	R:5' GTCCCTTGTTGCTATTCTTTGTCT 3'		
11 E		63-56/56	338	21 F	F:5' G G G T G T T T A T G C T T C G T T C T 3'	28	303
					R:5' CATTICAACATATICCTICCIG 3'		
Ξ		63-56/56	456	22 F	::5' AACCACACCCTTAAGATGAGC 3'	62	455
:					R:5' GGCCATTAGTAGTGGATTTTGC 3'		
11 6		63-56/56	330	23	F:5' ACTICH CCATTG CATCTTT CTCA3'	8	280
					R:5' AAAACAAAACAAAATTCAACATA3'		
=		63-56/56	216	24	F.5' GCAGCGACAAAAAACTCA3'	94	382
	K:9 IGLARICALIA				R.S. ALLIGUCAANIGGIAGOTUS	í	
Ξ	F:STHEGHTARGHUNGCAGAGAG	03-00/00	48/	67	F.S. GULLICGUCAALICAGULAS. D.S. TACCAAAATGTGTGGTGATGCS.	ő	/7
Ξ		82,68/68	500	96	7.9  XCCXXXX G G G GX GC9	8	020
-	R:5' CCTAAACCCCA	0000			F.5 GEAGCCACATAACAACCACA3	5	o Š
==		63-56/56	465	27 A F	F.S. CTGTGTGTAATATTTGCGTGCT3'	95	495
					R:5' GCAAGTTCTTCGTCAGCTATTG 3'		
11 L		63-56/56	401 27	27 B F	F:5'GAATTCTCCTCAGATGACTCCA 3'	62	417
	R:5' CACTTGCAGTCTGAAAAATGTATC 3'			٦	R:5' TCTTTGCTCATTGTGCAACA3'		

F = senso (forward) e R = antisenso (reverse)

#### 3.2.5 Sequenciamento direto

A reação baseia-se na tecnologia dos terminadores com energia de transferência (*Energy-Transfer Terminator*). Isto é possível porque junto ao *mix* para seqüenciamento direto, contendo reagentes necessários para que a reação ocorra, existem os dideoxinucleotídeos (com uma hidroxila a menos no carbono 3 e que, ao serem incorporados, impedem que a cadeia de DNA continue sua polimerização) marcados com fluorocromos diferentes para cada um dos quatro tipos. O princípio da reação é o mesmo de uma PCR, porém a diferença marcante consiste na:

- Adição de dideoxinucleotídeos marcados, que são aleatoriamente incorporados durante a polimerização do DNA, formando cadeias de DNA de todos os tamanhos possíveis;
- Realização de duas reações para cada fragmento, cada uma com somente um dos oligonucleotídeos iniciadores de um par (somente o senso ou somente o antisenso).

Para que a leitura do seqüenciamento seja realizada, o produto desta reação é submetido a uma eletroforese capilar, onde os fluorocromos são excitados por um laser e emitem energia (o comprimento de onda é específico para cada dideoxinucleotídeo), captada pelo equipamento. Este libera o resultado na forma de um eletroferograma, onde os picos de fluorescência têm cores específicas para cada nucleotídeo correspondente. A figura 03 mostra a

incorporação dos deoxinucleotídeos e dideoxinucleotídeos durante a polimerização do DNA.

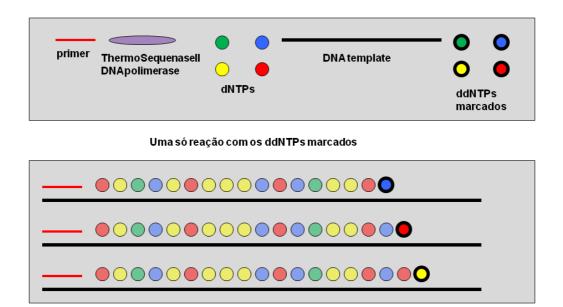


Figura 03: Esquema mostrando a incorporação aleatória dos dideoxinucleotídeos (ddNTPs). Esta incorporação possibilita o aparecimento de cadeias de todos os tamanhos possíveis e a informação da sequência genética.

Como já foi citado, cada fragmento amplificado por PCR passa por duas reações de sequenciamento direto, permitindo a análise de toda a área de interesse e a confirmação do resultado através da comparação das duas fitas, que devem ser complementares por toda a extensão do fragmento em questão.

O preparo do sequenciamento direto consiste em 1 pmol/µL de um dos oligonucleotídeos iniciadores, 20 a 60 ng de DNA (produto de PCR) e o pré-mix

contendo os demais reagentes da reação (kit Dynamic ET Dye, código US81095, GE Biosystems). O volume final de 10 µL foi completado com água livre de RNases e DNAses. A reação foi submetida a 25 ciclos de variação de temperatura, permanecendo por 20 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C, 1 minuto a 60°C e 4°C por tempo indeterminado. A próx ima etapa foi a precipitação do DNA resultante: adicionamos 20 µL de isopropanol a 80%, agitamos e centrifugamos as amostras por 35 minutos a 3700 rpm (temperatura ambiente, aceleração=6 breque=0; centrífuga Eppendorf, modelo 5804R). Cuidadosamente, descartamos o sobrenadante por inversão e centrifugamos a placa invertida sobre papel absorvente por 1 minuto a 600 rpm (centrífuga Eppendorf, modelo 5804R). Em seguida, adicionamos 200 µL de etanol 70 a cada amostra, agitamos e centrifugamos por 10 minutos a 3700 rpm (temperatura ambiente, aceleração=6 e breque=0; centrífuga Eppendorf, modelo 5804R). Repetimos a etapa de descarte cauteloso do sobrenadante e centrifugação por 1 minuto a 600 rpm (centrífuga Eppendorf, modelo 5804R) e as amostras ficam à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos para evaporação total do etanol. Por fim, adicionamos 10 µL de solução loading buffer a cada amostra e deixamos a 4℃ por 16 horas.

As reações de sequenciamento foram feitas em placas de 96 poços, uma vez que a separação dos fragmentos gerados foi feita por eletroforese capilar no aparelho *MegaBACE-1000 (Amersham Biosciences / GE Biosystems*). Cada

placa de sequenciamento foi acompanhada de 6 tubos de polímero LPA e uma placa contendo tampão de corrida.

Para verificarmos a qualidade das sequências obtidas após a eletroforese capilar, utilizamos o software *Chromas* versão 2.33 (*Technelysium Pty. Ltd.*). Inicialmente, a caracterização de alterações nas seqüências obtidas foi realizada sem a ajuda de softwares, imprimindo os resultados e verificando a olho nu. No momento estamos utilizando o programa *Mutation Surveyor* versão 3.20 (*SoftGenetics LLC*) para confirmar a presença de mutações, já que este facilita a visualização e diminui o tempo gasto com esta etapa. Para caracterizar mutações que ainda não foram descritas na literatura, utilizamos o software *Gene Runner* versão 3.05 (*Hastings Software Inc.*).

# 3.2.6 Amplificação Dependente da Ligação de Múltiplas Sondas (MLPA)

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 hibridização, 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 *stuffer*, que é diferente para cada sonda e diferencia os fragmentos amplificados por tamanho. Quando o as sequências alvo estão presentes na amostra, os oligonucleotídeos A e B se hibridizam 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 (130 a 490 bp). Diferenças nos valores relativos referentes á amplificação são expressas em tamanhos ou áreas diferentes entre amostras de pacientes e de controles negativos (pessoas saudáveis). Segundo o protocolo da *MRC-Holland*, cada placa de MLPA deve conter no mínimo três DNAs controle. A partir de 21 amostras, deve-se adicionar um controle para cada sete amostras de DNA. Nossos controles são amostras de sangue anônimas doadas pelo banco de sangue do Instituto do Câncer de São Paulo (ICESP).

Além dos controles externos, cada kit contém seus controles internos (sondas que hibridizam a regiões cromossômicas diferentes) e controles de quantidade e desnaturação do DNA: *Q-fragments* e *D-fragments*, respectivamente. Os *Q-fragments* estão presentes em todos os kits de MLPA e são quatro fragmentos (64, 70, 76 e 82 nt) que não dependem da ligação de sondas: quando seus picos estão maiores que a metade do tamanho dos picos dos *D-fragments* e das sondas de MLPA indicam uma quantidade de DNA insuficiente ou falha na reação. *D-fragments*, 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 desnaturado e houve ligação das sondas.

A figura 04 esquematiza as etapas da reação.

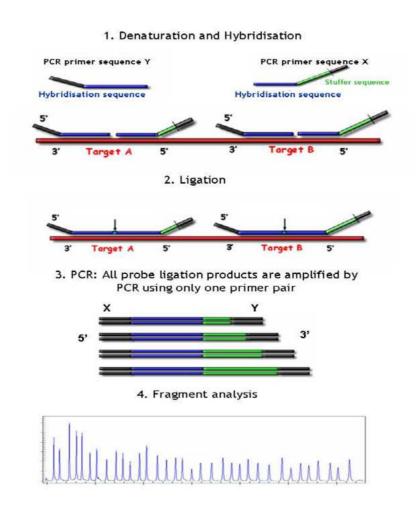


Figura 04: Etapas referentes à reação de MLPA (MRC-HOLLAND, 2010).

Para BRCA1, os kits utilizados foram:

- SALSA MLPA kit P002B1 (tabela 4);
- SALSA MLPA kit P002C1 (versão atualizada do kit P002B1; tabela 5);
- SALSA MLPA kit P087 (utilizados somente se acharmos alteração com o kit P002B, para confirmar o resultado; tabela 6).

Para BRCA2, utilizamos:

SALSA MLPA kit P090A2 (tabela 7);

 SALSA MLPA kit P077 (utilizado se acharmos alteração com o uso de P090, para confirmar o resultado; tabela 8).

Tabela 03: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores para a reação de MLPA.

Salsa PCR forward primer (marcado com FAM)	5' GGGTTCCCTAAGGGTTGGA 3'
Salsa PCR reverse primer (não marcado)	5' GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA 3'

Tabela 04 – Sondas referentes a SALSA MLPA kit P002B1.

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosor	Chromosomal position		
Length (nt)	SALSA MLPA probe	Control	BRCA1		
64-70-76-82*	DQ-control fragments				
88-92-96**	DD-control fragments		•		
127	Control probe 0797-L0093	5q31	•		
136	Control probe 0662-L0158	6p21			
148	BRCA1 probe 0763-L0268		exon 1A		
157	BRCA1 probe 0764-L0269		exon 1B		
166	BRCA1 probe 0765-L0270		exon 2		
175	BRCA1 probe 0826-L0341		exon 3		
184	BRCA1 probe 0767-L0272		exon 5		
198	Control probe 2946-L3265	7q			
208	BRCA1 probe 0827-L0342		exon 6		
217	BRCA1 probe 0769-L0274		exon 7		
226	BRCA1 probe 1004-L0569		exon 8		
235	BRCA1 probe 1005-L0581		exon 9		
244	BRCA1 probe 0772-L0277		exon 10		
256	Control probe 0518-L0098	2q14			
268	BRCA1 probe 0830-L0345		exon 11		
277	BRCA1 probe 0774-L0279		exon 11		
286	BRCA1 probe 0775-L0280		exon 12		
295	BRCA1 probe 2603-L2074		exon 13		
304	BRCA1 probe 0833-L0349		exon 14		
316	Control probe 0495-L0303	12p12			
328	BRCA1 probe 0778-L0347		exon 15		
337	BRCA1 probe 0779-L0003		exon 16		
346	BRCA1 probe 0780-L0283		exon 17		
355	BRCA1 probe 0781-L0284		exon 18		
364	BRCA1 probe 0782-L0285		exon 19		
376	Control probe 0655-L0304	4q26			
388	BRCA1 probe 0783-L0356		exon 20		
397	BRCA1 probe 0784-L0287		exon 21		
406	BRCA1 probe 0785-L0288		exon 22		
415	BRCA1 probe 0786-L0289		exon 23		
424***	BRCA1 probe 2831-L2260		exon 24		
436	Control probe 0596-L0083	11p13			
445	Control probe 0678-L0124	12p13			
454	Control probe 0673-L0117	3p21			

Tabela 05 - Sondas referentes a SALSA MLPA kit P002C1.

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position reference BRCA1					
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible						
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						
127	Reference probe 00797-L00093	5q31					
136 *	Reference probe 06452-L05978	6p22					
148	BRCA1 probe 00763-L00268	exon 1A					
157	BRCA1 probe 00764-L00269	exon 1B					
166	BRCA1 probe 00765-L00270	exon 2					
175	BRCA1 probe 00826-L00341	exon 3					
184	BRCA1 probe 00767-L00272	exon 5					
198	Reference probe 02946-L03265	7q31					
208	BRCA1 probe 00827-L00342	exon 6					
216	BRCA1 probe 00769-L00274	exon 7					
226	BRCA1 probe 01004-L00569	exon 8					
236	BRCA1 probe 01005-L00581	exon 9					
244	BRCA1 probe 00772-L00277	exon 10					
256	Reference probe 00518-L00098	2q13					
266	BRCA1 probe 00830-L00345	exon 11					
277	BRCA1 probe 00774-L00279	exon 11					
285	BRCA1 probe 00775-L00280	exon 12					
295 ±	BRCA1 probe 02603-L02074	exon 13					
305	BRCA1 probe 00833-L00349	exon 14					
316	Reference probe 00495-L00303	12p12					
328	BRCA1 probe 00778-L00347	exon 15					
337	BRCA1 probe 00779-L00003	exon 16					
346	BRCA1 probe 00780-L00283	exon 17					
355 ±	BRCA1 probe 00781-L00284	exon 18					
364	BRCA1 probe 00782-L00285	exon 19					
374	Reference probe 00655-L00304	4q26					
389	BRCA1 probe 00783-L00356	exon 20					
399 ¥	BRCA1 probe 00784-L12004	exon 21					
407	BRCA1 probe 00785-L00288	exon 22					
415	BRCA1 probe 00786-L00289	exon 23					
427 ¥	BRCA1 probe 02831-L13862	exon 24					
436	Reference probe 00596-L00083	11p13					
445 *	Reference probe 04074-L03710	17q11					
454	Reference probe 00673-L00117	3p21					
463 *±	BRCA1 probe 11283-L12001	exon 13					

Tabela 06 - Sondas referentes a SALSA MLPA kit P087.

