DANIELLE RENZONI DA CUNHA

**ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE BRCA
NA POPULAÇÃO *ASHKENAZI* E
NÃO *ASHKENAZI* COM HISTÓRICO
PARA CÂNCER DE MAMA E/OU OVÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

**São Paulo
2011**

DANIELLE RENZONI DA CUNHA

**ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE BRCA NA POPULAÇÃO
ASHKENAZI E NÃO ASHKENAZI COM HISTÓRICO PARA
CÂNCER DE MAMA E/OU OVÁRIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prf^a Dr^a Itamar Romano Garcia
Ruiz

Versao Original

**São Paulo
2011**

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Cunha, Danielle Renzoni da.

Estudo de mutações nos genes BRCA na população *Ashkenazi* e não *Ashkenazi* com histórico para câncer de mama e/ou ovário / Danielle Renzoni da Cunha. -- São Paulo, 2011.

Orientadora: Profa. Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Biologia molecular/genética.

Versão do título para o inglês: Study of mutations in the BRCA genes in *Ashkenazi* and non-*Ashkenazi* jewish population with familial breast and/or ovarian cancer.

Descritores: 1. Genes BRCA 2. Mutação 3. Mama 4. Câncer 5. Judeus *Ashkenazi* I. Ruiz, Profa. Dra. Itamar Romano Garcia II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB022/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Danielle Renzoni da Cunha.

Título da Tese: Estudo de mutações nos genes BRCA na população *Ashkenazi* e não *Ashkenazi* com histórico para câncer de mama e/ou ovário.

Orientador(a): Profa. Dra. Itamar Romano Garcia Ruiz.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

São Paulo, 02 de Março de 2009

Ref. CEP/Einstein Nº 09/1036

CAAE – 0013.0.028.000-09

Título: ESTUDO DO GENE BRCA ATRAVÉS DO SCREENING GENÉTICO NA POPULAÇÃO ASHKENAZI E NÃO-ASHKENAZI COM CÂNCER DE MAMA EOU OVÁRIO HEREDITÁRIOS

Investigador Principal: Danielle Renzoni da Cunha

Ilma. Sra.

Danielle Renzoni da Cunha

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein **analisou e aprovou** o projeto de pesquisa supracitado, bem como a isenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para do projeto de pesquisa supracitado.

Aproveitamos a oportunidade para orientar o pesquisador sobre os seguintes itens:

- O Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III. 3z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V. 3) que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

ALBERT EINSTEIN INSTITUTO ISRAELITA DE ENSINO E PESQUISA

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97. item III.2.e).

Investigador Principal do Projeto

- De acordo com a carta Circular nº 037 CONEP/CNS/MS os projetos de pesquisa na área de Genética Humana, consoantes com a Resolução CNS nº 340, são avaliados pelo CEP Institucional sendo enviado à CONEP somente os casos explicitados no item VI.3 da Resolução citada.

- Relatórios parciais e finais devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em Setembro de 2009.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Pinus

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
do Hospital Israelita Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Agradeço à Deus, e a nosso senhor Jesus Cristo por mais esta oportunidade de aprendizado e ensinamento

Aos meus pais, Tamara Renzoní da Cunha e José Luiz da Cunha, amorosos e sempre presentes, não posso retribuir os infindáveis momentos de encorajamento, força e proteção ao longo da minha vida, vocês são fundamentais para mais esta conquista.

Ao meu irmão Fabrício Renzoní da Cunha, companheiro, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

À tia Mocinha, minha madrinha, e à tia Elizabeth Cunha pela força em todos os momentos, especialmente os mais difíceis, e se os superamos é porque tínhamos vocês sempre ao lado

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Itamar Romano Garcia Ruiz, que de braços abertos me acolheu em um momento difícil da pós-graduação em que me encontrava, mostrou-se paciente, transmitindo sempre tranquilidade e confiança. Obrigada pelos seus ensinamentos, não só científicos, como também os de fé e equilíbrio para a vida.

Ao meu querido amigo, Dr Cristofer André Caous, obrigada por me auxiliar durante esta jornada. Conselheiro, amigo, ouvinte de todas as horas, não poderei retribuir toda a atenção, força e carinho por mim dispensados todos estes anos.

Ao estimado Dr Sérgio Daniel Simon, pela disponibilização dos resultados dos indivíduos para uso neste estudo, sempre solícito e atencioso, colaborou sempre que necessário para que eu pudesse concluir o trabalho.

À querida Prof^a Dr^a Sônia Maria Oliveira de Barros, por ter me ajudado a estruturar e adequar este estudo de acordo com as resoluções do Conselho Nacional de Saúde e pela sua simpatia e amabilidade para com a minha pessoa.

À querida Elivane da Silva Victor, por ter feito as análises estatísticas deste estudo, e principalmente por ter sido tão atenciosa e prestativa em todos os momentos.

À estimada colega Michele da Silva Diniz, pela disponibilidade em coletar os dados dos indivíduos participantes deste estudo e organizá-los de forma a facilitar imensamente o manuseio dos resultados, mostrando-se sempre solícita e disposta a ajudar.

Aos queridos amigos: Célia Amaral, Marcia Lucila Rodriguez, Andrea Quintella de Andrade Seixas, Rosana Maria Alves, Dr^a Tatiana Sibov, Dr^a Lorena Pavon, Daiane Donnà Guillen, Dr Fabio Picolli, Fernanda Calvo, Luciane kagohara, Dr^a Patrícia Locosque, Sara Hamagushi, Viviani Neves entre tantos outros amigos, que em

diversos âmbitos da minha vida a preecheram com palavras de carinho, apoio, amizade, alegria, sempre acompanhadas de risadas e bom humor.

Às amigas Dr^a Patrícia Maria de Carvalho Aguiar, Dr^a Luciana Marti, Dr^a Patrícia Severino pelo companheirismo, trocas de idéias e conselhos.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa Experimental: Daniella Zanetti Bucci, Dr^a Carla Azevedo Piccinato, Renata Machado Soares, Flavia Maziero, Ana Moulatlet, Vanessa Pazzini, Fernanda Paladino, Fabio Felipe dos Santos e Dr^a Jaila Borges, Marta Jardim Diniz e andrea Vieira de Souza.

Aos estimados: Prof Dr Luiz Vicente Rizzo e Coordenação do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein, que permitiram que eu continuasse meu estudo de doutorado.

À Dr^a Fernanda Teresa de Lima pela paciência, principalmente no final desta jornada.

À estimada Soely Moura Silva pelos ensinamentos na estruturação dos documentos do projeto de pesquisa e pelo apoio solícito sempre que precisei.

À todos que de alguma forma ajudaram neste estudo e tornaram a minha vida um pouco melhor.

Obrigada!

*Para bem conhecer uma coisa
é preciso tudo ver,
tudo aprofundar,
comparar todas as opiniões,
ouvir os prós e os contras.*

Allan Kardec

(Revista Espírita, setembro de 1886).

RESUMO

Cunha DR. Estudo de mutações nos genes BRCA na população *Ashkenazi* e não *Ashkenazi* com histórico para câncer de mama e/ou ovário. [Tese (Doutorado em Biotecnologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

O câncer de mama é um dos mais incidentes no mundo e mais comum na população feminina. Algumas populações possuem maior risco para o câncer de mama e ovário devido a presença de mutações fundadoras nos genes *BRCA1* e *BRCA2* como ocorre nos Judeus *Ashkenazi* (JA). Os testes genéticos para detecção de mutações de ponto nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foram realizados em 106 indivíduos com e sem origem judaica (IOA) através do rastreamento por *dHPLC* e sequenciamento. A distribuição das mutações fundadoras no gene *BRCA1* foi de cerca de 55% para *185delAG* e *5382insC* no gene *BRCA1* e 12% para *6174delT* no gene *BRCA2*. Estas mutações também foram detectadas em 7,4% dos casos no grupo IOA e 84,2% no grupo JA ($p < 0,001$). Mutações fundadoras espanholas e portuguesas, 330 A>G (11,11%) e 7966C>T (7,4%), foram detectadas no IOA. Os carcinomas de mama e ovário foram mais frequentes nos dois grupos, cerca de 70% e 20%, respectivamente. No grupo IOA foram diagnosticados carcinomas de mama masculino (9,5%) e trompa uterina (2,9%), e carcinoma endometrióide em 11,8% no grupo JA.