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position
64-70-76-82*	DQ-control fragments	·
88-92-96**	DD-control fragments	
130	Control probe 2269-L1761	01p36
139	Control probe 2283-L1774	13q12 (BRCA2, exon 1)
148	BRCA1 probe 2807-L1268	Exon 1
157	BRCA1 probe 2808-L2168	Exon 1
166	BRCA1 probe 2810-L2239	Exon 2
175	BRCA1 probe 2811-L2240	Exon 3
184	BRCA1 probe 3398-L2254	Exon 18
193	Control probe 3217-L2642	10q25
199	BRCA1 probe 3823-L3286	Exon 22
208	BRCA1 probe 2813-L2242	Exon 6
217	BRCA1 probe 2814-L2243	Exon 7
226	BRCA1 probe 2815-L2244	Exon 8
235	BRCA1 probe 2816-L2245	Exon 9
244	BRCA1 probe 3411-L2074	Exon 13
256	Control probe 2279-L1770	13q12 (BRCA2, exon 11)
265	BRCA1 probe 3772-L3269	Exon 14
277	BRCA1 probe 2818-L2247	Exon 11
286	BRCA1 probe 2819-L2248	Exon 12
295	BRCA1 probe 3890-L3337	Exon 13
310	Control probe 1609-L1191	13q12 (BRCA2, exon 14)
319	Control probe 0495-L3128	12p12
328	BRCA1 probe 2821-L2250	Exon 15
337	BRCA1 probe 2822-L2251	Exon 16
346	BRCA1 probe 3395-L2241	Exon 5
355	BRCA1 probe 3822-L3285	Exon 10
364	BRCA1 probe 2826-L2255	Exon 19
373	Control probe 2667-L2134	11q23 (ATM, exon 25)
380	Control probe 0655-L3268	4q26
388	BRCA1 probe 2827-L2256	Exon 20
397	BRCA1 probe 2828-L2257	Exon 21
406	BRCA1 probe 3397-L2253	Exon 17
415	BRCA1 probe 2830-L2259	Exon 23
424	BRCA1 probe 2831-L2260	Exon 24
436	BRCA1 probe 2100-L1269	Exon 1
445	Control probe 2445-L1409	16p13
454	Control probe 2355-L1415	9q34

Tabela 07 - Sondas referentes a SALSA MLPA kit P090A2.

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosomal position	BRCA2 exon
64-70-76-82*	DQ-control fragments		
88-92-96*	DD-control fragments		
130	Control probe 0797-L00463	5q31	
137	BRCA2 probe 2283-L01774	T '	exon 1
148	BRCA2 probe 2285-L01776		exon 1
154**	BRCA2 probe 9297-L08066		exon 14
161	FRY probe 2143-L09586		20 Kb before BRCA2
166	BRCA2 probe 2486-L01985		exon 2
170**	BRCA2 probe 8898-L09587		exon 3
177	BRCA2 probe 1599-L10642		exon 3
184	Control probe 1217-L00694	49	
191**	BRCA2 probe 9812-L10643		exon 23
197	BRCA2 probe 1600-L04671		exon 4
202**	BRCA2 probe 8265-L08128		exon 7
211	Control probe 1344-L00555	9q	
220	BRCA2 probe 1602-L01184		exon 8
229	BRCA2 probe 1603-L01185		exon 9
238	Control probe 0517-L00097	2q	
247	BRCA2 probe 1604-L01186		exon 10
256	BRCA2 probe 2279-L01770		exon 11 start
265**	Control probe 2318-L01809	19p	
274	BRCA2 probe 1606-L01188		exon 11 end
283	BRCA2 probe 1607-L01189		exon 12
292	Control probe 0990-L00567	11q	
301	BRCA2 probe 2280-L01771		exon 13
310**	BRCA2 probe 9809-L10257		exon 5
319**	BRCA2 probe 9296-L11090		exon 27
328	BRCA2 probe 1610-L01192		exon 15
337	BRCA2 probe 1611-L01193		exon 16
346	BRCA2 probe 4585-L03983		exon 6
355	BRCA2 probe 2281-L01772		exon 17
364	BRCA2 probe 1613-L01195		exon 18
373**	Control probe 2667-L04984	11q	
382	BRCA2 probe 1614-L01196		exon 19
391**	BRCA2 probe 8266-L08129		exon 20
400**	Control probe 0801-L00639	13q	
409	BRCA2 probe 2069-L01970	T .	exon 21
418	BRCA2 probe 1617-L01199		exon 22
427	Control probe 1108-L00679	8q	
436**	BRCA2 probe 8267-L08130		exon 24
445**	BRCA2 probe 8268-L08131		exon 25
454	CG018 probe 2144-L01619		9 Kb after BRCA2
463	BRCA2 probe 4586-L03984		exon 26
472**	BRCA2 probe 9293-L09584		exon 27
481	Control probe 1060-L00628	17q	

Tabela 08 – Sondas referentes a SALSA MLPA kit P077

Length (nt)	SALSA MLPA probe	Chromosoma reference	l position BRCA2
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visib	ole with less than 100 ng san	nple DNA
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 r	nt fragment indicates incomp	lete denaturation
100	X-fragment: Specific for the X chromo		
105	Y-fragment: Specific for the Y chromo	some	
124	Reference probe 04235-L08770	8p22	
130	BRCA2 probe 12289-L13282	ļ .	Exon 11
136	Reference probe 09938-L10397	8q13	
148	BRCA2 probe 02072-L01127		Exon 1
154	BRCA2 probe 12290-L13283		Exon 6
160	BRCA2 probe 12291-L13284		Exon 11
166	BRCA2 probe 12292-L14535		Exon 27
172	Reference probe 4114-L03474	9q34	
178	BRCA2 probe 12294-L13287		Exon 4
184	BRCA2 probe 12295-L13288		Exon 26
190	BRCA2 probe 09811-L10259		Exon 23
196	BRCA2 probe 12296-L13289		Exon 11
202	BRCA2 probe 12297-L13290		Exon 8
208	Reference probe 03225-L14390	5q35	
214	BRCA2 probe 12299-L13292		Exon 12
220	BRCA2 probe 12300-L13293	ļ .	Exon 16
226	BRCA2 probe 12301-L14436		Exon 9
232	BRCA2 probe 12302-L13295		Exon 19
238	BRCA2 probe 12303-L13296		Exon 17
244	BRCA2 probe 12304-L13297		Exon 4
250	Reference probe 02658-L02125	11q23	
256	BRCA2 probe 12305-L14344		Exon 3
265	BRCA2 probe 12306-L13299	ļ .	Exon 7
274	BRCA2 probe 12307-L13300	ļ .	Exon 18
283	BRCA2 probe 12308-L13301	ļ .	Exon 25
292	BRCA2 probe 08343-L08275		Upstream exon 1
301	BRCA2 probe 12309-L13302		Exon 21
310	BRCA2 probe 12310-L13303	ļ .	Exon 27
319	Reference probe 10677-L11259	6p12	Exon 29
328	BRCA2 probe 12312-L13305		Exon 13
337	BRCA2 probe 12313-L13306		Exon 5
346	BRCA2 probe 12314-L13307		Exon 13
355	BRCA2 probe 12315-L13308		Exon 10
364	BRCA2 probe 12316-L13309		Exon 16
373	Reference probe 11001-L11672	4q22	
382	BRCA2 probe 12318-L13311		Exon 21
391	BRCA2 probe 12319-L13312		Exon 8
400	BRCA2 probe 12320-L13313		Exon 12
409	BRCA2 probe 12321-L13314		Exon 20
418	BRCA2 probe 12322-L13315		Exon 15
427	BRCA2 probe 12323-L13316		Exon 2
437	BRCA2 probe 01618-L14536	ļ	Exon 24
445	Reference probe 09612-L09907	20p12	
454	BRCA2 probe 12324-L13317	ļ	Exon 14
463	BRCA2 probe 12325-L13318	ļ	Exon 18
472	BRCA2 probe 12326-L13319	ļ .	Exon 8
481	Reference probe 09772-L10187	15q21	

# 3.2.6.1 Hibridização

Em tubos de 0,2 µL, diluir 20 a 500 ng de DNA genômico em 5µL de TE (pH 8.2 e 1 mM de EDTA). É importante que todas as amostras estejam na mesma concentração para que o resultado final não seja duvidoso.

Desnaturar as amostras no termociclador a 98°C por 5 minutos e resfriá-las a 25°C antes de abrir o termociclador. Adicionar a cada tubo 1,5 µL de *Salsa probemix* (que contém as sondas A e B), 1,5 µL de *MLPA buffer* e misturar com cuidado. Aquecer por 95°C por 1 minuto, seguido de um *hold* a 60°C por 16 horas (podendo variar de 12 a 24 horas).

#### 3.2.6.2 Reação de ligação

Reduzir a temperatura para 54°C antes de abrir o termociclador. Adicionar a cada amostra 32 μL da enzima *Ligase-65 mix* (3 μL de *ligase buffer* A, 3 μL de *ligase buffer* B, 1 μL de *Ligase-65*, 25 μL de H<sub>2</sub>O) e misturar bem. Incubar a 54°C por 15 minutos e a 98°C por 5 minutos. Resfriar as amostras a 15°C. Nesta etapa, ocorre a ligação das sondas A e B hibridizadas ao DNA correspondente de cada região para então permitir a amplificação por PCR.

O *mix Ligase-65* deve ser preparado em menos de 1 hora antes do uso e armazenado em gelo.

#### 3.2.6.3 PCR

Esta reação deve ser preparada em novos tubos de 0,2  $\mu$ L: Adicionar a cada um 4  $\mu$ L de *Salsa PCR buffer*, 26  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O e 10  $\mu$ L da reação de ligação. Enquanto os tubos estão a 60°C no termociclador, adicionar 10  $\mu$ L de *Polymerase mix* (2  $\mu$ L de *Salsa PCR primers*, 2  $\mu$ L de *Salsa enzyme dilution buffer*, 0,5  $\mu$ L de *Salsa polymerase*, 5,5  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O; misturar bem) e iniciar a reação:

35 ciclos →  $95^{\circ}\text{C}$  por 30 segundos

60°C por 30 segundos

72°C por 1 minuto;

72°C por 20 minutos;

Hold a 15°C.

### 3.2.6.4 Separação dos produtos por eletroforese capilar

Após a reação de PCR, deixar os tubos por 1 hora em local escuro para diminuir a quantidade de *shoulder peaks* na eletroforese capilar pela adição de nucleotídeos adeninas no final das cadeias amplificadas. Em seguida, para cada amostra deve-se misturar 1 μL da PCR com 0,25 μL de padrão de genotipagem ET-550R (*GE Biosystems*) e 7 μL de detergente Tween 20 (*GE Biosystems*) a 0,1% na placa de injeção. Cada placa contendo as reações de MLPA deve estar acompanhada de 6 tubos de polímero LPA e 2 placas com tampão para lavagem dos capilares do *MegaBACE-1000*.

As amostras devem ser desnaturadas a 80°C por 2 minutos e logo em seguida colocadas no *MegaBACE-1000*. Para que a leitura das amostras seja realizada, este equipamento deve conter filtros de genotipagem para leitura de comprimentos de onda de 540 a 570nm, compatível aos marcadores ET-550R e FAM. As amostras devem ser injetadas nos capilares a 3kV por 2 minutos e a corrida deve ser realizada a 10kV por 90 minutos.

Os dados brutos gerados na eletroforese capilar devem ser trabalhados no programa Fragment Profile (Amersham Biosciences / GE Biosystems). Deve-se montar um peak filter para cada kit utilizado, indicando quais tamanhos de sondas devem ser detectados e considerados para análise (estes dados foram fornecidos pela MRC Holland). Este foi combinado à reação correspondente e os dados obtidos foram salvos em um arquivo de bloco de notas (.txt). Estes dados foram importados pelo Coffalyser (MRC Holland), um programa baseado em Excel que analisa as reações e fornece o resultado final. Este programa também é capaz de informar quais possíveis erros podem estar ocorrendo nas reações. Muitas vezes o programa impede que a análise continue ou somente informa o usuário de um possível interferente que gera um resultado duvidoso.

#### 4. **RESULTADOS**

# 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Selecionamos 73 pacientes atendidos no ambulatório de oncologia do InRad-HCFMUSP por terem risco de serem portadores de mutações deletérias nos genes BRCA1 e BRCA2 maior ou igual a 10% de acordo com os critérios de Evans, Frank e BRCAPRO. A idade mediana dos pacientes selecionados é de 48 anos (24-78) e a mediana de casos de câncer na família é de 4 (0-13).

A tabela 09 mostra os valores obtidos nos testes de Frank, Evans e BRCAPRO. O valor mínimo muito baixo obtido com Frank se deve ao fato deste teste não pontuar a presença de câncer de mama em homens. Quanto a BRCAPRO, o valor máximo foi obtido por dois casos: um em que a família da paciente é composta de oito pessoas que já tiveram algum tipo de câncer (quatro de ovário, incluindo a paciente, três de mama e um de colo do útero) e outro onde a paciente teve câncer de mama e o histórico familiar é composto de mais três casos de câncer de mama, um de ovário, um de estômago e uma leucemia. Apesar do valor de BRCAPRO nos levar a entender como certa a presença de uma alteração deletéria em BRCA1 ou BRCA2 para explicar o alto número de casos de câncer nestas famílias, nenhuma mutação confirmadamente patogênica foi encontrada nestas pacientes.

Tabela 09: Valores de risco relativos aos testes aplicados

Teste aplicado	Valor mínimo	Valor Máximo	Mediana
Frank	0	56.3	11.2
BRCAPRO 1	0	95.6	3.9
BRCAPRO 2	0	96.6	3.8
Total	0.1	100	13.4
Evans 1	1	44	8
Evans 2	1	31	8
Total	2	75	16

Os dados clínicos dos pacientes com câncer de mama estão nas tabelas 10 e 11 (abaixo). Observamos que mais de 70% dos casos são unilaterais e o tipo mais frequente é o carcinoma ductal invasivo (inclusive nos segundos tumores de casos de câncer bilateral), característica comum dos tumores malignos de mama. Quanto aos receptores hormonais, os de estrógeno (ER) e progesterona (PR) foram predominantemente positivos, ao contrário de Her2, porém há mais casos cuja expressão deste receptor é desconhecida. Dentre os casos de receptores negativos, somente sete são do tipo triplo negativo e dois correspondem a casos de pacientes com mutação germinativa em BRCA1 e nenhum em BRCA2. Quanto ao estadiamento clínico, predominam os tumores de classificação 2 e 3. Linfonodos comprometidos foram encontrados em 22 pacientes e a metástase ocorreu em dois deles.

Tabela 10: Dados clínico-patológicos dos pacientes com câncer de mama

10.000		jicos dos pacientes : o câncer		o câncer
	Número de	Frequência (%)	Número de	Frequência
	casos		casos	(%)
<u>Histologia</u>				
CDI	57	90.5	13	20.6
CLI	2	3.2	0	
CDIS	3	4.8	2	3.2
CMI	1	1.5	0	
ALP	0		1	1.5
Desconhecidos	0		0	
<u>T</u> 0				
	5	7.9	2	3.2
1	18	28.6	6	9.5
2	22	35.0	3	4.8
3	12	19.0	1	1.5
4	6	9.5	1	1.5
Desconhecido	0		3	
<u>N</u> 0				
0	40	63.5	7	11.1
1	16	25.5	5	7.9
2	6	9.5	0	
Desconhecido	1	1.5	4	6.3
<u>M</u>				
<u>M</u> 0	61	96.8	12	19.0
1	2	3.2	1	1.5
Desconhecido	0		3	4.8
Estadiamento clínico				
0	5	7.9	3	4.8
1	14	22.2	3	4.8
2	25	39.8	5	7.9
3	18	28.6	2	3.2
4	1	1.5	0	
Desconhecidos	0		3	4.8
<u>ER</u>				
Positivo	39	61.9	6	9.4
Negativo	13	20.6	2	3.1
Inconclusivo	2	3.2	0	
Desconhecido	9	14.3	8	12.7
<u>PR</u>				
Positivo	36	57.2	5	7.9
Negativo	17	27.0	3	4.8
Inconclusivo	1	1.5	0	
Desconhecido	9	14.3	8	12.7
<u>Her2</u>				
Positivo	16	25.4	1	1.5
Negativo	23	36.5	3	4.8
Inconclusivo	11	17.5	3	4.8
Desconhecido	13	20.6	9	14.3

Desconhecido 13 20.6 9 14.3

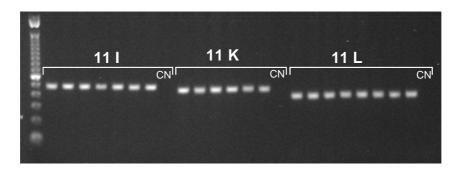
CDI: carcinoma ductal invasivo; CLI: carcinoma lobular invasivo; CDIS: carcinoma ductal in situ, CMI: carcinoma lobular invasivo; ALP: adenocarcinoma lobular papilífero.

Tabela 11: Lateralidade dos cânceres de mama

	Número de casos	Frequência (%)	
<u>Lateralidade</u>			
Unilateral	47	74.6	
Bilateral sincrônico	5	7.9	
Bilateral Metacrônico	11	17.5	

# 4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

A extração de DNA foi feita para todos os pacientes. Os produtos das PCRs foram verificados por eletroforese em gel de agarose (figura 05) e em seguida realizamos o seqüenciamento direto dos fragmentos.



**Figura 05: Gel de agarose representativo da qualidade dos produtos de PCR.**A figura mostra os produtos das PCRs correspondentes aos fragmentos I, K e L do exon 11 do gene BRCA2 com seus respectivos controles negativos (CN).

A análise por sequenciamento direto foi realizada em todos os pacientes, sendo que as mutações deletérias encontradas foram confirmadas em um segundo sequenciamento.

As alterações encontradas nos genes BRCA1 e BRCA2 foram verificadas na literatura e no site do BIC, que é um banco de dados *online* destes genes e também armazena informações úteis para os grupos de pesquisa que o

acessam. As seqüências utilizadas para a análise estão depositadas no banco de dados do GenBank, do NCBI, com os números de acesso NM\_007294 para BRCA1 e NM 000059 para BRCA2.

Todos os pacientes apresentaram alguma alteração em pelo menos um dos genes analisados. Em relação ao gene BRCA1, encontramos 60 alterações (tabela 10):

- 36 variantes intrônicas (4/36 não possuem significado clínico);
- Sete mutações sinônimas (4/7 sem significado clínico);
- Uma alteração 3'UTR (significado clínico desconhecido);
- Uma mutação frameshift localizada no exon 20: 5382insC (figura 06) é deletéria e foi primeiramente descrita como mutação fundadora Ashkenazi por Simard e colaboradores, em 1994. A inserção de um C no nucleotídeo 5382 leva a um erro de leitura a partir deste ponto e ao aparecimento de um stop códon na posição 1829aa. Esta alteração foi encontrada em duas pacientes de famílias diferentes: uma aos 53 anos (heredograma da figura 07) e a outra aos 64 anos (heredograma da figura 08), acometidas pelo carcinoma ductal invasivo de mama de estadiamento IIA e triplo-negativo para ER, PR e Her2;

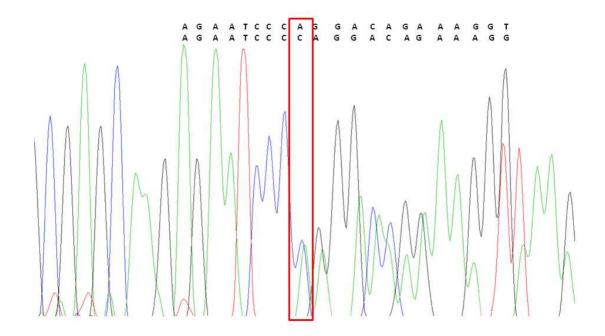


Figura 06: Mutação frameshift 5382insC, no exon 20 de BRCA1.

A inserção de uma citosina leva a um erro de leitura evidenciado pela formação de picos duplos no eletroferograma a partir do ponto onde ocorre a alteração.

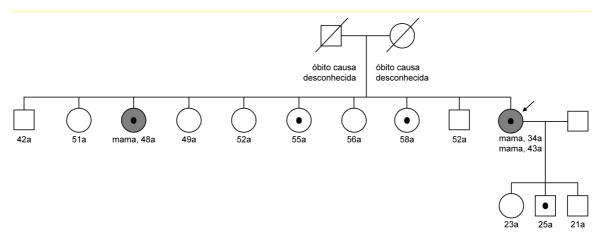


Figura 07: Heredograma da família de uma das pacientes (indicada pela seta) com a mutação 5382insC.

Os três filhos da paciente e todas as suas irmãs (exceto a de 51 anos) foram testados. Os indivíduos em cinza foram acometidos pelo câncer e os sinalizados são portadores da mutação.

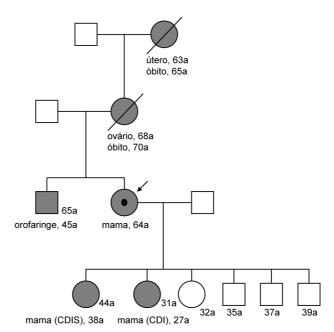


Figura 08 : Heredograma da outra paciente (seta) portadora de 5382insC.

Oferecemos o teste genético a seus familiares, mas nenhum aceitou participar do rastreamento.

Os indivíduos em cinza foram acometidos pelo câncer e os sinalizados são portadores da mutação.

• Uma mutação nonsense, também deletéria e localizada no exon 20: R1751X (figura 09), onde a troca de um C por um T no nucleotídeo 5370 troca um códon correspondente a uma arginina por um stop códon na posição 1751aa (Ladopoulou, 2002). A paciente portadora desta mutação (heredograma na figura 10) teve carcinoma ductal invasivo de estadiamento IIIA aos 40 anos e um carcinoma ductal invasivo de estadiamento IIA aos 42 anos (dados ignorados sobre os receptores de estrógeno, progesterona e Her2);

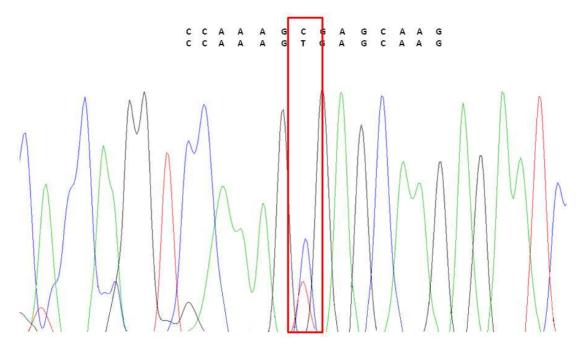
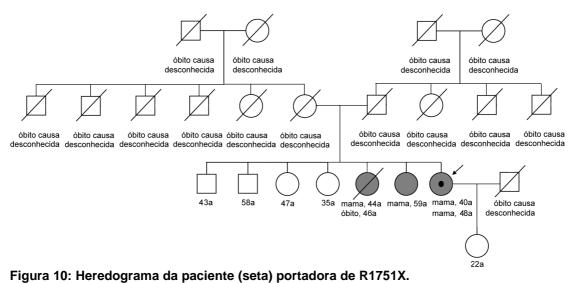


Figura 09: Mutação *nonsense* R1751X, também no exon 20 de BRCA1.

A troca de um C por um T (evidenciada na figura) leva à troca de uma arginina por um *stop codon*.



Oferecemos o teste genético a seus familiares, mas nenhum aceitou participar do rastreamento.

Os indivíduos em cinza foram acometidos pelo câncer e os sinalizados são portadores da mutação.

• Uma mutação do tipo in frame deletion no exon 23: VV1809del (figura 11), onde a deleção dos nucleotídeos GTTGTG na posição 5544nt, referente ao códon 1809, leva à deleção de 2 de 3 valinas em tandem. Há somente um relato no BIC sobre esta alteração, onde é citada como uma mutação de significado clínico indeterminado, e um artigo na literatura (Sobol, 1996), que relaciona a mutação a tumores altamente proliferativos, sem dados mais preciso sobre sua patogenicidade. A paciente portadora desta alteração foi acometida por um carcinoma ductal invasivo aos 34 anos de estadiamento IIIB e do tipo triplo negativo, sem histórico familiar de câncer;

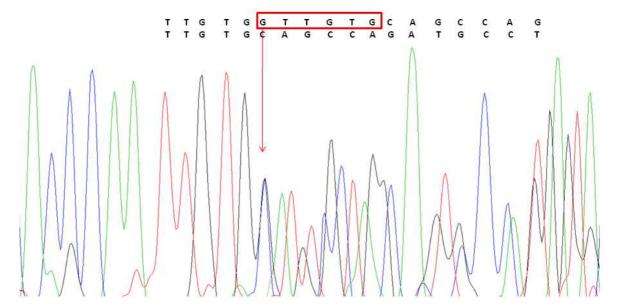


Figura 11: Deleção in frame VV1809del, no exon 23 de BRCA1.

A deleção dos nucleotídeos GTTGTG leva a uma sobreposição do sinal no eletroferograma e à deleção de dois códons correspondentes a duas valinas.

• 13 mutações missense. Destas, cinco não possuem significado clínico e uma é deletéria: R71G (figura 12), no exon 05, leva a um defeito no mecanismo de splicing e origina um códon de terminação. Esta é uma mutação fundadora da região da Galícia, na Espanha (Vega, 2001), que encontramos em uma paciente acometida pelo carcinoma medular invasivo de estadiamento I aos 43 e pelo adenocarcinoma lobular papilífero de estadiamento I aos 45 anos (ver heredograma na figura 13);

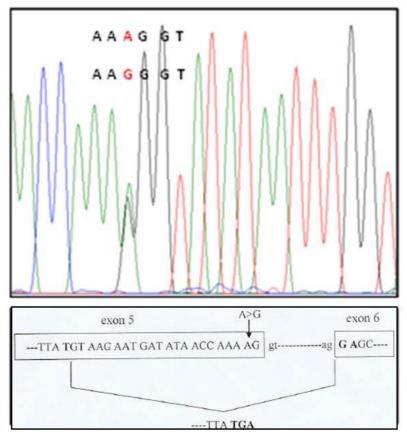


Figura 12: Mutação R71G, no exon 5 do gene BRCA1.

Note a presença de dois picos (nucleotídeos A e G, em vermelho) no penúltimo nucleotídeo do exon 5. Isto altera o sítio de *splicing*, levando à deleção de 22 bp do exon 5 e ao aparecimento de um códon de terminação (TGA) após a junção ao exon 6 (adaptado de Vega et al, 2001).

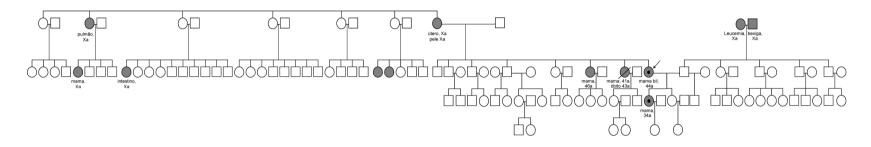


Figura 13: Heredograma correspondente à família da paciente portadora da mutação R71G (seta).

Dentre os familiares, suas duas filhas realizaram o teste genético e somente uma delas é portadora da mutação. Esta filha foi posteriormente acometida por um câncer de mama, aos 34 anos.
Os indivíduos em cinza foram acometidos pelo câncer e os sinalizados são portadores da mutação.