Palavras-chave: *BRCA1*. *BRCA2*. Câncer. Mama. Mutação. Fundadoras. Judeus *Ashkenazi*.

ABSTRACT

Cunha DR. Study in the BRCA genes in *Ashkenazi* and non- *Ashkenazi* jewish population with familial breast cancer and/or ovarian cancer. [Ph. D. Thesis (Biotechnology)]. São Paulo: Insituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2011.

Breast cancer is one of the most common tumors in women. Some populations show higher risks for breast and ovarian cancers due to founder mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes, as found in *Ashkenazi* Jewish (AJ) population. Genetic tests to detect point mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes were performed in 106 *Ashkenazi* Jewish and non-*Ashkenazi* Jews (NAJ) individuals using dHPLC screening and sequencing. The distribution of founder mutations in the *BRCA1* and *BRCA2* genes was about 55% for 185delAG and 5382isnC in *BRCA1* gene and 12% for 6174delT in *BRCA2* gene. Those mutations were also detected in 7,4% of NAJ group and 84,2% in AJ group ($p<0,001$). Spanish and portuguese founder mutations 330 A>G (11,11%) and 7966C>T (7,4%) were also detected in NAJ group. Breast and ovarian carcinomas were detected in higher frequencies in both groups, about 70% and 20%, respectively. Male breast carcinomas (9,5%) and oviduct carcinomas (2,9%) were diagnosed in NAJ group, and endometrioid carcinoma in AJ group (11, 8%).

Key Words: *BRCA1*. *BRCA2*. Breast. Cancer. Mutation. Founder mutation. *Ashkenazi* Jews.

LISTA DE ABREVIATURAS

IARC (do inglês *International agency research cancer*) - Agência Internacional para a Pesquisa em Câncer

OMS - Organização Mundial de Saúde

INCA - Instituto Nacional do Câncer

BRCA1 (do inglês *Breast-ovarian cancer 1*)

BRCA2 (do inglês *Breast-ovarian cancer 2*)

SMOH - Síndrome de Câncer de Mama e Ovário hereditários

ASCO - Associação Americana de Oncologia Clínica

BRCAPRO - programa de computação para predição estatística de uma mutação herdada nos genes *BRCA1* e *BRCA2*

MyriadII - programa de computação para predição estatística de uma mutação herdada nos genes *BRCA1* e *BRCA2*

Couch (também conhecido como *Penn*) - modelo para predição estatística de uma mutação herdada nos genes *BRCA1* e *BRCA2*

FHAT (do inglês *Family History Assessment Tool*) – modelo para predição estatística de uma mutação herdada nos genes *BRCA1* e *BRCA2*

BOADICEA (do inglês *Breast and Ovarian Analysis of Disease Incidence and Carrier Estimation*) *Algorithm*) - modelo para predição estatística de uma mutação herdada nos genes *BRCA1* e *BRCA2*

IBIS - modelo para predição estatística de uma mutação herdada nos genes *BRCA1* e *BRCA2*

DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) - ácido desoxirribonucléico

RNA (do inglês *Ribonucleic acid*) - ácido ribonucléico

CHEK2 - gene que codifica a proteína CHEK2, reguladora do ciclo celular

TP53 - gene que codifica a proteína supressora de tumor p53, reguladora do ciclo celular

PTEN - gene que codifica a proteína supressora de tumor PTEN, reguladora do ciclo celular

MLH1 (*MutL homolog 1*) - gene de reparo ao dano no DNA; quando mutado é associado ao câncer colorretal hereditário sem polipose

MSH2 - gene de reparo ao dano no DNA; quando mutado é associado ao câncer colorretal hereditário sem polipose e a alguns cânceres de endométrio

MSH6 - gene de reparo ao dano no DNA; associa-se às proteínas dos genes *MSH2* e *BRCA1*, quando mutado é associado ao câncer colorretal hereditário sem polipose

PMS2 - gene que codifica a endonuclease PMS2 associada ao reparo ao dano no DNA. Quando mutada, é associada ao câncer colorretal hereditário sem polipose e à síndrome de Turcot

CMM - câncer de mama masculino

ALU - fragmento de aproximadamente 300 pb de DNA obtido pela ação da endonuclease de restrição *ALUI* e ocorre em grandes quantidades em genomas dos primatas com algumas variações

NCBI (do inglês *National Center for Biotechnology Information*)

BASC (do inglês *BRCA1-Associated Genome Surveillance Complex*) - complexo proteico formado pela proteína codificada pelo gene *BRCA1*, supressores de tumor, sensores de dano ao DNA e transdutores de sinais

RAD51 - gene que codifica a proteína Rad51 envolvida no reparo das quebras de dupla fita no DNA

RC - rearranjos cromossômicos

QDF - quebras de dupla fita

RH - recombinação homóloga livre de erros

NHEJ (do inglês *Nonhomologous end joining*) - 'ligação não homóloga final'

BRIP1 (do inglês *Fanconi anemia group J protein*) - proteína da família das helicases, interage com a proteína BRCA1

SWI/SNF - genes que codificam várias proteínas que atuam na desestabilização das histonas

S - fase 'S' do ciclo celular

G2 - fase 'G2' do ciclo celular

SBIBAE - Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein

JA - Judeus *Ashkenazi*

IOA - indivíduos de outras ancestralidades

EDTA (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*) - é um ácido que atua como ligante hexadentado, ou seja, pode complexar o íon metálico através de seis posições de coordenação, que são elas: através de quatro ânions carboxilato (-COO), após a saída dos $4H^+$ dos grupos carboxílicos, e também através dos dois N.

TE - tampão que deriva da associação dos tampões EDTA 1 mM e Tris 10mM (tampão de pH neutro), e é utilizado para solubilizar o DNA ou RNA protegendo-os de degradação.

PCR (do inglês *Polimerase Chain Reaction*) - é um método de amplificação com criação de múltiplas cópias de trechos selecionados do DNA *in vitro*.

dHPLC (do inglês *denaturing High Performance Liquid Chromatography*) - Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance

FASTA - é um formato baseado em texto para representar as sequências de nucleotídeos ou peptídeos, nos quais as bases ou aminoácidos são representados usando códigos de letras únicas

TEAA (do inglês *triethylammonium acetate*) - tampão para cromatografia líquida de alta desnaturação

IT - Idade no Teste

IDT - Idade no Diagnóstico do Tumor

BIC (do inglês *Breast Cancer Information Core*) - banco de dados de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*

BRCA 3 - gene *BRCA3*

MLPA (do inglês *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification*) - técnica que permite que múltiplos alvos sejam amplificados com um único par de iniciadores numa mesma reação molecular

Sumário

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Câncer de mama	18
1.2 Fatores de risco para o câncer de mama	18
1.3 Modelo de progressão do câncer de mama	23
1.4 Outros genes relacionados ao câncer de mama hereditário	24
1.5 Câncer de ovário	25
1.6 Câncer de mama masculino	28
1.7 O gene <i>BRCA1</i>	30
1.8 O gene <i>BRCA2</i>	33
1.9 Funções dos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	34
1.10 Ancestralidade - Judeus <i>Ashkenazi</i>	37
1.11 Frequência de mutações em Judeus <i>Ashkenazi</i>	38
2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	40
3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivo específico	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Tipo de estudo	45
4.2 Amostra	45
4.3 Coleta dos dados	46
4.5 Extração do DNA	46
4.6 Amplificação dos fragmentos de DNA por PCR	46
4.7 Rastreamento gênico e caracterização das mutações	47
4.7 Rastreamento gênico e caracterização das mutações	48
4.8 Cromatografia líquida desnaturante de alta performance (dHPLC)	48
4.9 O sequenciamento automático	50
5 RESULTADOS	51
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	76
ANEXO - Iniciadores para o gene <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> : região amplificada, tamanho do amplicon, iniciadores usados e temperaturas de análise por <i>dHPLC</i>	95

1 INTRODUÇÃO

A Agência Internacional para a Pesquisa em Câncer (IARC) e a Organização Mundial de Saúde (OMS) noticiaram em 2008 que o impacto global para esta doença superou o dobro das estatísticas nas últimas 3 décadas. Há expectativa de que este quadro ainda aumentará, devido ao constante crescimento da faixa populacional senil e a sua relação com o impacto do câncer no mundo. As mesmas fontes estimaram também que, no mesmo ano, ocorreriam cerca de 12 milhões de novos casos de câncer e 7 milhões de óbitos decorrentes desta doença no mundo. A maior incidência foi para os tumores malignos no pulmão, mama, cólon e reto. No mesmo período, o estudo apontou que na América do Sul, Central e Caribe por volta de 1 milhão de novos casos surgiram e destes, 589 mil indivíduos viriam ao óbito. Na população masculina o mais frequente foi o câncer de próstata, enquanto que nas mulheres os mais frequentes foram os tumores de mama e útero seguidos do câncer de cólon e reto (*World Cancer Report, 2008*).