Tabela 12: Alterações encontradas em BRCA1

		N. 1. 77.1			Aminoácido	Tipo de	Importância	Pacientes
Designação	Exon	Nucleotídeo	Códon	Base trocada	trocado	mutação	clínica	acometidas
IVS1-12delC	2	101-12		delC		IVS	desconhecida	1
K20N	2	179	20	$C \rightarrow A$	Lys → Asn	М	desconhecida	1
IVS2-14C/T		200-14		C → T		IVS	desconhecida	1
IVS2-11delT	3	200-11		delC		IVS	desconhecida	1
233G/A		233	38	$G \rightarrow A$	Lys → Lys	Syn	não	2
R71G		330	71	$A \rightarrow G$	Arg → Gly	М	SIM	1
IVS5+23T>A	5	331+23		$T \rightarrow A$		IVS	desconhecida	1
IVS5+35A/C		331+35		$A \rightarrow C$		IVS	desconhecida	10
IVS7+36T/C		560+36		T → C		IVS	desconhecida	9
IVS7+37T/G		560+37		$T \rightarrow G$		IVS	desconhecida	5
IVS7+38T/C		560+38		$T \rightarrow C$		IVS	desconhecida	25
IVS7+39T/C		560+39		$T \rightarrow C$		IVS	desconhecida	6
IVS7+41C/T		560+41		$C \rightarrow T$		IVS	desconhecida	9
IVS7+42T/C		560+42		$T \rightarrow C$		IVS	desconhecida	2
IVS7+43T/C	-	560+43		$T \rightarrow C$		IVS	desconhecida	3
IVS7+47delT	7	560+47		delT		IVS	desconhecida	2
IVS7+49delT		560+49		delT		IVS	desconhecida	30
IVS7+50T/C		560+50		$T \rightarrow C$		IVS	desconhecida	3
IVS7+50delT		560+50		delT		IVS	desconhecida	4
IVS7+51T/C		560+51		$T \rightarrow C$		IVS	desconhecida	25
IVS7+52C/T		560+52		$C \rightarrow T$		IVS	desconhecida	17
IVS7+53T/G		560+53		$T \rightarrow G$		IVS	desconhecida	2
IVS7+62deIT		560+62		delT		IVS	desconhecida	29
IVS8-58delT		667-58		delT		IVS	desconhecida	1
IVS8-64delT	9	667-64		delT		IVS	desconhecida	33
IVS8-80T/C		667-80		$T \rightarrow C$		IVS	desconhecida	1
IVS10-49T/C		790-49		T → C		IVS	desconhecida	18
Q356R		1186	356	$A \rightarrow G$	Gln → Arg	М	desconhecida	1
2090A/G		2090	657	A →G		Syn	desconhecida	2
D693N		2196	693	$G \rightarrow A$	Asp → Asn	М	não	3
2201C/T		2201	694	$C \rightarrow T$		Syn	não	27
N723D		2286	723	$A \rightarrow G$	Asn → Asp	М	desconhecida	1
2430T/C	44	2430	771	$T \rightarrow C$		Syn	não	21
V801L	11	2521	801	$G \rightarrow C$	Val → Leu	М	desconhecida	1
P871L		2731	871	$C \rightarrow T$	Pro → Leu	М	Não	21
H888Y		2781	888	$C \rightarrow T$	His → Tyr	М	desconhecida	1
E1038G		3232	1038	$A \rightarrow G$	Glu → Gly	М	não	16
S1040N		3238	1040	$G \rightarrow A$	Ser → Asn	М	desconhecida	11
3509A/C		3509	1130	$A \rightarrow C$		Syn	desconhecida	8
K1183R		3667	1183	$A \rightarrow G$	Lys → Arg	М	não	21

Designação	Exon	Nucleotídeo	Códon	Base trocada	Aminoácido trocado	Tipo de mutação	Importância clínica	Pacientes acometidas
I1275V		3942	1275	A → G	lle → Val	M	desconhecida	1
IVS11+3A/C	11	4215+3		$A \rightarrow C$		IVS	desconhecida	3
4427T/C	13	4427	1436	T → C	Ser → Ser	Syn	não	37
IVS14-63G/C	15	4604-63		$G \rightarrow C$		IVS	desconhecida	24
S1613G	16	4956	1613	$G \rightarrow A$	Ser → Gly	М	não	30
IVS16-20A/G		5106-20		$A \rightarrow G$		IVS	desconhecida	3
IVS16-45T/A	17	5106-45		$T \rightarrow A$		IVS	desconhecida	2
IVS16-65A/T		5106-65		$A \rightarrow T$		IVS	desconhecida	1
IVS16-68A/T		5106-68		$A \rightarrow T$		IVS	desconhecida	1
IVS16-68A/G		5106-68		$A \rightarrow G$		IVS	Não	36
IVS16-92A/G		5106-92		$A \rightarrow G$		IVS	Não	34
IVS16-92A/T		5106-92		$A \rightarrow T$		IVS	desconhecida	1
IVS18+66G/A	18	5271+66		$G \rightarrow A$		IVS	Não	30
IVS18+85delT		5271+85		delT		IVS	desconhecida	1
R1751X		5370	1751	C → T	Arg → stop	N	SIM	1
5382insC	20	5382	1755	Stop1829	Stop1829	F	SIM	2
IVS22+8T/C	22	5525+8		T → C		IVS	não	1
VV1809del	23	5544	1809	delGTTGTG	del ValVal	IFD	desconhecida	1
5675C/G	0.4	5675	1852	C → G	Thr → Thr	Syn	desconhecida	1
5747C/G	24	UGA+36		$C \rightarrow G$		3'UTR	desconhecida	2

F = mutação com mudança de pauta de leitura (*frameshift*); M = mutação com troca de sentido (*missense*); IVS = seqüência interferente (*intervening sequence*); Syn = mutação sinônima (*synonimous*); N = mutação sem sentido (*nonsense*); IFD = mutação por deleção sem mudança na pauta de leitura (*in frame deletion*).

Em relação ao gene BRCA2, encontramos 57 alterações (tabela 11):

- 11 mutações sinônimas (6/11 sem significado clínico);
- 26 mutações *missense* (8/26 sem significado clínico);
- 14 variantes intrônicas (2/14 não apresentam significado clínico);
- 1 alteração 5'UTR (sem significado clínico);

## • 2 mutações nonsense:

R2318X (figura 14), no exon 13, onde a troca de um C por T leva ao aparecimento de um *stop codon* no lugar de uma arginina, originando uma proteína truncada (Ikeda, 2001). A paciente portadora desta mutação não foi acometida pelo câncer (ver heredograma da figura 15). Seus dois filhos concordaram em realizar o teste genético: somente a mulher é portadora da mutação;

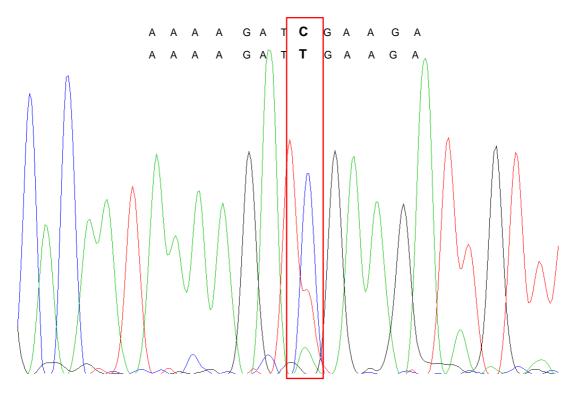


Figura 14: Eletroferograma evidenciando a mutação R2318X no exon 13 de BRCA2. A troca de C por T forma dois picos no eletroferograma e leva ao aparecimento de um códon de terminação.

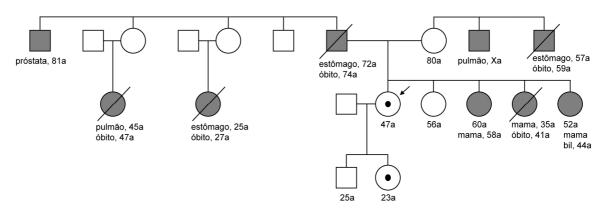


Figura 15: Heredograma da paciente portadora da mutação R2318X (seta).

Seus dois filhos foram os únicos membros da família que optaram pelo teste genético e somente a filha é portadora da mutação.

Os indivíduos em cinza foram acometidos pelo câncer e os sinalizados são portadores da mutação.

➤ R3128X (figura 16), onde a troca de um C por T no exon 25 tem o mesmo efeito (Loader, Rowley & Levenkron, 1998). A paciente que apresenta esta mutação teve um carcinoma ductal invasivo de estadiamento IIIA aos 41 anos (figura 17). Dados sobre os receptores hormonais permanecem desconhecidos;

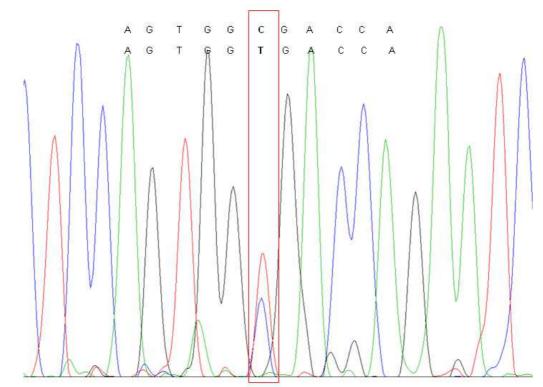


Figura 16: Mutação R3128X, do exon 25 de BRCA2, onde ocorre a troca de C por T (negrito).

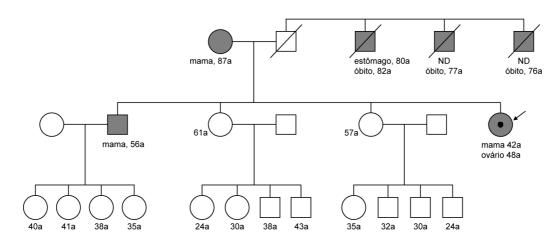
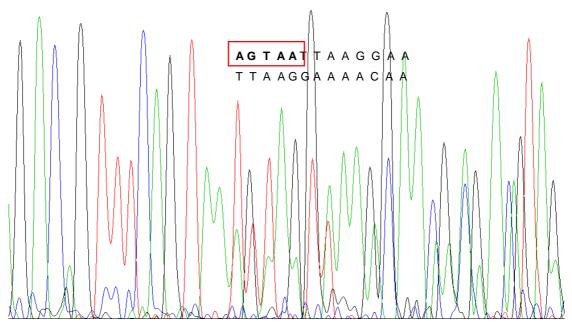


Figura 17: Heredograma correspondente à paciente portadora de R3128X (seta). Nenhum dos familiares optou pelo teste genético.

Os indivíduos em cinza foram acometidos pelo câncer e os sinalizados são portadores da mutação.

- 3 mutações frameshift, todas no exon 11:
  - ▶ 5844del5 (figura 18), cuja deleção dos nucleotídeos AGTAA leva ao erro no sentido de leitura e produção de uma proteína truncada (Pal, 2004). A paciente foi acometida por um carcinoma ductal invasivo de estadiamento IIA aos 55 anos (figura 19). Dados sobre receptores de estrógeno, progesterona e Her2 são ignorados. A paciente também foi acometida por um câncer colorretal aos 63 anos;



**Figura 18: Mutação 5844del5, no exon 11 de BRCA2.**Nesta figura podemos identificar a amplificação de suas fitas após os cinco nucleotídeos deletados (em negrito).

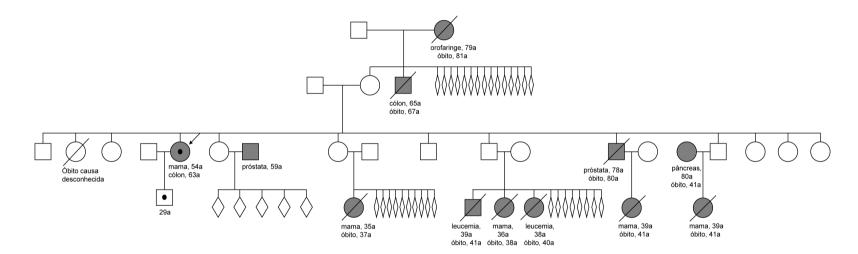


Figura 19: Heredograma da paciente portadora de 5844del5 (seta).

Somente seu filho mostrou interesse e consentiu que realizássemos o teste genético. Ele não foi acometido pelo câncer mas, assim como a mãe, também é portador desta mutação deletéria.

Os indivíduos em cinza foram acometidos pelo câncer e os sinalizados são portadores da mutação.

➢ 6633del5 (figura 20), onde a deleção de CTTAA no nucleotídeo 6633 tem mesmo efeito da mutação anterior pelo aparecimento de um *stop codon* em 2138aa (Loader, Rowley & Levenkron, 1998). A paciente teve um carcinoma ductal invasivo com ER, PR e Her2 positivos aos 42 anos (ver heredograma na figura 21). Dados sobre classificação patológica do tumor e estadiamento são desconhecidos;

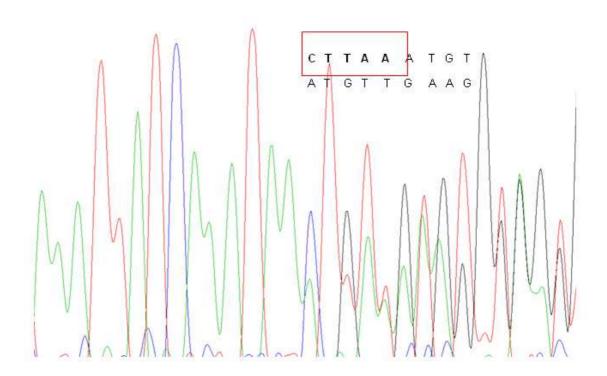


Figura 20: Mutação 6633del5, que ocorre no exon 11 de BRCA2. Observe a formação de picos duplos após a deleção dos nucleotídeos CTTAA (em negrito).

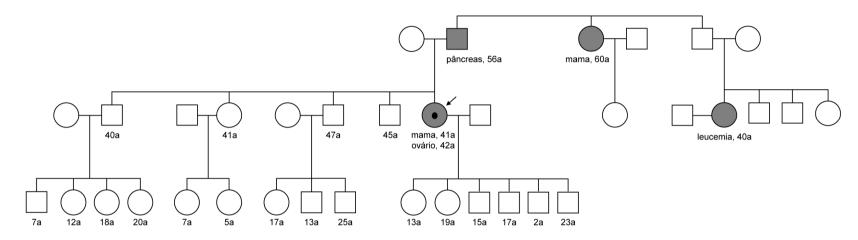


Figura 21: Heredograma da paciente portadora de 6633del5 (seta).

Apesar do teste genético ter sido oferecido a toda a família, nenhum dos indivíduos desejou realizar o teste.

Os indivíduos em cinza foram acometidos pelo câncer e os sinalizados são portadores da mutação.