As estimativas para o Brasil nos anos de 2010 e 2011 apontam para uma ocorrência de cerca de 50 mil novos casos de câncer de mama na população feminina e 55 mil para o câncer de próstata (figura 1).

Figura 1. Tipos de câncer estimados até 2011 para a população brasileira. Destaque para o câncer de mama feminino e para o câncer de próstata.
Fonte: Brasil (2009).

1.1 Câncer de mama

De forma geral, podemos sugerir que o câncer de mama é um dos mais incidentes no mundo e também o mais comum na população feminina. São notificados 22% de novos casos a cada ano. No Brasil, para 2010 foram esperados 49.240 novos casos, com risco de 49 casos em cada 100 mil mulheres. Na região sudeste o câncer de mama feminino é o mais incidente, com um risco estimado em cerca de 65 novos casos em cada 100 mil mulheres (Instituto Nacional do Câncer, INCA, 2010). Mais de 10.000 mortes têm sido reportadas anualmente pelo Ministério da Saúde (Brasil, 2010), e sem dúvida, é a neoplasia mais comum diagnosticada em mulheres, com destaque para as de origem hispânica, liderando as causas de mortes dentre os outros tipos de câncer (Hines et al., 2010).

1.2 Fatores de risco para câncer de mama

Das mulheres que desenvolvem o câncer de mama, por volta de 25%, não possuem um histórico familiar para a doença, ao passo que 75% das mulheres têm histórico familiar e certamente, possuem um alto risco de desenvolver o câncer de mama. Ressaltamos que as mulheres com um parente de primeiro grau que teve o câncer de mama, têm duas vezes mais risco de desenvolver esta doença. No caso de dois parentes de primeiro grau diagnosticados com câncer de mama, este risco aumenta em até cinco vezes (*American Cancer Society*, 2007). Há também um risco de cerca de 50% para o desenvolvimento de um segundo câncer de mama primário (*M.D. Anderson Cancer Center*, 2009).

Entretanto é importante salientar que aproximadamente 7% dos diagnósticos para câncer de mama são atribuídos a uma mutação herdada do gene *BRCA1* (*Breast-ovarian cancer 1*) ou *BRCA2* (*Breast-ovarian cancer 2*) que confere forte predisposição para o desenvolvimento desta doença (*American Cancer Society*, 2007; Bignon et al., 2004).

Infelizmente, há comprovação de que as mutações em *BRCA1* ou *BRCA2* estão associadas com a síndrome de câncer de mama e ovário hereditários (SMOH), e as mulheres com esta síndrome apresentam entre 50 e 90% (figura 2) de chance de desenvolver o câncer de mama ao longo da vida (Garber et al., 2005; Ford et al., 1998). O câncer de mama desenvolvido por esta síndrome usualmente

ocorre na faixa etária mais jovem (antes dos 50 anos de idade), onde cerca da metade da casuística dos portadores destas mutações desenvolvem o câncer de mama (Associação Americana de Oncologia Clínica, ASCO, 2007B).

Nesta faixa etária, o índice de acometimento do câncer de mama, como na maioria das síndromes hereditárias do câncer, está em contraste com a média de risco para a população feminina. Nesta, apenas 20% dos diagnósticos para o câncer invasivo, ocorrem antes dos 50 anos (Asco, 2007B). Em adição, mulheres com SMOH têm 15 a 40% de risco cumulativo para desenvolver também o câncer de ovário. Este, por sua vez, acomete uma faixa etária mais velha (após os 70 anos idade) entre os portadores das mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Para se ter idéia, isto representa um risco de 1,4% de desenvolver o câncer de ovário na população mundial nesta faixa etária (Offit et al., 2004; *National Cancer Institute*, 2007A). Alguns portadores destas mutações têm também um risco aumentado para outros tipos de tumor, como o câncer de mama masculino, pancreático, ducto biliar, vesícula biliar e melanoma, embora a magnitude destes riscos ainda não esteja bem esclarecida ou mensurada (Offit et al., 2007).

Assim como na maioria dos tumores de característica hereditária, excetuando-se as mutações para o gene da ataxia telangiectasia ou Síndrome de Louis-Bar, as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são transmitidas em caráter autossômico dominante (Salmon et al., 2004; *National Cancer Institute*, 2007B). Isto quer dizer que tanto o pai quanto a mãe podem transmitir uma cópia mutada do gene para a geração descendente, e cada criança, independente do sexo, possui 50 % de risco de herdar esta cópia mutada (Salmon et al., 2004; *National Cancer Institute*, 2007B).

O histórico familiar atualizado para a avaliação do risco para câncer de mama possui a propriedade de alertar para suspeitas de uma síndrome de câncer de mama e ovário hereditários devido à mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* ou outros genes. No ano de 2007, a Associação Americana de Oncologia Clínica alertou para a síndrome de câncer de mama que inclui a presença de um ou mais dos fatores relacionados a seguir:

1. Histórico pessoal de câncer de mama precoce diagnosticado até os 45 anos de idade;

2. Múltiplos membros da família com diagnóstico para câncer de mama do mesmo lado da família (principalmente se ocorrer até os 50 anos de idade);
3. Membro da família com diagnóstico para câncer de mama masculino independente da faixa etária;
4. Membro da família, feminino, com múltiplos tumores primários diagnosticados até os 50 anos de idade;
5. Um ou mais casos de câncer de ovário do mesmo lado da família;
6. Histórico pessoal ou membro da família com primeiro grau de parentesco e com câncer de mama ou ovário;
7. Possuir outros tumores associados com qualquer síndrome diagnosticada do mesmo lado da família;
8. Populações fundadoras de risco, como descender dos Judeus *Ashkenazi*;
9. Mutação em *BRCA1* ou *BRCA2* identificada na família.

Parte essencial de um histórico familiar investigado são as anotações da estrutura familiar, ou seja, apontar em qual nível da árvore genealógica ocorreu diagnóstico ou *causa mortis* por câncer de mama ou ovário. O fato de pertencer a uma família onde um único indivíduo foi diagnosticado precocemente para o câncer de mama é mais significativo do que uma estrutura familiar limitada a poucos indivíduos, particularmente, quando há número reduzido de mulheres adultas numa faixa etária fértil (*National Comprehensive Cancer Network NCCN*, 2007B; Weitzel et al., 2007). O histórico também deve conter informações sobre a ancestralidade e etnia familiar, pois várias síndromes genéticas ocorrem com maior frequência ou então possuem notadamente mutações fundadoras em seus grupos populacionais (*NCCN*, 2007B; *American Medical Association*, 2004; Thompson et al., 2004; Maradiegue et al., 2006).

Os fatores reprodutivos, que incluem as mulheres que apresentam idades de menarca precoce, nuliparidade, nascimento do primeiro filho depois dos 30 anos de idade e a menopausa tardia, também estão constantemente associados a um aumento do risco para câncer de mama. Isto é presumido por causa da exposição do tecido mamário aos efeitos hormonais do estrógeno e da progesterona (Pike, 1983; Offit et al., 2004; *National Cancer Institute*, 2007;). Além disso, as mulheres

com histórico cirúrgico devem ser questionadas a respeito do tipo de intervenção a que foram submetidas, bem como ao número de possíveis biópsias ou exames controle realizados ao longo de suas vidas clínicas. Mulheres com história atípica de hiperplasia ductal ou lobular, por exemplo, também têm cinco vezes mais risco de desenvolver câncer de mama quando comparado às mulheres sem este fator (*American Cancer Society*, 2007). Uma história de carcinoma lobular *in situ* aumenta de maneira ímpar o risco para o câncer de mama invasivo, tanto na mama contralateral, como na mama afetada (ASCO, 2007B).