6610insTT (figura 22), cuja inserção dos nucleotídeos TT na posição 6610nt também leva a um erro de leitura e ao aparecimento de um stop codon na posição 2137aa (figura 23), o que gera uma proteína truncada. Esta alteração ainda não foi descrita na literatura e não consta no banco de dados do BIC. A paciente teve um carcinoma ductal invasivo de estadiamento I, ER e PR positivos e Her2 inconclusivos aos 45 anos. Conforme o heredograma (figura 24), quatro membros da família da paciente aceitaram o teste genético e todos são portadores da mutação, mostrando a segregação da mutação comprovada em três gerações.

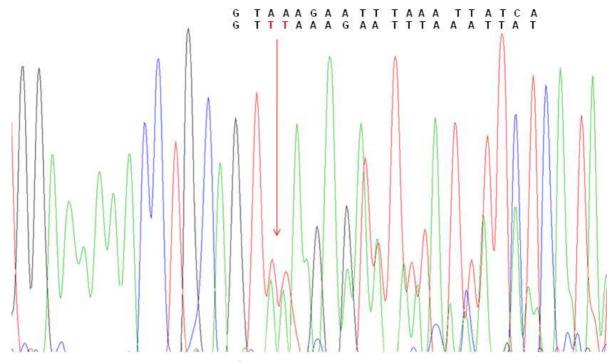


Figura 22: Mutação 6610insTT, também no exon 11 de BRCA2. Esta figura nos permite observar os nucleotídeos TT inseridos (em vermelho) e a consequente sobreposição das fitas.



Figura 23: Caracterização da mutação 6610insTT utilizando o software Gene Runner.

- A: sequência de nucleotídeos mostrando o local de inserção das timinas na posição 6610nt;
- B: sequência de códons sem a inserção, evidenciando a posição 2128aa;
- C: inserção TT e evidenciando o aparecimento de um códon de terminação em 2137aa.

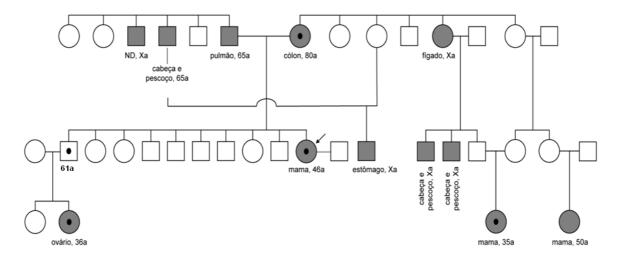


Figura 24: Heredograma da paciente portadora de 6610insTT.

O teste genético foi oferecido aos familiares e aqueles que aceitaram sua realização foram: a mãe da paciente (que teve câncer colorretal aos 80 anos), o irmão (sem histórico de câncer), uma sobrinha (filha deste mesmo irmão, com câncer de ovário aos 37 anos) e uma prima de 2° grau (com câncer de mama aos 35 anos).

Tabela 13: Alterações encontradas em BRCA2.

Designação	Exon	Nucleotídeo	Códon	Base	Aminoácido	Tipo de	Importância	Pacientes
Designação	EXUII	Nucleotideo	Codon	trocada	trocado	mutação	clínica	acometidas
IVS1-26G/A		190-26		$G \rightarrow A$		IVS	desconhecida	16
203G/A	2	5'UTR		$G \rightarrow A$		5'UTR	não	11
IVS2+62T/G		295+62		$T \rightarrow G$		IVS	desconhecida	2
IVS2-7T/A	3	296-7		$T \rightarrow A$		IVS	desconhecida	1
Y42C		353	42	$A \rightarrow G$	Tyr por Cys	M	Desconhecida	1
A75P		451	75	$G \rightarrow C$	Ala → Pro	М	desconhecida	1
459T/G		459	77	$T \rightarrow G$	Thr → Thr	Syn	desconhecida	1
IVS4+70G/C	4	653+70		G → C		IVS	desconhecida	6
IVS6-19T/C	7	745-19		T → C		IVS	desconhecida	1
IVS8+56C>T	8	965		C → T		IVS	desconhecida	15
N289H		1083	283	$A \rightarrow C$	Asn → His	М	não	2
N319T		1184	319	$A \rightarrow C$	Asn →Thr	М	desconhecida	1
H372N		1342	372	$C \rightarrow A$	His →Asn	М	não	40
1593A/G	10	1593	455	$A \rightarrow G$	Ser → Ser	Syn	Não	3
T582P		1972	582	$A \rightarrow C$	Thr $\rightarrow$ Pro	М	desconhecida	1
2016T/C		2016	596	$T \rightarrow C$	Asp → Asp	Syn	desconhecida	1
A622V		2093	622	$C \rightarrow T$	Ala → Val	М	desconhecida	1
2457T/C		2457	753	T → C	His → His	Syn	não	1
M784V		2578	784	$A \rightarrow G$	Met → Val	М	desconhecida	1
S976I		3154	976	TC → AT	Ser → Ile	М	não	1
N991D		3199	991	$A \rightarrow G$	Asn → Asp	М	não	2
3624A/G		3624	1132	$A \rightarrow G$	Lys →Lys	Syn	não	30
4035T/C		4035	1269	$T \rightarrow C$	Val → Val	Syn	não	27
4296G/A		4296	1356	$G \rightarrow A$	Leu → Leu	Syn	desconhecida	1
D1420Y		4486	1420	$G \rightarrow T$	Asp → Tyr	М	não	1
4791G/A		4791	1521	$G \rightarrow A$	Leu → Leu	Syn	não	36
K1789Q		5593	1789	$A \rightarrow C$	Lys → Gln	М	desconhecida	1
5844del5	44	5844	1872	delAGTAA	Stop1873	F	SIM	1
D1923A	11	5996	1923	$A \rightarrow C$	Asp → Ala	М	desconhecida	1
R2034C		6328	2034	$C \rightarrow T$	Arg → Cys	М	desconhecida	2
G2044V		6359	2044	$G \rightarrow T$	Gly → Val	М	desconhecida	1
6610insTT		6610	2128	insTT	Stop2137	F	SIM	1
6633del5		6633	2135	delCTTAA	Stop2138	F	SIM	1
6741C/G		6741	2171	$C \rightarrow G$	Val → Val	Syn	desconhecida	32
S2213P		6865	2213	$T \rightarrow C$	Ser → Pro	М	desconhecida	3
M2262R		7013	2262	$T \rightarrow G$	Met → Arg	М	desconhecida	1
IVS11+80del4		7069+80		delTTAA		IVS	desconhecida	32
R2318X	13	7180	2318	$C \rightarrow T$	Arg → stop	N	SIM	1
T2337I		7238	2337	$C \rightarrow T$	Thr → Ile	М	desconhecida	1
M2393V	14	7405	2393	$A \rightarrow G$	Met → Val	M	desconhecida	5

Designação	Exon	Nucleotídeo	Códon	Base	Aminoácido	Tipo de	Importância	Pacientes
				trocada	trocado	mutação	clínica	acometidas
7470A/G	14	7470	2414	$A \rightarrow G$	Ser → Ser	Syn	não	31
A2466V		7624	2466	$C \rightarrow T$	Ala → Val	М	desconhecida	36
I2490T	15	7697	2490	T → C	lle → Thr	М	desconhecida	2
T2515I		7772	2515	$C \rightarrow T$	Thr → Ile	М	desconhecida	3
IVS16-14T/C	17	8020		$T \rightarrow C$		IVS	não	47
A2717S		8377	2717	G → T	Ala → Ser	М	Não	1
V2728I	18	8410	2728	$G \rightarrow A$	Val → Ile	М	não	1
IVS19+47C/T	19	8715+47		C → T		IVS	desconhecida	2
S2835P	20	8731	2835	$T \rightarrow C$	Ser → Pro	М	não	1
IVS21-66T/C	22	8983-66		T → C		IVS	não	32
IVS22+66A/G		9181+66		$A \rightarrow G$		IVS	desconhecida	1
IVS24-82G/A		9485-82		$G \rightarrow A$		IVS	desconhecida	2
IVS24-80G/C	25	9485-80		$G \rightarrow C$		IVS	desconhecida	2
IVS24-16T/C		9485-16		$T \rightarrow C$		IVS	desconhecida	1
R3128X		9610	3128	$C \rightarrow T$	Arg → stop	N	SIM	1
10338G/A	27	10338	3370	$G \rightarrow A$	Arg → Arg	Syn	desconhecida	1
I3412V		10462	3412	$A \rightarrow G$	lle → Val	M	desconhecida	4

F = mutação com mudança de pauta de leitura (*frameshift*); M = mutação com troca de sentido (*missense*); N = mutação sem sentido (*nonsense*); IVS = seqüência interferente (*intervening sequence*); Syn = mutação sinônima (*synonimous*).

Os grandes rearranjos genômicos foram rastreados pela técnica de MLPA. Não encontramos alterações nos genes BRCA1 e em BRCA2 de nenhum dos indivíduos testados. Sendo assim, os kits confirmatórios p087 (BRCA1) e p077 (BRCA2) não precisaram ser utilizados.

A figura 25 mostra o resultado de uma amostra sem mutação, obtido na análise do gene BRCA1 (*kit* P002C1) com o *software* Coffalyser. Sabe-se que um ou vários fragmentos estão amplificados quando a razão (*ratio*) obtida é maior ou igual a 1.3 e, no caso de haver deleção, a razão deve ser menor ou igual a 0.7.

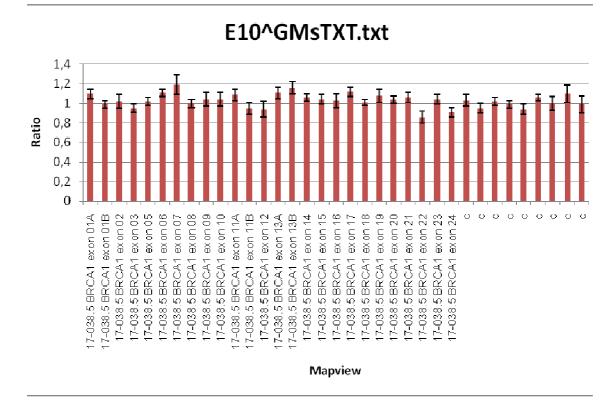


Figura 25: Modelo de resultado de MLPA gerado pelo software Coffalyser para o kit P002C1, do gene BRCA1.

As sondas nomeadas como "C" correspondem aos controles internos do kit.

## 5. **DISCUSSÃO**

O diagnóstico molecular da síndrome do câncer de mama e/ou ovário hereditária é complexo e requer a análise de toda a sequência codificante dos genes BRCA1 e BRCA2, o que gera uma grande quantidade de informações. A diferenciação de variantes deletérias, de alto ou baixo risco é um dos pontoschave para a descoberta do significado clínico e, portanto, para um resultado conclusivo do teste genético.

Os indivíduos selecionados para nosso trabalho apresentam uma ampla variação de idade e, ainda que uma das principais características das síndromes hereditárias de predisposição ao câncer seja o acometimento dos pacientes em idade jovem, não era nossa intenção restringir nossa população a uma determinada faixa etária. Encontramos nove mulheres portadoras de mutações deletérias e nenhuma delas foi acometida antes dos 40 anos, sendo que uma delas, aos 45 anos, ainda não teve diagnóstico de câncer. Esta é uma das cinco mulheres com mutação deletéria em BRCA2, e as quatro pacientes apresentaram positividade para a expressão de ER, PR e Her2. Como já foi citado na introdução deste trabalho, os cânceres de mama em portadoras de mutações deletérias em BRCA1 são em sua grande maioria do tipo triplo negativo. Nossos dados não nos possibilitam dizer que o mesmo acontece em nossas pacientes, pois apesar de duas das quatro pacientes irem de acordo com esta ausência de expressão dos receptores, não foi possível obter dados sobre os receptores hormonais das outras

pacientes com câncer de mama. De acordo com Tung e colaboradores (2010), estas pacientes poderiam expressar os receptores de estrógeno, progesterona e Her2 e ainda assim serem portadoras de mutação deletéria em BRCA1. Normalmente isto ocorre em pacientes acometidas pelo câncer em idades mais avançadas do que o usual e os tumores por elas apresentados possuem uma agressividade intermediária entre o clássico câncer hereditário triplo negativo e o de origem somática, o que levanta a hipótese destes casos serem acidentais e não estarem relacionados ao BRCA1 ou que eles ocorram por um mecanismo único e característico deste grupo.

Ao analisarmos os riscos obtidos pelos testes de Frank, Evans e BRCAPRO, podemos dizer que nenhum deles é totalmente ideal para ser utilizado como o único teste aplicado, pois em alguns casos os pacientes mostraram resultados bem conflitantes em um dos testes, mas a combinação dos três nos possibilitou escolher com mais clareza uma população de risco, cujos achados se enquadram com o que já foi proposto na literatura. A explicação pode estar no fato destes métodos de análise de risco foram desenvolvidos para populações com origem genética e grau de miscigenação diferentes da brasileira. Talvez mais importante que isto seja ainda o nível de informação destas populações, pois os testes foram desenvolvidos em países desenvolvidos, onde há uma atenção maior dos profissionais da saúde quanto à possibilidade de se tratar de um caso de síndrome hereditária, as pessoas são mais bem informadas quanto aos riscos de serem portadoras destas síndromes e o diagnóstico é feito mais precocemente.

Os resultados moleculares obtidos neste trabalho mostram uma grande quantidade de variantes intrônicas, mutações missense ou mesmo sinônimas que não possuem significado clínico conhecido, sendo que algumas nunca foram citadas na literatura. Muitas afetam várias pacientes, o que baixa a expectativa de que sejam deletérias ao considerarmos que os polimorfismos geralmente afetam pelo menos 1% da população, porém algumas mutações estão presentes em poucas ou somente uma paciente, o que as tornam mais interessantes de se pesquisar. Por outro lado, muitas vezes os polimorfismos podem não ter significado clínico algum, mas há casos em que podem aumentar o risco para o aparecimento do câncer quando estão em associação a outras alterações no mesmo gene ou em outros genes. Em 2002, Hadjisavvas e colaboradores estudaram a associação das mutações do gene BRCA1 S1512I e Q356R (esta presente em uma das pacientes do nosso trabalho) em uma família do Chipre. Ambas mudam a carga do aminoácido codificado em regiões importantes para a interação de BRCA1 com outras proteínas e, apesar de já terem sido relatadas no BIC como sendo polimorfismos, não foram encontradas em controles, também provenientes do Chipre, e apareceram somente na família estudada. A alteração da conformação e da função da proteína provocada por estas alterações missense foi considerada como associada ao câncer e responsável pelo histórico desta família.