A exposição à terapia de reposição hormonal deveria incluir tipos de drogas e duração cumulativa de uso. Segundo o *Women's Health Initiative*, cerca de 30% das mulheres desenvolveu o câncer de mama depois de se submeterem a um procedimento que combinou a administração de estrógeno e progesterona durante uma média de 5 anos (Rossouw, 2003). Outro tipo de exposição, pela qual as mulheres jovens foram submetidas em algum momento de suas vidas e depois vieram a ter câncer de mama foi a radiação (NCCN, 2007c; Land et al. , 2003; Preston et al., 2002; Hill et al., 2005).

Certos estilos de vida ou hábitos cotidianos são fatores que contribuem de modo decisivo em relação ao risco de desenvolver o câncer de mama. Demonstrou-se que a ingestão de quantidades crescentes de álcool etílico aumenta o risco para o câncer de mama (Lenz et al., 2002; *American Cancer Society*, 2007). A obesidade ou sobrepeso também foram relacionados ao aumento de risco para este câncer (Carmichael et al., 2004; Harvie, et al., 2005). Por outro lado, demonstrou-se que a atividade física reduz este risco na população feminina. O tempo exato, a frequência e a quantidade de exercícios físicos ainda permanecem indefinidas (Friedenreich et al., 2002; *American Cancer Society*, 2007). Ainda segundo o *Women's Health Initiative*, as mulheres que praticam caminhadas vigorosas por aproximadamente 1-2 horas por semana, tiveram um decréscimo de cerca de 20 % no risco para ter o câncer de mama (McTiernan et al., 2003). O cálculo para obtenção do grau de risco para o câncer de mama está baseado nas informações detalhadas do histórico familiar de cada indivíduo e das suas gerações predecessoras. Contudo, nem sempre possuímos todo um conjunto de informações específicas e nestes casos recorreremos à utilização de modelos empíricos para esta inferência. O *BRCAPRO*, *MyriadII*, *Couch* (também conhecido como *Penn*), *Family History Assessment Tool* (*FHAT*), *The Manchester, Penn II*, *IBIS* e o *Breast and Ovarian Analysis of Disease*

Incidence and Carrier Estimation Algorithm (BOADICEA) são modelos que têm sido desenvolvidos para predição da probabilidade de identificação das mutações germinativas de um indivíduo ou em determinada família. Cada modelo calcula o risco baseado na inclusão de diferentes diagnósticos de câncer e todos incorporam o histórico familiar para câncer de mama e ovário. Além disso, *FHAT* inclui ainda o fator de diagnóstico anterior para câncer de cólon ou próstata, enquanto que o *Manchester*, *BOADICEA* e *Penn II* incluem informação anterior sobre o diagnóstico para o câncer de próstata e pâncreas. O *IBIS* já inclui apenas o diagnóstico para câncer de mama feminino e ovário. Também é válido salientar que a taxa de risco para o câncer de mama é excedida em cerca de 10% das mulheres, ou seja, determinados fatores de seu histórico familiar ou pessoal têm mais peso no cálculo de uma estimativa de risco em desenvolver ou não a doença.

Mulheres portadoras de mutação nos genes ligados ao desenvolvimento de câncer de mama possuem alto grau de risco e podem, em certos casos, considerar a quimioprevenção ou inclusive a mastectomia profilática (NCCN, 2007A, 2007B). O rastreamento por ressonância nuclear magnética é recomendado como um importante exame diagnóstico, assim como, a mamografia e o ultrassom, em mulheres com risco empírico maior que 20% para câncer de mama (Saslow et al., 2007). De forma geral, independente de ter um risco grande para o desenvolvimento do câncer, a conduta clínica estabelece que as mulheres passem por exames periódicos, como por exemplo, a mamografia anual a partir dos 25 anos de idade (Saslow et al., 2007; Kriege et al., 2004).

1.3 Modelo de progressão do câncer de mama

O carcinoma de mama, tumor maligno desenvolvido a partir de células epiteliais ou glandulares, inicia-se no período embrionário. A morfogênese ductal começa a partir de uma estrutura do tipo 'broto' com ramificações, alongamento e canalização. Células basais expressando tanto a proteína actina de músculo liso como citoqueratinas de alto peso molecular aparecem no final do segundo trimestre de formação do tecido. Na mama adulta dois tipos celulares distinguem-se: as células mioepiteliais e as células lumbais secretoras. Histopatológica e clinicamente, várias etapas podem ser identificadas durante a progressão e estadiamento tumoral até determinado grau de malignidade (Osin, 1998). A hiperplasia ductal, ainda

considerada citologicamente formada por células benignas, caracteriza-se pela proliferação de células distribuídas de forma desigual, o núcleo apresenta várias formas e padrões de cromatina, e é frequentemente considerado como um sinal patológico. As células têm relativamente pouco citoplasma com bordas não definidas, e a transição para hiperplasia atípica é clinicamente associada ao aumento do risco para o desenvolvimento de câncer de mama. O desenvolvimento do carcinoma *in situ*, tanto ductal quanto lobular, caracteriza-se pela proliferação de células com características citológicas de malignidade, porém, ainda sem invasão do estroma pela membrana basal celular. Quando as células que se separam da membrana basal passam a invadir o estroma, os carcinomas caracterizam-se como invasivos, e normalmente alcançam a corrente sanguínea ou o sistema linfático, resultando em metástases. A maioria dos carcinomas invasivos são do tipo ductal, 85% a 95%, enquanto que os lobulares infiltrantes constituem aproximadamente 10% de todos os casos de câncer de mama.

No modelo clássico de desenvolvimento tumoral, uma célula epitelial normal poderá desenvolver uma pré-malignidade atípica e depois de uma expansão clonal tornar-se uma lesão pré-maligna, ou seja, um carcinoma *in situ*. Após determinado tempo, tal lesão pode ter característica invasiva e metastática.

A cada etapa fisiopatológica, eventos genéticos importantes podem ocorrer, e novas propriedades celulares com uma consequente vantagem clonal para a própria célula podem instalar-se. Estes eventos genéticos variam de pequenas mutações de ponto, deleções cromossômicas, translocações e amplificações até mudanças mais severas como grandes perdas cromossômicas ou duplicações. As alterações em genes relacionados aos processos regulatórios de mitose e envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA podem levar a uma instabilidade genômica, da mesma maneira que as aberrações em outros genes poderão levar a uma progressão da malignidade fenotípica importante (Beckmann, et al., 1997; O'Connell, 2003).

1.4 Outros genes relacionados ao câncer de mama hereditário

O câncer é uma doença genética, cuja tumorigênese pode ser descrita como um processo de múltiplas etapas. Cada etapa está correlacionada com uma ou mais mutações distintas nos genes regulatórios (Kenemans, et al., 2004). O câncer de

mama hereditário constitui aproximadamente 50% dos todos os casos de câncer de mama familiar. Como descrito anteriormente, os genes de alta penetrância que aumentam a susceptibilidade ao câncer de mama são os genes *BRCA1* e *BRCA2*. Porém, sabe-se que em adição aos genes *BRCA1* e *BRCA2* (tabela 1), vários outros genes têm se mostrado mutados nos casos de câncer de mama familiar (Wooster e Weber, 2003).

O gene *CHEK2*, localizado no cromossomo 22, é um mediador da resposta ao dano do DNA (Rouse e Jackson, 2002; Myung, et al., 2001) que quando mutado é responsável por cerca de 5% dos casos de câncer de mama familiar (Wooster e Weber, 2003). Dois estudos em 2002 verificaram que uma variante encontrada no gene *CHEK2*, 1100delC, pode causar uma baixa penetrância ao câncer de mama familiar (Meijers-Heijboer et al., 2002; Vahteristo et al., 2002).

Tabela 1- Genes associados ao SMOH

Gene	Locus	Associação com SMOH
<i>BRCA1</i>	17q12-21	Mutação germinativa (SMOH)
<i>BRCA2</i>	13q12-13	Mutação germinativa (SMOH)
<i>TP53</i>	17q13.1	Mutação germinativa (Li-Fraumeni)
<i>PTEN</i>	10q.23-24	Mutação germinativa (Cowden)
<i>ERBB2/HER2/NEU</i>	17q21	Frequentemente não expresso em cânceres mutados por <i>BRCA1</i>

Fonte: Kenemas et al., 2004.

O gene *TP53*, localizado no cromossomo 17q13.1, é um dos genes mutados normalmente observado em casos de câncer de mama esporádicos. Salientamos ainda que as mutações no gene *PTEN*, localizado no cromossomo 10q23, cujas mutações germinativas resultam na Síndrome de Cowden, são responsáveis por pouco mais que 1% de todos os casos de câncer de mama familiar (Wooster e Weber, 2003).

1.5 Câncer de ovário

É considerado o tumor ginecológico mais difícil de ser diagnosticado e com menores chances de cura. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer, a estimativa para 2008 foi de 2836 casos e para o ano de 2009 foi de 3837 casos (Brasil, 2010). Cerca de 90% dos tumores que se iniciam nos ovários são carcinomas com malignidades ovarianas primárias remanescentes. Estes tumores são rigorosamente divididos conforme a origem estromal e em relação às suas células germinativas (Auesperg et al., 2001; Ozols et al., 2005).

O câncer de ovário familiar confere um risco estimado para o desenvolvimento do câncer de ovário na irmã de um paciente com este tipo de câncer de 2.5%, e um risco de 7% para a mãe do paciente (Ziogas et al., 2000). O carcinoma de ovário que se desenvolve em mulheres com susceptibilidade hereditária é responsável por cerca de 5 a 15% dos casos de tumores de ovário desenvolvidos (Boyd, 1998; Claus et al., 1996; Rubin et al., 1998; Pal et al., 2005). Pelo menos duas alterações genéticas hereditárias predis põem ao câncer de ovário: as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis por aproximadamente 90% dos casos de câncer de ovário em SMOH (Easton et al., 1995; Easton et al., 1997; Ford et al., 1994; Narod et al., 1995a; 1995b; Schubert et al., 1997). Cerca de 10 a 15% dos casos de carcinomas de ovário são desenvolvidos por uma mutação em um dos quatro genes: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, na Síndrome de Lynch (Bewtra, et al., 1992; Lynch et al., 1998; Malander et al., 2006). O risco estimado para desenvolver o câncer de ovário durante a vida em mulheres com SMOH portadoras de mutações no gene *BRCA1* tem sido entre 11% e 66% (Brose et al., 2002; Easton et al., 1993; Easton et al., 1995; Ford et al., 1994; Ford et al., 1998; King et al., 2003; Milne et al., 2008; Satagopan et al., 2002; Struewing et al., 1997). Em relação às portadoras da mutação no gene *BRCA2* com SMOH, o risco estimado para o desenvolvimento desta doença é cerca de 10% a 20% (King et al., 2003; Satagopan et al., 2002; Struewing et al., 1997).

Algumas populações são conhecidas por serem particularmente susceptíveis ao câncer de ovário devido à presença das mutações fundadoras nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Segundo um estudo realizado em 2003 com Judeus *Ashkenazi*, os portadores de uma das mutações fundadoras 185delAG, 5382insC e 6174delT, apresentaram um risco estimado em 23% para o desenvolvimento do câncer de ovário durante a vida (King et al., 2003). Um outro estudo com 92 mulheres diagnosticadas com câncer de ovário, demonstrou que 14 eram portadoras da

mutação 185delAG, 2 portadoras da 5382insC no gene *BRCA1* e 7 portavam a mutação 6174delT no gene *BRCA2* (Tobias et al., 2000). No mesmo ano, 46% das 71 mulheres Judias diagnosticadas com carcinoma de ovário apresentaram uma das três mutações fundadoras (Cass et al., 2003). Na Islândia, a mutação específica do gene *BRCA2* 999del5 é responsável por 8,5% dos casos câncer de mama e 6% a 7,9% pelos casos de câncer de ovário (Johannesdottir et al., 1996; Rafnar et al., 2004). Estudos posteriores apontaram a hereditariedade da mutação 999del5 transmitida como um alto risco para o desenvolvimento do câncer de ovário (Rafnar et al., 2004). Na Dinamarca em 2008, um estudo de grandes rearranjos genômicos em 445 casos de câncer de ovário constatou que mutações patogênicas de *BRCA1* e *BRCA2* estavam presentes em 5,8% dos pacientes com câncer de ovário, incluindo 5 mutações específicas encontradas em mais de um indivíduo, sugerindo a existência de mutações fundadoras de câncer de ovário neste país (Soegaard et al., 2008).

O prognóstico cada vez mais específico, bem como a resposta à conduta clínica no tratamento quimioterápico cada vez mais eficaz contra tumores de ovário diagnosticados em portadores de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* com SMOH, têm sido percebidos e notificados ao longo dos anos (Aida et al., 1998; Ben David et al., 2002; Boyd et al., 2000; Cass et al., 2003; Chetrit et al., 2008; Pal et al., 2007; Rubin et al., 1996; Tan et al., 2008). Entretanto, estudos mais específicos para se determinar a influência dos dados como a inclusão de certas mutações específicas, a exemplo dos Judeus *Ashkenazi*, podem modificar parâmetros importantes como a idade média do surgimento da doença, taxas de sobrevida e resultados dos intervalos livre da doença (Lynch et al., 2009). De um modo geral, pacientes com mutações em *BRCA1* e câncer de ovário parecem possuir uma sobrevida melhorada em relação aos pacientes com câncer de ovário esporádico (Cass et al., 2003). Mulheres susceptíveis a SMOH e aquelas portadoras de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* são conhecidas por possuir um risco cumulativo de 10% a 66% de desenvolvimento do câncer de ovário, sendo melhor definido em famílias com alterações aberrantes detectadas pelo teste genético (Brose et al., 2002; Easton et al., 1993; 1995; Ford et al., 1994; 1998; King et al., 2003; Satagopan et al., 2002; Struwing et al., 1997). A literatura informa também que aparentemente a penetrância de mutações em *BRCA1*, que predispõem a carcinomas de ovário, ligeiramente excede as de mutações em *BRCA2* (Antoniou et al., 2000; Brose et al.,

2002; Easton et al., 1997; Ford et al., 1998; King et al., 2003; Satagopan et al., 2002).

No diagnóstico e controle do câncer de ovário no caso de pacientes com SMOH, a presença de um parente de primeiro grau, dois ou mais parentes de segundo grau com câncer de ovário ou mama indicará um aumento a longo prazo do desenvolvimento do câncer de ovário. A estas mulheres como nas demais populações conhecidas com alta prevalência de mutações *BRCA1* e *BRCA2* associadas ao câncer, devem ser oferecidos aconselhamento genético precoce e caso necessário, encaminhamento clínico para a realização do teste genético (Lynch et al., 2009).

1.6 Câncer de Mama Masculino

A incidência de câncer de mama masculino (CMM) vem aumentando ao longo dos anos, apesar da taxa de incidência ainda ser considerada baixa: 1 homem para cada 100 mulheres desenvolve a doença (Czene et al., 2007), e esta é responsável por cerca de 1% de todos os tumores masculinos (Lanitis et al., 2008). Segundo o Instituto Nacional do Câncer, acredita-se que cerca de 250 novos casos da doença no Brasil surgem a cada ano. A raridade do CMM tem resultado em vários estudos que avaliam fatores de risco, métodos de detecção e formas de tratamento da doença (Anderson, et al., 2010; Contractor et al., 2008). Entretanto, os diagnósticos e controle do CMM ainda derivam de estudos com o câncer de mama feminino.

O câncer de mama masculino comumente se apresenta como uma espécie de massa unilateral, indolor, ou espessamento, algumas vezes acompanhado por uma protusão no mamilo com retração ou ulceração da pele (Contractor et al., 2008; Fentiman et al., 2006; Hines et al., 2008; Czene et al., 2007). O auge da incidência do CMM ocorre entre 68 e 71 anos (Fentiman et al., 2006; Hines et al., 2008; Lanitis et al., 2008; Czene et al., 2007).

Portadores de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* possuem um alto risco para o desenvolvimento de tumores, especificamente cânceres de mama (tanto em homens quanto em mulheres), ovário, próstata, colorectal e cânceres pancreáticos (Liede et al., 2004). O maior fator de risco para o desenvolvimento de CMM é a presença de uma mutação no gene *BRCA2* (tabela 2). A taxa de risco para desenvolver o CMM em um portador de uma mutação neste gene é de aproximadamente 7%, ou seja, 80

a 100 vezes maior do que na população em geral (Liede et al., 2004; Levy-Lahad et al., 2007; Tai et al., 2007). Estima-se que cerca de 4% a 40% dos pacientes CMM carreguem uma mutação no gene *BRCA2* (Giordano et al., 2004; Friedman et al., 1997; Thorlacius et al., 1997). Ao contrário do gene *BRCA2*, não existem fortes associações entre mutações no gene *BRCA1* e CMM. O risco de desenvolver câncer de mama masculino em um homem portador de mutação no gene *BRCA1* é pouco maior que 1%, e estima-se que uma mutação neste gene esteja presente em torno de 4% dos casos de CMM (Mohamad e Apffelstaedt, 2008).