Classificar variantes que desregulam a expressão gênica de isoformas naturais é um desafio, uma vez que ainda não foram completamente

estabelecidas as alterações mínimas na transcrição e na tradução que levam ao surgimento do câncer. Ao mesmo tempo em que não se pode dizer que as mutações de significado clínico desconhecido, encontradas neste trabalho não afetam a qualidade da proteína codificada, é impossível afirmar que não sejam deletérias ou aumentem as chances de gerar um câncer. Mutações que alteram o aminoácido codificado (missense) com significado clínico desconhecido podem ser deletérias, dependendo do efeito bioquímico que a troca de aminoácido terá na estrutura e função da proteína permitindo, por exemplo, romper um sítio acentuador de splicing. Da mesma forma, variantes intrônicas podem afetar os mecanismos de splicing alternativo e a transcrição gênica quando localizadas em següências-consenso ou següências acentuadoras/inibidoras destes mecanismos. Deleções e inserções in frame (um ou vários códons completos) podem alterar a afinidade entre os aminoácidos de um domínio protéico e sua função. Até mesmo as mutações sinônimas, que não alteram o aminoácido correspondente, podem causar um problema no enovelamento da proteína devido a uma mudança na velocidade de tradução resultante do aparecimento de códons mais raros (Tsai, 2008). Muitos estudos utilizam ensaios funcionais e análises in silico para buscar informações sobre tipo e local da alteração, sua conservação entre as espécies e o efeito bioquímico gerado, além de observarem sua ocorrência em grupos controles, co-segregação entre os membros de uma família e a possível associação à presença de alguma mutação deletéria (Judkins, 2005).

A mutação VV1809del, localizada no exon 23 de BRCA1, foi citada somente uma vez no BIC e uma vez na literatura, estando somente relacionada a tumores altamente proliferativos em pacientes francesas (Sobol, 1996). Em VV1809del, a deleção de duas valinas correspondentes aos códons 1809 e 1810 não provoca alteração na pauta de leitura e a proteína codificada a partir deste ponto não sofre alterações. Citando este mesmo códon 1809, a mutação V1809F já foi descrita por Williams e colaboradores (2004) como sendo deletéria, por afetar o enovelamento da proteína e a interação com outras proteínas fosforiladas. Outra prova de que esta é uma região com potencial deletério está no estudo de Gaildrat e colaboradores (2010), que mostrou que a mutação P1812A está localizada numa região altamente conservada, com elementos reguladores do splicing, e faz com que o exon 23 não seja codificado. V1809F é uma mutação missense que, assim como VV1809del, não afeta a pauta de leitura da proteína, e P1812A indica uma alta conservação da região em questão. Estes fatos nos mostram que VV1809del pode ser patogênica e merece ser melhor estudada posteriormente.

Dentre as mutações encontradas neste trabalho, uma nunca foi citada na literatura: 6610insTT (exon 11 de BRCA2), uma mutação *frameshift* que leva ao aparecimento de um códon de terminação algumas posições à frente de onde ocorre a inserção das timinas. Apesar da alteração não estar localizada no domínio de repetições BRC, Ayoub e colaboradores mostraram em 2009 que a recombinação homóloga pode ser afetada porque apesar de não ser essencial a

esta atividade, o domínio C-terminal de ligação à proteína Rad51 coordena a entrada da fase mitótica e controla a cinética de dissolução do foco de união da Rad51 com o DNA danificado. Tumores relacionados a mutações em BRCA estão ainda altamente relacionados a mutações no gene supressor tumoral TP53, com um espectro diferente das mutações encontradas em casos esporádicos (Gretarsdottir, 1998; Smith, 1999; Greenblast, 2001). Jonkers e colaboradores (2001) mostraram que a inativação de BRCA2 e TP53 medeia a tumorigênese mamária e que a ruptura da sinalização de p53 é um passo crucial para o desenvolvimento dos tumores relacionados a BRCA2. Estes fatos podem ser explicados pelo estudo de 2010 de Rajagopalan e colaboradores, que mostrou uma instabilidade genômica e a diminuição da regulação da apoptose quando BRCA2 e TP53 são inativados. Niwa e colaboradores ainda mostraram em 2009 que a BRCA2 truncada não se liga à plectina e leva a um posicionamento incorreto do centrossomo e a anormalidades nucleares. Mas talvez o melhor argumento para comprovar a patogenicidade desta mutação seja o fato da maior parte das mutações frameshift em BRCA2 serem consideradas deletérias devido à formação de códons de terminação e consequente ausência dos domínios de localização nuclear, normalmente localizados nos últimos 156 resíduos da porção C-terminal da proteína. Spain e colaboradores (1999) estudaram a mutação Ashkenazi 6174delT e mostraram que a proteína mutada é citoplasmática e a localização nuclear de BRCA2 depende deste domínio. Podemos assim concluir que a mutação 6610insTT leva à produção de uma proteína que não consegue realizar suas funções, visto que elas ocorrem no núcleo da célula.

A paciente portadora da mutação de BRCA2 6610insTT teve um câncer de mama aos 45 anos e quatro de seus parentes concordaram com a realização do teste genético. Sua mãe, um dos irmãos (único entre os testados que não teve câncer), a filha deste irmão e uma prima de segundo grau também são portadores da mutação, mostrando a segregação em três gerações de sua família e o potencial patogênico desta alteração. Outra importante característica quando o assunto é câncer hereditário é o fato da idade de acometimento por câncer diminuir ao longo das gerações, mostrando uma diminuição clássica de 10 anos entre a segunda e a terceira geração. Além disso, a mãe da paciente teve um câncer aos 80 anos, mostrando que nem sempre os pacientes são acometidos em idade jovem.

Como já mencionado, existe uma diversidade étnica grande na população brasileira devido à colonização por diversos povos, o que dificulta o achado de uma mutação fundadora específica. Entretanto, dentre as 10 mutações deletérias que encontramos até o momento, 2 do gene BRCA1 são fundadoras: R71G e 5382insC, esta encontrada em duas pacientes de famílias diferentes. Da Costa e colaboradores mostraram em 2008, através de um estudo de perfil haplotípico, que a mutação *Ashkenazi* 5382insC possui origem no leste/centro europeu, o que mostra uma contribuição significativa dos povos característicos destas regiões para a população brasileira. Outra mutação encontrada em nosso

trabalho e que já havia sido relatada por Gomes e colaboradores (2007) é a 6633del5, em BRCA2. Apesar de ter encontrado mutações deletérias em 2,3% das pacientes não-selecionadas (9/402), este grupo também mostrou mutações deletérias nestes genes não são incomuns em pacientes com câncer de mama, inclusive podendo aparecer mutações fundadoras (1 das 5 mutações encontradas foi 5382insC, de origem *Ashkenazi*).

Nosso trabalho encontrou uma taxa de mutação bem semelhante à dos trabalhos publicados sobre a população brasileira: 9/73 pacientes com mutações deletérias, totalizando 12,3%. Dentre os trabalhos que mais se aproximam desta taxa estão Lourenço e colaboradores (2004), que, como já foi mencionado neste trabalho, encontraram em suas pacientes uma taxa de mutações de 14,9% A maior fregüência encontrada pelos autores, por ser resultado da utilização de critérios de seleção dos pacientes mais rigorosos que os nossos e a presença de pacientes de descendência Ashkenazi, já que 4/7 pacientes apresentaram a mutação fundadora 5382insC. Em 2005, Dufloth e colaboradores observaram uma prevalência de 13% de mutações nestes genes em pacientes brasileiras com histórico familiar positivo. Apesar da taxa de mutação deste estudo ser a mais semelhante a que encontramos até o momento, e dos critérios de seleção de pacientes terem sido muito semelhantes (idade de acometimento, lateralidade do tumor e número de familiares acometidos, uma vez que fazem parte dos critérios estabelecidos nos testes de Frank, Evans e BRCAPRO), somente os exons 2, 3, 5, 11 e 20 do gene BRCA1 e 10 e 11 do BRCA2 foram analisados. Amplamente

citados na literatura, em especial no caso do gene BRCA1, os grandes rearranjos gênicos foram citados por um único estudo brasileiro: ins6Kb, uma duplicação do exon 13 de BRCA1, é uma mutação fundadora encontrada em diversos países de origem britânica (The BRCA1 Exon 13 Duplication Screening Group, 2000) e que foi encontrada pelo grupo de Esteves (2009) em cinco pacientes provenientes do Rio Grande do Sul e dois do Rio de Janeiro. Apesar dos poucos trabalhos nacionais publicados, os grandes rearranjos genômicos não parecem ser tão freqüentes em nossa população.

Embora este e outros estudos citados mostrem que a mutação fundadora 5382insC em BRCA1 é realmente a mais freqüente no Brasil, isto não pode ser tomado como solução para o problema do rastreamento da síndrome do câncer de mama-ovário hereditário no Brasil, visto que várias outras mutações também se fazem presentes em nossa população. Nosso trabalho encontrou três mutações deletérias no exon 11 de BRCA2, sendo que para uma delas (6610insTT) não existem relatos na literatura; nossos achados no exon 11 estão de acordo a literatura mundial quanto ao fato deste gene, tanto em BRCA1 como em BRCA2, ser o mais comumente afetado. Estas informações nos mostram a importância de se conhecer a ancestralidade e o histórico familiar do paciente, além das características gênicas, o que pode muitas vezes encurtar o processo de rastreamento completo quando começamos os testes por estes locais.

Algumas metodologias de pré-screening podem ser empregadas para diminuir o tempo gasto e o custo da análise, porém como mostramos até o

momento, inúmeras alterações ocorrem por toda a extensão gênica e muitas delas não têm significado clínico conhecido. Alguns testes podem não ser tão sensíveis para detectá-las e com isso pode-se deixar de lado uma alteração potencialmente deletéria.

Diante destes fatos, salientamos a importância de se aprimorar o conhecimento do padrão mutacional brasileiro para os genes BRCA1 e BRCA2, a partir de um aconselhamento genético eficiente, de maior incentivo e bom uso das técnicas de análise molecular. Isto poderia facilitar a implantação deste serviço em outros institutos de saúde do país, já que atualmente este tipo de estudo se concentra nos grandes centros de pesquisa e o SUS não disponibiliza o aconselhamento e análise genética a toda população. Proporcionaríamos assim melhores condições de acompanhamento e tratamento aos portadores de mutações deletérias em BRCA1 e BRCA2 e seus familiares.

## 6. CONCLUSÕES

- A taxa de mutação de 12,3% encontrada neste estudo é bem semelhante à dos trabalhos publicados sobre a população brasileira;
- Apesar de haver poucos trabalhos nacionais publicados, os grandes rearranjos genômicos não parecem ser tão freqüentes em nossa população, visto que também não encontramos mutações deste tipo;
- A mutação fundadora 5382insC (BRCA1) foi encontrada em duas pacientes de nosso trabalho e já foi citada por outros estudos brasileiros, mostrando uma alta prevalência em nossa população. Como várias outras alterações também estão presentes em nossa população, um caminho sugerido para diminuir o tempo e o dinheiro gastos com o teste genético seria começar o rastreamento pelo exon 20 de BRCA1 e em seguida realizar a análise pelos exons mais frequentemente mutados, completando a análise de toda a extensão de ambos os genes conforme o resultado para estes exons for negativo;
- Encontramos uma grande quantidade de alterações que não possuem significado clínico conhecido. Estas alterações merecem estudos mais detalhados, com a seleção de variantes de acordo com sua freqüência entre os indivíduos com câncer em uma mesma família, a comparação com indivíduos saudáveis (grupo controle) e estudos in silico e in vitro devem ser realizados para caracterizar cada uma destas alterações como mutações

patogênicas e polimorfismos freqüentes ou raros que causem algum ou nenhum efeito na função das proteínas;

Podemos dizer que, para a nossa coorte, a melhor escolha quanto aos testes para avaliação do risco dos indivíduos estudados serem portadores de mutação nos genes BRCA1 e BRCA2 é realmente a combinação dos métodos de Frank, Evans e BRCAPRO. Este conceito pode se aplicar à realidade da população brasileira, visto que nossa coorte é composta de uma população miscigenada.

Salientamos, portanto, a importância de ampliar este estudo e de estimular pesquisas futuras, visando um aconselhamento genético eficiente, com a diminuição do número de casos inconclusivos gerados pelas variantes de significado indeterminado e o acompanhamento clínico das famílias.

## 7. REFERÊNCIAS

Antoniou, A. et al. Average risks of breast and ovarian associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. American Journal of Human Genetics. 2003;72(5):1117-1130.

Antoniou, A. et al. Common breast cancer susceptibility alleles and the risk of breast cancer for BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: implications for risk prediction. Cancer Research. 2010;70(23):9742-9754.

Ashworth, A. A. A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair. Journal of Clinical Oncology. 2008;26(22):3785-3790.

Audeh, M. W. et al. Oral poly9ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 and BRCA2 mutations and recurrent ovarian cancer: a proof-of-concept trial. Lancet. 2010;376(9737):245-251.

Ayoub, N. et al. The carboxyl terminus of BRCA2 links the disassembly of Rad51 complexes to mitotic entry. Current Biology. 2009;19:1075-1085.

Begg, C. B. et al. Variation on breast cancer risk among BRCa1/2 carriers. Journal of Clinical Oncology. 2008; 299(2):194-201.

Bellosillo, B.; Tusquets, I. Pitfalls and caveats in BRCA sequencing. Ultrastructural Pathology. 2006;30:229-235.

Berry, D. A. et al. BRCAPRO validation, sensitivity of genetic testing of BRCA1/BRCA2, and prevalence of other breast cancer susceptibility genes. Journal of Clinical Oncology. 2002;20:2701-2720.

Bignell, G. et al. The BRC repeats are conserved in mammalian BRCA2 proteins. Human Molecullar Genetics. 1997;6(1):53-58.