Mutações em outros genes, incluindo os de checagem do ciclo celular e de atividade de estrógenos e andrógenos aumentam o risco para CMM, mas estes não são tão altos quanto os riscos apresentados pelas mutações associadas ao gene *BRCA2* (Ottini et al., 2010).

Exposição ao estrógeno e à testosterona também está entre os fatores que contribuem para o desenvolvimento do CMM (Contractor et al., 2008; Fentiman et al., 2006). A condição hormonal mais fortemente associada ao câncer de mama é a Síndrome de Klinefelter, caracterizada pela adição de pelo menos um cromossomo X à condição normal XY (Contractor et al., 2008; Fentiman et al., 2006). Homens com a Síndrome de Klinefelter têm disgenesia testicular, ginecomastia (alargamento da mama masculina) e baixas concentrações de testosterona, bem como um aumento relevante nos níveis de gonadotrofinas (Fentiman et al., 2006; Hultborn et al., 2007).

A obesidade com os aumentos das taxas de estrógeno e testosterona, também é considerada um fator de risco importante para o desenvolvimento do CMM. Homens com um índice de massa corporal maior que 30 apresentam um risco duas vezes maior (Fentiman et al., 2006; Brinton, 2008). Níveis de estrógenos altos são frequentemente associados aos homens com cirrose hepática, aumentando assim o risco de CMM (Lanitis et al., 2008; Sorensen et al., 1998). Casos de câncer de mama bilateral têm sido observados em homens expostos aos hormônios estrogênicos exógenos, principalmente em tratamentos de câncer de próstata como também em transexuais que fazem o uso deste hormônio (Fentiman et al., 2006).

O uso da radiação terapêutica ionizante tem sido associado ao aumento do risco de câncer de mama feminino, e poucos estudos sugerem que exista uma situação semelhante em relação ao CMM (Fentiman et al., 2006; Agrawal et al., 2007). O CMM ocorre ainda com certa frequência após o tratamento de

ginecomastia unilateral e dos tratamentos de alargamento do timo (Sasco et al., 1993).

Homens que trabalham em ambientes com altas temperaturas têm um risco maior de desenvolver o CMM, provavelmente por falha testicular resultante de longos períodos de exposição a altas temperaturas (Fentiman et al., 2006; Brinton, 2008). Exposições aos carcinógenos como a gasolina e gases têm sido também associadas ao CMM (Fentiman et al., 2006; Hansen, 2000).

Os fatores como a ingestão de álcool, fumo e níveis de atividades físicas têm sido associados ao CMM, contudo nenhum destes fatores têm sido consistentemente associados aos altos riscos para o desenvolvimento da doença (Casagrande et al., 1998¹; Koc e Polat et al., 2001²; Ewertz et al., 2001³; apud Venkitaraman, 2009; - e Brinton et al., 2008, 2010).

As recomendações para o rastreamento têm sido atualizadas sempre. Guias de sobrevivência em homens com alto risco para CMM sugerem um controle similar ao recomendado nos casos de câncer de mama femininos, que incluem exames clínicos da mama anuais, auto-exames mensais e acompanhamento anual com mamografia, quando necessário (Johansen Taber et al., 2010).

Tabela 2 - Fatores de risco para desenvolvimento de câncer de mama masculino (CMM)

Presença de uma mutação conhecida em <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>
História sugestiva de câncer associado a um gene <i>BRCA</i> , seja em um indivíduo ou familiar
Exposição ao estrógeno/ insuficiência androgênica
Síndrome de Klinefelter
Anormalidade Testicular
Obesidade
Cirroze hepática
Terapia exógena com estrógeno
Exposição à radiação
Exposição ocupacional
Ambiente com altas temperaturas
Exposição ao estrógeno
Exposição aos carcinógenos

Fonte: Johansen Taber et al., 2010.

¹Casagrande JT: A case-control study of male breast cancer. Cancer Res. 1988;48:1326-30.

²Koc M: Epidemiology and aetiological factors of male breast cancer: a ten years retrospective study in eastern Turkey. Eur J Cancer Prev. 2001; 10:531-4.

³Ewertz M, et al: Risk factors for male breast cancer - a case-control study from Scandinavia. Acta Oncol 40;461-71:2001.

1.7 O Gene *BRCA1*

Figura 3: Localização do gene *BRCA1* no cromossomo 17q21. *Clinical Tools, INC.*

A caracterização da hereditariedade autossômica predispondo as mulheres ao câncer de mama e ovário foi primeiramente notificada no início da década de 70 pelo grupo de Lynch, na Universidade de Creighton (Lynch et al., 1972, 1974; Krush, 1971). Em 1990, Hall et al. demonstraram uma ligação entre um sítio do braço longo do cromossomo 17 (sítio específico para câncer de mama) com incidência aumentada do câncer em mulheres jovens das famílias investigadas. Em menos de um ano, Narod et al. (1991) demonstraram que o mesmo *locus* gênico estava relacionado aos diagnósticos da síndrome de câncer de mama e ovário hereditários, descrita vinte anos antes por Lynch (Lynch et al., 1972, 1974; Lynch e Krush, 1971; Narod et al., 1991). Este gene, localizado no cromossomo 17q21 (*National Center for Biotechnology Information*, 2008) foi nomeado *BRCA1* e foi clonado por Miki e colaboradores no ano de 1994, e dois anos depois, Smith e colaboradores (1996) sequenciaram 117.143 pares de bases do cromossomo humano 17, pertencentes ao gene *BRCA1*. Foram identificados 24 exons do *BRCA1* (81.190 pb) que possuem uma alta densidade incomum de DNA repetitivo ALU (41,5%), mas, relativa baixa densidade de outras sequências repetitivas (4,8%). A extensão total do gene *BRCA1* é 193.689 pb (NCBI, 2011).

O comprimento dos íntrons do gene *BRCA1* varia de 403 pb a 9,2 kb e existem três regiões de marcadores de microsátélites intragênicos localizados nos íntrons 12, 19 e 20. O gene *BRCA1* codifica uma fosfoproteína nuclear com 1863 aminoácidos nomeada 'Proteína de susceptibilidade tipo I' cuja função é manter a estabilidade genômica, atuando também como um supressor de tumor (figura 4). Esta proteína combina-se com outros supressores de tumor, sensores de dano ao DNA, e tradutores de sinal para formar um grande complexo de proteína com multi-subunidades conhecido como *BRCA1-associated genome surveillance complex* (BASC), ou complexo de sobrevivência genômica associado ao *BRCA1* (Wang et al., 2000). A proteína do *BRCA1* associa-se com a RNA polimerase II, e através do seu domínio C-terminal interage com os complexos de histonas desacetilases. Esta proteína também tem uma função na transcrição, reparo do DNA em quebras de fitas duplas (Friedenson, 2007) e na regulação transcricional (Starita et al., 2003).

Figura 4:: Proteína codificada pelo gene *BRCA1*.

Sequência ALU: fragmento de aproximadamente 300pb de DNA obtido pela ação da endonuclease de restrição *ALUI*. Ocorre em grandes quantidades em genomas dos primatas com algumas variações. São as sequências móveis mais abundantes do genoma e derivam principalmente do gene 7SL RNS, quando uma cópia deste se tornou precursor da sequência ALU no genoma do ancestral dos Supraprimatas (Batzer et al; 2002; Jan et al, 2007).

1.8 O Gene *BRCA2*

Figura 5: Localização do gene *BRCA2* no cromossomo 13. *Clinical Tools, INC.*

O gene *BRCA2* foi identificado em 1995 por Wooster e colaboradores através de uma posição clonal da região do cromossomo *13q12-q13*, relacionado à incidência de câncer de mama em famílias na Islândia. Em 1996, a sequência completa foi determinada, e revelou-se que o gene *BRCA2* é composto por 27 regiões codificadoras. Estas regiões correspondem a 91.193 pb do DNA genômico (NCBI, 2011).

A posição transcrricional inicia-se no exon 2 que codifica uma proteína altamente carregada, constituída por 3418 aminoácidos, chamada *breast cancer type 2 susceptibility protein* ou proteína que confere suscetibilidade ao câncer de mama tipo 2, cuja alta expressão encontra-se na mama, timo e ainda em menores níveis no pulmão, ovário e baço (Tavtigian et al., 1996). Apesar das estruturas dos genes *BRCA1* e *BRCA2* serem distintas, algumas funções das proteínas codificadas são similares. Ambas são essenciais no mecanismo de reparo do DNA. A proteína codificada pelo *BRCA2* atua junto a outra produzida pelo gene *RAD51* e forma um complexo que atua na reparação das fitas de DNA danificadas, conferindo desta maneira estabilidade ao genoma. Estes danos podem acontecer devido a uma exposição à radiação natural, medicamentosa, ambiental ou ainda durante a troca de material genético na divisão celular (Friedenson et al., 2007).

Figura 6: Proteína codificada pelo gene *BRCA2*

1.9 Funções dos genes *BRCA1* e *BRCA2*

Aberrações no número e estrutura dos cromossomos tem uma influência em células derivadas de tumores sólidos. O termo instabilidade cromossomal é comumente utilizado para referir-se a anormalidades tanto na estrutura como no número dos cromossomos. Porém é importante identificarmos que estas anormalidades são mecanicamente distintas nas suas origens e portanto podem ter conotações diferentes na patogênese do câncer (Venkitaraman, 2009).

Os genes *BRCA1* e *BRCA2*, que como já mencionado, foram descobertos nos anos 1990 e codificam proteínas muito grandes que são largamente expressas em células em divisão. E hoje, quase duas décadas depois, está claro que tanto o gene *BRCA1* quanto o gene *BRCA2* desempenham um papel essencial na preservação da estabilidade estrutural e numérica dos cromossomos durante a divisão celular.

Mutações germinativas que afetam apenas um alelo tanto do gene *BRCA1* quanto do gene *BRCA2* conferem uma susceptibilidade aos cânceres de mama e ovário com alta penetrância levando ao desenvolvimento da SMOH. A heterozigose no gene *BRCA* mutado é suficiente para resultar em uma predisposição ao câncer. Os cânceres que se desenvolvem em portadores de tais mutações aparentemente perdem o segundo alelo do gene *BRCA* através de alterações somáticas durante a progressão tumoral (King et al., 2007⁴, apud Venkitaraman, 2009).

⁴King TA, et al. Heterogenic loss of the wild-type BRCA allele in human breast tumorigenesis. Ann. Surg. Oncol. 2007;14:2510–18.

A homozigose de um polimorfismo de nucleotídeo de base única na região não traduzida do gene que codifica a proteína Rad51, que por sua vez, liga-se à proteína BRCA2, modestamente aumenta o risco para o câncer de mama (Antoniou et al., 2006⁵, apud Venkitaraman, 2009), mas ainda há a necessidade de se elucidar outros supostos modificadores genéticos.

O papel essencial dos genes *BRCA* em preservar a integridade da estrutura cromossomal indica que sua inativação pode afetar indiretamente no início ou promoção da carcinogênese. Os genes supressores de tumor deste tipo são conhecidos como ‘*caretakers*’ ou ‘cuidadores’. A inativação destes genes aumenta a possibilidade de mutação ou mesmo a expressão alterada dos genes chamados ‘*gatekeepers*’, que controlam a divisão celular, morte e vida, promovendo o crescimento da células do câncer (Kinzler e Vogelstein, 1997⁶, apud Venkitaraman, 2009).

Cariotipagem espectral revela que durante a divisão celular em cultura, células deficientes em *BRCA2* espontaneamente acumulam rearranjos cromossomais (RC) como translocações, grandes deleções e fusões que envolvem cromossomos não-homólogos (Yu et al., 2000⁷, apud Venkitaraman, 2009), sendo vistos eventos semelhantes com a inativação do gene *BRCA1* (Xu et al., 1999⁸, apud Venkitaraman, 2009). As RCs são as lesões mais frequentemente encontradas em tumores humanos e que levam a uma perda dos *loci* do supressor de tumor, devendo também começar os eventos oncogênicos através da criação de proteínas de fusão.

Em células em divisão, as RCs começam durante a replicação do DNA, na fase S do ciclo celular. Mesmo durante o crescimento celular normal, o complexo da DNA polimerase pode ‘abrigar’ lesões como mudanças oxidativas nas bases nitrogenadas na fita molde, impedindo a progressão da forquilha de replicação. Forquilhas detidas podem ser clivadas para gerarem as quebras de dupla fita do DNA (QDF); de forma alternativa, a replicação pode ser completada ao redor da lesão ‘abrigada’ para deixar pra trás uma QDF que não pode ser preenchida até que a lesão seja removida ou ignorada.

⁵Antoniou AC, Easton DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 2006; 25:5898–905.

⁶Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*. 1997;386:761–2.

⁷Yu VP, Koehler M, et al. Gross chromosomal rearrangements and genetic exchange between nonhomologous chromosomes following BRCA2 inactivation. *Genes Dev*. 2000;14:1400–6.

⁸Xu X, et al. Centrosome amplification and a defective G2 M cell cycle checkpoint induce genetic instability in BRCA1 exon 11 isoform-deficient cells. *Mol. Cell*. 1999;3:389–95.

Nonhomologous end joining (NHEJ) ou algo como ‘ligação não homóloga final’, pode religar as fitas quebradas do DNA sem considerar sua homologia, e com adição e deleção de nucleotídeos no local da ‘rejunção’, pode levar a uma propensão de erros no reparo mutagênico. Um outro mecanismo mais utilizado pelas células para o reparo das QDFs durante a divisão celular, é a recombinação homóloga do DNA livre de erros ou RH, no qual a fita danificada é reparada usando uma sequência homóloga intacta como molde. Um dos moldes mais utilizados pelas células para o reparo por RH é uma cromátide irmã, pois é uma perfeita cópia gerada pela replicação durante a fase S do ciclo celular.

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* são essenciais para processos RH eficientes nas células, assim como há vários estudos evidenciando que tumores humanos que não possuem estes genes são deficientes em RH, enquanto que o reparo de QDF por NHEJ pode continuar sendo processado, ainda que mais desregulado (Moynahan et al., 1999⁹; Moynahan et al., 2001¹⁰; Snouwaert et al., 1999¹¹; Tutt et al., 2001¹²; Xia et al., 2001¹³, apud Venkitaraman, 2009).

As funções do gene *BRCA1* no reparo do DNA não estão restritas ao RH. Sua função varia da resposta celular à quebra do DNA ou impedimento da progressão da replicação, por outro lado servindo localmente em locais de danos do DNA para recrutar moléculas e reparar as lesões do DNA, até como efetor das respostas ao dano do DNA. Em contraste, *BRCA2* atua mais em locais de danos ao DNA como mediador específico de certas reações que levam a RH (Venkitaraman, 2002).

O gene *BRCA1* foi descrito interagir com a enzima de recombinação RAD51 e o gene *BRCA2* (Chen et al, 1998¹⁴, apud Venkitaraman, 2009), que trabalha diretamente nas reações que levam a RH. Porém como esta regulação ocorre ainda não foi esclarecido. Atividades locais também são promovidas pelo gene *BRCA1* nos locais de quebra do DNA que são reparados por RH através da interação com enzimas que modificam a cromatina ou a estrutura do DNA, como a helicase BRIP1.

⁹Moynahan ME, et al. Brca1 controls homology-directed DNA repair. Mol Cell. 1999;4:511–18.

¹⁰Moynahan ME, et al. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. Mol Cell 2001;7:263–72.

¹¹Snouwaert JN, et al. 1999. BRCA1-deficient embryonic stem cells display a decreased homologous recombination frequency and an increased frequency of nonhomologous recombination that is corrected by expression of a Brca1 transgene. Oncogene 18:7900–7.

¹²Tutt A, et al. Mutation in Brca2 stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences. EMBO J. 2001;20:4704–16.

¹³Xia F, et al. Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal nonhomologous end joining. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:8644–49.

¹⁴Chen J, et al. Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. Mol Cell. 1998;2:317–28.