Blackshear, P. E. et al. Brca1 and Brca2 expression patterns in mitotic and meiotic cells of mice. Oncogene, 1998;16:61-68.

Bochar, D. et al. BRCA1 is associated with a human SWI/SNF- related complex: linking chromatin remodeling to breast cancer. Cell. 2000;102:257-265.

BIC. Breast Cancer Information Core. Disponível em: <a href="http://research.nhgri.nih.gov/bic">http://research.nhgri.nih.gov/bic</a>. Acesso: 12/02/2011.

Bordeleau, L. et al. Prognosis of BRCA-associated breast cancer: a summary of evidence. Breast Cancer Research and Treatment. 2010; 119(1):13-24.

Brohet, R. M. et al. Oral contraceptives and breast cancer risk In the international BRCA1/2 carrier cohort study: a report from EMBRACE, GENEPSO, GEO-HEBON and the IBCCS Collaborative Group. Journal of Clinical Oncology. 2007;25(25):3831-3836.

Bryant, H. E. et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumors with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. Nature. 2005;434(7035):913-917.

Buller, R. E. et al. Association Between Nonrandom X-Chromosome Inactivation and BRCA1 Mutation in Germline DNA of Patients With Ovarian Cancer. Journal of the National Cancer Institute. 1999;91:339-346.

Casilli, F. et al. The contribution of germline rearrangements to the spectrum of BRCA2 mutations. Journal of Medical Genetics. 2006; 43(9):e.49.

Chen, S.; Parmigiani, G. Meta-analysis of BRCA1 and BRCA2 penetrance. Journal of Clinical Oncology. 2007;25(11):1329-1333.

Couch, F. J. et al. BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. New England Journal of Medicine. May 1997;336(20):1409-1415.

D'Andrea, A. D. et al Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. Science. 2007;297:606-609.

Da Costa, E. C. B. et al. Founder effect of the BRCA1 5382insC mutation in Brazilian patients with hereditary breast and ovarian cancer syndrome. Cancer Genetics and Cytogenetics. 2008;184:62-66.

Daniels, M. J. et al. Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. Science. 2004;306:876-879.

Deng, C. X., Brodie, S. G. Roles of BRCA1 and its interacting proteins. Bioessays. 2000;22(8):728-737.

Domchek, S. M. et al. Association of risk-reducing surgery, in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers with cancer risk and mortality. JAMA. 2010;304(9):967-975.

Dufloth, R. M. et al. Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. Revista Paulista de Medicina. 2005;123:192-197.

Eisen, A. et al. Breast cancer risk following bilateral ooforectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case-control study. Journal of Clinical Oncology. 2005;23(30):7491-7496.

Entrez Gene. Disponível: <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene</a>. Acesso: 28/01/2011.

Evans, D. G. et al. A new scoring system for the chances of identifying a BRCA1/2 mutation outperforms existing models including BRCAPRO. Journal of Medical Genetics. 2004;41:474-480.

Fackenthal, J. D. & Olopade, O. I. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. Nature Reviews. 2007;7:937-948.

Fasano, J.; Muggia, F. Breast cancer arising in a BRCA-mutated background: therapeutic implications from an animal model and drug development. Annals of Oncology. April 2009;20(4):609-614.

Ferla, R. et al. Founder mutations in BRCA1 and BRCA2 genes. Annals of Oncology. 2007;18:93-98.

Fisher, B. et al. Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. Journal of the National Cancer Institute. 2005;97(22):652-662.

Fong, P. C. et al. Inhibitor of poly9ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. New England Journal of Medicine. 2009;361(2):123-134.

Ford, D. et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. American Journal of Human Genetics. 1998;62:676-689.

Foulds, L. The experimental study of tumor progression. Volumes I-III (London: Academy Press), 1954.

Frank, T. S. et al. Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. Journal of Clinical Oncology. 2002;20:1480-1490.

Friedman, L. S. et al. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. Nature Genetics. 1994;8:399-44.

Friedman, L. S. et al. Novel inherited mutations and variable expressivity of BRCA1 alleles, including the founder mutation 185delAG in Ashkenazi Jewish families. American Journal of Human Genetics. 1995;57:1284-1297.

Gaildrat, P. The BRCA1 c.5434C/G (p.Pro1812Ala) variant induces a deleterious exon 23 skipping by affecting exonic splicing regulatory elements. Journal of Medical Genetics. 2010;47:398-430.

Ganesan, S. et al. BRCA1 supports XIST RNA concentration on the inactive X chromosome. Cell. 2002;111(3):393-405.

Gayther, S. A. et al. Germline mutations of the BRCA1 gene in breast and ovarian cancer families provide evidences for a genotype-phenotype correlation. Nature Genetics. 1995;11(4):428-433.

Gayther, S. A. et al. Variation of risks of breast and ovarian cancer associated with different germline mutations of the BRCA2 gene. Nature Genetics. 1997;15(1):103-105.

Greenblast, M. S. ET AL. TP53 mutations in breast cancer associated with BRCA1 or BRCA2 germline mutations: distinctive spectrum and structural distribution. Cancer Research. 2001;61:4092-4097.

Gretarsdottir, S. et al. BRCA2 and p53 mutations in primary breast cancer in relation to genetic instability. Cancer Research. 1998;58:859-862.

Gomes, M. C. B. et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil. Breast Cancer Research Treatment. 2007;103:349-353.

Hadjisavvas, A. et al. Q356R and S1512I are BRCA1 variants that may be associated with breast cancer in a Cypriot family. Oncology Reports. 2002;9:383-386.

Hall, J. M. et al. Linkage analysis of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. Science. 1990;250:1684-1689.

Harris, J. R.; Lippman, M. E.; Morrow, M. Diseases of the breast. Philadelphia: Lippincott Williamns & Wilkins, 2004.

Hatman, A. R., Ford, J. M. BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. Nature Genetics. 2002;32:180-184.

Hartmann, L. C. et al. Efficacy of bilateral profilatic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers. Journal of the National Cancer Institute. 2001;93(21):1633-1637.

Hogervorst, F. B. et al. Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. Cancer Research. 2003;63(7):1449-1453.

Ikeda, N. et al. Frequency of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Japanese breast cancer families. International Journal of Cancer. 2001;91:83-88.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Disponível: <a href="http://www.inca.gov.br">http://www.inca.gov.br</a>. Acesso: 27/01/2011.

Johansson, O. et al Incidence of malignant tumours in relatives of BRCA1 and BRCA2 germline mutation carriers. European Journal of Cancer. August 1999;35(8):1248-1257.

Jonkers, J. et al. Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. Nature Genetics. 2001;29:418-425.

Kaas, R. et al. Profilatic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: very low risk for subsequent breast cancer. Annals of Surgery. 2010;251(3):488-492.

Kauff, N. D. et al. Risk-reducing salpingo-ooforectomy for the prevention of BRCA1- and BRCA2-associated breast and gynecologic cancer: a multicenter prospective study. Journal of Clinical Oncology. 2008;26(8):1331-1337.

Kiechle, M. et al. A highly sensitive, fast, and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancers. Human Mutation. 1999;14:333-339.

Koifman, R. J.; Koifman, S.; Vieira, R. J. da S. Familial aggregation of breast/ovarian cancer: age of onset along subsequent generations in Brazil. Caderno de Saúde Pública. 1998;14(3):181-185.

Kojic, M. et al. The BRCA2-interacting protein DSS1 is vital for DNA repair, recombination, and genome stability in Ustilago maydis. Molecullar Cell. 2003;12(4):1043-1049.

Kramer, J. L. et al. Profilatic ooforectomy reduces breast cancer penetrance during prospective, long-term follow-up of BRCA1 mutation carriers. Journal of Clinical Oncology. 2005;23(34):8629-8635.

Kuhl, C. et al. Prospective multicenter study to refine management recommendations for women at elevated familial risk of breast cancer: the EVA trial. Journal of Clinical Oncology. 2010;28(9):450-457.

Kuska, B. et al. Researchers expand genetic epidemiology of BRCA genes. Journal of the National Cancer Institute. 1997;89:844-845. Ladopoulou, A. et al. Germ line BRCA1 & BRCA2 mutations in Greek breast/ovarian cancer families: 5382insC is the most frequent mutation observed. Cancer Letters. 2002;185:61-70.

Lakhani, S. R. et al. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancer involving BRCA1 and BRCA2 mutations. Journal of the National Cancer Institute. 1998;90:1138-1145.

Le Page, F. et al. BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. Cancer Research. 2000;60:5548-5552.

Leach, M. O. et al. Screening with magnetic resonance imaging and mammography of a UK population at high familial risk of breast cancer: a prospective multicentre cohort study (MARIBS). Lancet. 2005;365(9473):427-437.

Loader, S; Levenkron, J. C.; Rowley, P. T. Genetic testing for breast-ovarian cancer susceptibility: a regional trial. Genetic Testing. 199;2(4):305-313.

Loescher, L. J. Genetics and ethics. Cancer Nursing. 1999;22:96-102.

Lourenço, J. J. et al. BRCA1 mutations in Brazilian patients. Genetic and Molecular Biology. 2004;27:500-504.

Madalinska, J. B. et al. The impact of hormone replacement therapy on menopausal symptoms in young high-risk women after profilatic salpingo-oforectomy. Journal of Clinical Oncology 2006;24(22):3576-3582.

Meijers-Heijboer, H. et al Breast cancer after profilatic bilateral mastectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. New England Journal of Medicine. 2001;345(3):159-164.

Meindl, A. et al. MLPA screening in the BRCA1 gene from 1,506 German hereditary breast cancer cases: novel deletions, frequent involvement of exon 17, and occurrence in single early-onset cases. Human Mutation. July 2008;29(7):948-958.

Miki, Y. et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. Science. 1994;266:66-71.

Milner, J. B. et al. Transcriptional activation functions in BRCA2. Nature. 1997;386: 772-773.

Montagna, M. et al. Genomic rearrangements accont for more than one-third BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. Human Molecular Genetics. 2003;12(9):1055-1061.

Monteiro, A. N. A. et al. Evidence for a transcriptional activation function of BRCA1 C-terminal region. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1996;93: 13595-13599.

MRC-HOLLAND. Disponível: http://www.mlpa.com/. Acesso: 04/02/2011.

Narod, S. A. et al. Oral contraceptives and the risk of breast cancer I BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Journal of the National cancer Institute. 2002;94(23):1773-1779.

Narod, S. A. & Foulkes, W. D. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. Nature Reviews. 2004;4:665-676.

NCCN clinical practice guidelines in oncology – genetic/familial high risk assessment: breast and ovarian. 2009. Disponível em: http://www.nccn.org/. Acesso: 21/02/2011.

Neuhausen, S. et al. Recurrent BRCA2 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish women affected by breast cancer. Nature Genetics. 1996;13:126-128.

Niell, B. L. et al. BRCA1 and BRCA2 founder mutations and the risk of colorectal cancer. Journal of the National Cancer Institute. January 2004;96(1):15-21.

Niwa, T. et al. BRCA2 interacts with the cytoskeletal linker protein plectin to form a complex controlling centrosome localization. Cancer Science. 2009;100(11):2115-2125.

Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. Science. 1976;194:23-28.

Oefner, P. Et al. Global sequence diversity of BRCA2: analysis of 71 breast cancer families and 95 control individuals of worldwide populations. Human Molecular Genetics. 1999;8(3):413-423.

Palmero, E. I. et al. Clinical characterization and risk profile of individuals seeking genetic counseling for hereditary breast cancer in Brazil. Journal of Genetic Counseling. 2007;16(3):363-371.

Parker, W. H. et al. Ovarian conservation at the time of hysterectomy and long-term health outcomes in the nurses' heath study. Obstetrics and Gynecology. 2009;13(5):1027-1037.

Parmigiani, G. et al. Determining carrier probabilities for breast cancersusceptibility genes BRCA1 and BRCA2. The American Journal of Human Genetics. 1998;62:145-158.

Perou, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumors. Nature. 2000;406:747-752.

Peto, J. et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. Journal of the National Cancer Institute. 1999;91:943-949.

Petrij-Bosch, A. et al. BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. Nature Genetics. 1997;17:341-345.

Rajagopalan, S. et al. Mapping the physical and functional interactions between the tumor suppressors p53 and BRCA2. PNAS. 2010;107(19):8587-8592.

Rebbeck, T. R. et al. Meta-analysis of risk redution estimates associated with risk-reducing salpingo-ooforectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. Journal of the National Cancer Institute. 2009;101(2):80-87.

Renan, M. J. et al. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications for human cancer data. Molecular Carcinogenesis. 1993;7:139-146.

Rijnsburger, A. J. et al. BRCA1-associated breast cancers present differently from BRCA2-associated and familial cases: long-term follow-up of the Dutch MRISC Screening study. Journal of Clinical Oncology. 2010;28(36):5265-5273.

Roa, B. B. et al. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. Nature Genetics. 1996;14:185-187.

Rocca, W. A. et al. Survival patterns after ooforectomy in premenopausal women: a population-based cohort study. Lancet Oncology. 2006;7(10):821-828.

Sagi, M. et al. Two BRCA1/2 founder mutations in Jews of Sephardic origin. Familial Cancer. 2010;10(1):59-63.

Salzano, F. M. Human races: myth, invention or reality? Interciencia. 1997;22:221-227.

Sarantaus, L. et al. Multiple founder effects and geographical clustering of BRCA1 and BRCA2 families in Finland. European Journal of Human Genetics. 2000;8:757-763.

Scully, R. et al. Association of BRCA1 with RAD51in mitotic and meiotic cells. Cell. 1997a;88:265-275.

Scully R. et al. BRCA1 is a component of the RNA polymerase II holoenzyme. PNAS. 1997b;94(11):5605-5610.

Sharan, S. K. et al. Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. Nature. 1997;386:804-810.

Simard, J. et al. Common origins of BRCA1 mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. Nature Genetics. 1994;8:392-398.

Smith, P. D. et al. Novel p53 mutants selected in BRCA-associated tumors which dissociate transformation suppression from other wild-type p53 functions. Oncogene. 1999;18:2451-2459.

Sobol, H. et al. Truncation at conserved terminal regions of BRCA1 protein is associated with highly proliferating hereditary breast cancers. Cancer Research. July 1996;16:312-319.

Sobol, H. et al. Accessing the risk of BRCA1-associated breast cancer using individual morphologic criteria. Histopathology. 2001;38:378-379.

Sorlie, T. et al. Reported Observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2003;100(14):8418-8423.

Spain, B. H. et al. Truncated BRCA2 is cytoplasmic: implications for cancer-linked mutations. PNAS. 1999;96(24):13920-13925.

Spurdle, A. B. et al. CYP17 promoter polymorphism and breast cancer in Australian women under age forty years. Journal of the National Cancer Institute. 2000;92:1674-1681.

Struewing, J. P. et al. The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. Nature Genetics. 1995;11:198-200.

Struewing, J. P. et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. New England Journal of Medicine. 1997;336:1401-1408.

Szabo, C. I.; King, M. C. Inherited breast and ovarian cancer. Human Molecular Genetics. 1995;4:1811-1817.

Tavtigian, S. V. et al. The complete BRCA2gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. Nature Genetics. 1996;12:333-337.

The BRCA1 Exon 13 Duplication Screening Group. The Exon 13 Duplication in the BRCA1 Gene Is a Founder Mutation Present in Geographically Diverse Populations. American journal of human Genetics. 2000; 67:207–212.

Thorlacius, S. et al. A single BRCA2 mutation in male and female breast cancer families from Iceland with varied cancer phenotypes. Nature Genetics. 1996;13:117-119.

Tsai, C. J. et al. Synonymous mutations and ribosome stalling can lead to altered folding pathways and distinct minima. Journal of Molecular Biology. November 2008;383(2):281-291.

Tung, N. et al. Estrogen receptor positive breast cancers in BRCA1 mutation carriers: clinical risk factors and pathologic features. Breast Cancer Research. 2010;12(1):R12.

Turner, N.; Tutt, A.; Ashworth A. Hallmarks of BRCAness in sporadic cancers. Nature Reviews, Cancer. 2004;4(10):814-819.

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. 2010;376(9737):235-244.

Unger, M. A. et al. Screening for genomic rearrangements in families with breast and ovarian cancer identifies BRCA1 mutations previously missed by conformation-sensitive gel electrophoresis or sequencing. American Journal of Human Genetics. 2000;67:841-850.

Van der Velde, N. M. et al. Time to stop ovarian câncer screening in BRCA1/2 mutation carriers? International Journal of Cancer. 2009;124(4):919-923.

Vega, A. et al. The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. Human Mutation. 2001;419:1-6.

Venkitaraman, A. R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. Cell. 2002;108:171-182.

Vogel, V. G. et al. Effects of tamoxifen vs. raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes: the NSABP study of tamoxifen and raloxifene (STAR) P-2 trial. JAMA. 2006;295(23):2727-2741.

Walsh, T. et al. Spectrum of mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in families at high risk of breast cancer. JAMA. 2006;295:1379-1388.

Wang, S. C. et al. Changes in BRCA2 Expression during Progression of the Cell Cycle. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1997;234:247-251.

Wang, Y. et al. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. Genes & Development. 2000; 14:927-939.

Whittemore, A. S. et al. Oral contraceptive use and the risk among carriers of BRCA1 and BRCA2 mutations. Breast Journal Cancer. 2004;91(11):1911-1915.

Williams, R. S. et al. Structural basis of phosphopeptide recognition by the BRCT domain of BRCA1. Nature Structural & Molecular Biology. 2004;11(6):519-525.

WHO. World Health Organization. Disponível: <a href="http://www.who.int">http://www.who.int</a>. Acesso: 17/12/2010.

Wong A. K. et al. Rad51 interacts with the evolutionarily conserved BRC motifs in the human breast cancer susceptibility gene BRCA2. The Journal of Biological Chemistry. 1997;272:31491-31494.

Wooster, R. et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene (BRCA2) on chromosome 13q by genetic linkage analysis. Science. 1994;265:2088-2090.

Wooster, R. et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. Nature. 1995;378:789-792.

Wu, L. C. et al. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. Nature Genetics. 1996;14:430-440.

Xu, X. et al. Centrosome amplification and a defective G2-M cell-cucle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. Molecullar Cell. 1999;3:389-395.

Yarden, R. I. et al. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. Nature Genetics. 2002;30(3):285-289.

Anexos

## 8. ANEXOS

Anexo 1: Termo de consentimento pós informação aplicado aos pacientes.

### HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

## TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS -INFORMAÇÃO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE ID	ENTIFIC		UJEITO EGAL	DA PESQUISA OU	RESPONS	SÁVEL
1 NOME DO PAC	IENTE -					
DOCUMENTO D	E IDENT	IDADE Nº :		SEX	(O: .Mé	Fé
ENDEREÇO				Nº	APTO	):
BAIRRO:				CIDADE		
CEP:		TELEFO	NE: DE	CIDADE		
NATUREZA (gra	u de pare	ntesco tutor	curado	retc.)		*********
DOCUMENTO D	E IDENT	IDADE :	,	r etc.)	ė Fė	
DATA NASCIME	NTO:	1 1				
ENDERECO:	*********		N°	APTO:		
BAIRRO		CIDADE				
CEP:	TELE	FONE: DDD	(	.)		
	TOCOLO câncer ncer de r	DE PESQU hereditário nama.	ISA : In na q	npacto do encamin ualidade de vida		
CARGO/FUNÇÃ	O: Médica	3				
	ologia do	Hospital d		ogia, Serviço de On- nicas da Faculdade		
3. AVALIAÇÃO D	ORISCO	DA PESQUIS	SA:			
SEM RISCO é	RISC	OMINIMO	X	RISCO MÉDIO	é	
RISCO BAIXO	é	RISCO MAI	IOR	ė		
(probabilidade d tardia do estudo)	le que o i	ndividuo sofr	a algum	dano como consequ	iencia ime	diata o
4.DURAÇÃO DA I	PESQUIS	A : dois anos	ę			

## III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

justificativa e os objetivos da pesquisa;
 procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais;
 desconfortos e riscos esperados;
 beneficios que poderão ser obtidos;
 procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o individuo.

### CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO PARA PESQUISA CLÍNICA

#### Informações gerais

A senhora está com câncer na mama. Estima-se que aproximadamente 10% das pacientes com câncer de mama sejam portadoras de alguma síndrome genética de predisposição ao câncer e que um terço tenham pelo menos um parente de primeiro grau com a doença. Dúvidas com relação a esses fator podem ser mais um fator de ansiedade durante o seu acompanhamento com conseqüente piora da qualidade de vida. Consideramos que o esclarecimento de se há um potencial hereditário das pacientes portadoras de câncer de mama pode melhorar sua qualidade de vida e inclusive possibilitar a indicação de testes genéticos em pacientes com alto risco de serem portadoras de mutações, se concordarem com o teste. Pretendemos aplicar um questionário de qualidade de vida antes da consulta no ambulatório de câncer hereditário, após a determinação do risco de ser portadora de uma mutação que predisponha ao câncer e, para aquelas pacientes que realizarem o teste genético, após o resultado desse teste.

A senhora está sendo convidada a participar desta pesquisa. Para decidir se deseja participar ou não, leia atentamente as explicações abaixo.

Este formulário de consentimento contém informações sobre a pesquisa em estudo e será discutido com o seu médico. Uma vez compreendido o estudo, e havendo interesse da senhora em participar do mesmo, será solicitada a sua assinatura no consentimento pós-informado. A senhora também receberá uma cópia para guardar em casa. Se achar necessário, consulte outros profissionais (médicos ou não) antes de assinar este documento.

A pesquisa proposta é a seguinte: "Impacto do encaminhamento para ambulatório de câncer hereditário na qualidade de vida de pacientes portadoras de câncer de mama".

## Plano de estudo

O seu tratamento para o câncer de mama não será influenciado ou modificado pela participação nesta pesquisa e seguirá a padronização de condutas existente no serviço na ocasião de sua consulta. A senhora será convidada a ser atendida no ambulatório de câncer hereditário onde, a partir de dados de sua história pessoal e familiar de câncer, será determinado o risco de ser portadora de alguma mutação que proporcione um maior risco para o desenvolvimento de câncer de mama. Caso a chance de ser portadora dessa mutação seja igual ou superior a 20%, a senhora será convidada a realizar a pesquisa dessa mutação.

Para determinarmos o impacto desses fatos em sua qualidade de vida, a senhora será convidada a responder dois questionários sobre a qualidade de vida em pacientes portadoras de câncer de mama, o QLQ-C30 e o QLQ BR-23. Esses questionários são aceitos em todo mundo e foram desenvolvidos por uma organização européia que estuda câncer e traduzidos para o português por nossa equipe. Os questionários serão respondidos antes da primeira consulta no ambulatório de câncer hereditário, após a determinação da chance de ser portadora de uma mutação e, nas pacientes em que for indicado o teste genético, após o resultado do teste.

## Beneficios

Muito embora seja esperado que este tipo de pesquisa beneficie as pacientes que estão participando do estudo, não se pode dizer com certeza que a senhora se beneficiará.

#### Custo Financeiro

O procedimento envolvido neste projeto, que é a aplicação de questionários não implicará em ônus adicional para a instituição ou para o paciente.

#### Privacidade

Tratando-se de um estudo investigacional, sua identidade será mantida em segredo. Seu nome não será utilizado em qualquer publicação sobre o estudo. No entanto, a senhora ou o seu representante legal poderá inspecionar os seus registros médico-hospitalares.

#### Direito de recusar e de se retirar do estudo

A escolha de participar ou não do estudo é inteiramente de sua responsabilidade. Seu médico deve ter explicado que além do tratamento proposto nesta pesquisa, existem outras formas terapêuticas para a sua doença.

Caso a senhora se recuse a participar deste estudo, outro tratamento será oferecido, sem nenhum tipo de prejuízo ou represália. O mesmo ocorrendo caso a senhora venha a se retirar do projeto, independente do motivo.

O comitê de ética e pesquisa (CEP) deste hospital é o responsável legal para assegurar que os direitos dos pacientes sejam protegidos, tendo aprovado previamente esta pesquisa.

Em caso de dúvida, consulte o investigador principal ou a secretaria do CEP.

# IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

- acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e beneficios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
- liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
- salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
- disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
- viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Dra. Miriam Hatsue Honda Federico, tel 3069-6721 ou 3069-7225

Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 255, 3º andar, sala 7.21

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:						
VII - CONSEN	TIMENTO PÓS	ESCLARECI	00			
Doclaro que a	pós convenient	emente escla	recido pelo pesquisador e ter entendido o			
	licado, consinto	em participar	do presente Protocolo de Pesquisa			

**Anexo 2:** Tabela com o modelo proposto por Frank para calcular a prevalência de mutações em BRCA1 e BRCA2.

	História Familiar					
Probando	Nenhum CA de mama < 50 anos de idade ou CA de ovário em qualquer idade	CA de mama < 50 anos de idade em um parente, nenhum CA de ovário	CA de mama < 50 anos de idade em mais de um parente, nenhum CA de ovário	CA de ovário em um parente, nenhum CA de mama < 50 anos de idade	CA de ovário em mais de um parente, nenhum CA mama < 50 anos de idade	CA de mama < 50 anos de idade e CA de ovário em qualquer idade
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
Nenhum CA de mama ou ovário em qualquer	2.0 (0/220)	4.4./40/424\	11 (46(410)	2.0 (6/452)	9.5 (10/117)	16 4 (50/254)
idade	3,9 (9/229)	4,4 (19/434)	11 (46/419)	3,9 (6/153)	8,5 (10/117)	16,4 (58/354)
CA de mama ≥ 50 anos de idade	2,3 (4/172)	11,2 (22/197)	10,2 (12/118)	4,3 (3/69)	5,6 (1/18)	21,8 (19/87)
CA de mama < 50	THE PRODUCT OF THE					San to the second
anos de idade	9,5 (55/579)	18,4 (89/484)	36,3 (117/322)	17,5 (34/194)	16,7 (7/42)	47,2 (126/267)
CA de ovário em qualquer idade, nenhum CA de mama	6,5 (5/77)	34,1 (14/41)	42,3 (11/26)	27,7 (23/83)	42,9 (12/28)	53,5 (38/71)
CA de mama ≥ 50 anos de idade e CA de ovário em						
qualquer idade	18,5 (5/27)	11 (1/9)	36,4 (4/11)	17 (1/6)	33 (1/3)	50 (3/6)
CA de mama <50 anos de idade e CA de ovário em						
qualquer idade	20 (5/25)	50 (4/5)	80 (4/5)	56 (5/9)	100 (2/2)	72.2 (13/18)

**Anexo 3:** Tabela com o modelo proposto por Evans para calcular a prevalência de mutações em BRCA1 e BRCA2.

Câncer, idade ao	BRCA1	BRCA2	
diagnostico			
CA mama feminino, < 30	6	5	
CA mama feminino, 30-39	4	4	
CA mama feminino, 40-49	3	3	
CA mama feminino, 50-59	2	2	
CA mama feminino, > 59	1	1	
CA mama masculino, < 60	5 (se BRCA2 já testado)	8	
CA mama masculino, > 59	5 (se BRCA2 já testado)	5	
CA ovário, < 60	8	5 (se BRCA1 já testado)	
CA ovário, > 59	5	5 (se BRCA1 já testado)	
CA pâncreas	0	1	
CA próstata, < 60	0	2	
CA próstata, > 59	0	1	

Anexo 4: Aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital.

HASPITAL DES RELACES RASPITAL DES RELACES RASPITAL DE RESERVA PROTOCOLO
Local: Ped - gnaduciaco Central
Recebido porta 177.
Data: 08/110/108

# **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 24/09/2008, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 0358/08, intitulado: "DETERMINAÇÃO DE MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS NOS GENES BRCA1 E BRCA2 EM PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA COM INDICAÇÃO PARA TESTE GENÉTICO." apresentado pelo Departamento de RADIOLOGIA E RADIOTERAPIA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Profa. Dra. Miriam Hatsue Honda Federico** Pesquisador (a) Executante: **Karina Augusto Escobar** 

CAPPesq, 25 de Setembro de 2008

Prof. Dr. Roger Chammas Coordenador da Pós-Graduação Área de Oncologia FMUSP

Prof. Dr. Eduardo Massad Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

G. \_\_\_\_\_

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo -- SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br