Além disso, a proteína BRCA1 tem sido observada em interações nos locais de dano ao DNA remodelando cromatinas SWI/SNF e interagindo com reguladores de acetilação e desacetilação de histonas (Cantor et al., 2001¹⁵, apud Venkitaraman, 2009).

O gene *BRCA1* é alvo de uma cascata de fosforilação de proteínas quinases que sinalizam a presença de quebras de DNA (Venkitaraman, 2002; 2004). Estas modificações são necessárias para impedir as checagens do ciclo celular iniciadas pelo dano no DNA durante as fases S e G2. Porém a atividade do gene *BRCA1* na ativação da checagem e como ela está conectada às suas funções no RH, ainda não está claro.

O gene *BRCA2* por sua vez, liga-se diretamente à enzima RAD51, e esta possui uma atividade catalítica central no RH. A proteína RAD 51 reúne substrato de DNA de fita simples para formar um filamento helicoidal de nucleoproteína que invade e pareia com o DNA homólogo duplo, iniciando assim uma troca entre as moléculas do DNA pareado (West, 2003¹⁶, apud Venkitaraman, 2009). A interação entre a proteína do gene *BRCA2* e a RAD51 envolve uma proporção considerável de um *pool* celular total de cada uma das proteínas citadas (Marmorstein et al., 1998¹⁷, apud Venkitaraman, 2009).

1.10 Ancestralidade – Judeus *Ashkenazi*

Os Judeus *Ashkenazi* ou Asquenazitas, também conhecidos como Judeus *Ashkenazic* ou *Ashkenazim* são descendentes das comunidades judaicas medievais ao longo do rio Reno na Alemanha. O termo Asquenazita hoje é utilizado para referir-se às tradições religiosas dos Judeus que viviam na Europa Oriental, assim como as de seus descendentes, espalhados por todo mundo após a II Guerra Mundial. O termo *Ashkenaz* é um nome hebreu medieval que denomina esta região e conseqüentemente, a Alemanha. Assim, o termo *Ashkenazim* ou *Ashkenazic Jews* refere-se, literalmente, aos ‘Judeus da Alemanha’. Devido aos muitos centros de ensinamentos judaicos na Alemanha, os Judeus da Europa Central e Ocidental acabaram sendo chamados também de ‘*Ashkenaz*’.

¹⁵Cantor SB, et al. BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. Cell. 2001;105:149–60.

¹⁶West SC. Molecular views of recombination proteins and their control. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4:435–45.

¹⁷Marmorstein LY, et al. The BRCA2 gene product functionally interacts with p53 and RAD51. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998; 95:13869–74.

Posteriormente muitos Judeus migraram, principalmente do leste, formando comunidades em áreas de línguas não-alemã, incluindo Hungria, Polônia, Bélgica, Lituânia, Rússia, Ucrânia e Europa Oriental entre os séculos XI e XIX. Embora no século XI eles compusessem apenas 3% da população Judaica mundial, em 1931 no seu auge, os Judeus *Ashkenazi* formavam 92% dos Judeus do mundo todo. Hoje eles formam cerca de 80% da população Judaica mundial (Elazar, 2006).

Figura 7: Mapa de imigração dos judeus no mundo de 1881 até o ano de 1931.

1.11 Freqüência de mutações em Judeus *Ashkenazi*

taxa de portabilidade de 10% de câncer de mama diagnosticada em qualquer idade, e uma taxa de 25% para câncer de mama diagnosticada na faixa etária dos 40 a 50 anos de idade. Taxas comparáveis na população não-Judia ou não-*Ashkenazi* é de 6% para o diagnóstico de câncer de mama precoce. Com relação aos casos de câncer de mama masculino em Judeus-*Ashkenazi*, cerca de 20% carregam a mutação germinativa nos genes *BRCA1* e *BRCA2* versus 6% dos casos da população masculina sem origem Judaica (Rubinstein, 2004).

Na população de Judeus *Ashkenazi*, as mutações fundadoras *185delAG*, *5382insC*, ambas no gene *BRCA1*, e a mutação *6174delT* no gene *BRCA2*, foram identificadas com maior frequência (Oddoux et al., 1996¹⁸ apud Rubinstein, 2004; Struwing et al., 1997; Tonin et al., 1996). Juntas representam praticamente todas as mutações encontradas em famílias com câncer de mama ou ovário precoce herdado de famílias de ancestralidade Judia *Ashkenazi* (Adank et al., 2006). Destaca-se também a frequência da mutação fundadora *185delAG* com uma taxa de 20% na população feminina *Ashkenazi* com câncer de mama precoce (Neuhausen et al., 1996). Outra mutação, a *6174delT*, foi estimada em Judeus *Ashkenazi* em cada 3 indivíduos para cada 1000 casos estudados da amostragem populacional. Portanto, o alto risco atribuído à genética das mutações fundadoras dos genes *BRCA* principalmente nos Judeus *Ashkenazi*, e a alta taxa de mortalidade devido ao câncer de mama ou ovário hereditário na população Judia e não-Judia, torna imperativa a dedicação de mais estudos no campo que abrange os testes genéticos, tornando-os cada vez mais específicos, não invasivos e de fácil acesso à população em geral.

¹⁸Oddoux C, et al. The carrier frequency of the *BRCA2* 6174delT mutation among *Ashkenazi* Jewish individuals is approximately 1 %. *Nat Genet.* 1996;14(2):188-90.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O presente estudo foi realizado com o apoio da Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein (SBIBAE) que propiciou a oportunidade de acesso ao material genético da população dos Judeus *Ashkenazi*. Segundo a Associação Americana de Oncologia Clínica – ASCO trata-se de uma população caracterizada geneticamente como fundadora, que possui um alto risco de desenvolvimento de câncer de mama quando comparada a outras populações. Outro fator importante foi a facilidade de obtenção dos resultados dos testes para a realização deste estudo, já que é derivado de um serviço prestado pelo departamento de Oncologia da SBIBAE. Este estudo envolvendo a participação de indivíduos Judeus *Ashkenazi* (JA) e indivíduos de outras ancestralidades (IOA) poderá agregar mais informações que podem abrir novas perspectivas para um diagnóstico mais precoce através de testes genéticos mais direcionados, que podem ser aplicados não só a populações específicas mas como também em populações de diversas origens. Estas informações também poderão ajudar na eficácia do tratamento, quimioprevenção, investigações cada vez mais aprofundadas com outros tumores associados aos genes *BRCA*, a influência dos fatores hormonais e as interações gene a gene.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar e caracterizar as mutações de ponto nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em indivíduos com presença de histórico familiar.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Selecionar e caracterizar as mutações de ponto nos genes *BRCA1* e *BRCA2* nos participantes da pesquisa com e sem origem Judaica *Ashkenazi*, selecionados pelo critério de histórico familiar para câncer de mama ou ovário hereditário.
- 2- Correlacionar a presença das mutações de ponto (mutações fundadoras) com dados clínicos como: idade do diagnóstico do tumor, idade do indivíduo no teste genético e o tipo de tumor nos indivíduos judeus *Ashkenazi* (JA) e indivíduos de outras ancestralidades (IOA).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de Estudo

Trata-se de um estudo observacional, transversal e retrospectivo sobre as mutações encontradas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* conforme disposto na Pesquisa em Genética Molecular Humana (Res. CNS 340, parágrafo II).

4.2 Amostra

A amostra do presente estudo constituiu-se pelos resultados obtidos através dos testes genéticos realizados nos indivíduos com mutações de ponto e histórico familiar para câncer de mama ou ovário hereditário. Os critérios adotados são da *American Society of Clinical Oncology* (1996):

- 4.2.1 Dois casos de câncer de mama e um ou mais tumores de ovário em qualquer faixa etária;
- 4.2.2 Mais de três casos de câncer de mama na família antes dos 50 anos de idade;
- 4.2.3 Familiares de primeiro grau com menos de 50 anos de idade que possuam histórico para dois tumores de mama, dois tumores de ovário, um caso de câncer de mama ou um caso de câncer de ovário;
- 4.2.4 Ocorrência de câncer de mama masculino;
- 4.2.5 Ocorrência de câncer de mama bilateral e ovário antes dos 50 anos de idade;
- 4.2.6 Mulher de origem Judaica *Ashkenazi*.

Os participantes da pesquisa foram agrupados em Judeus *Ashkenazi* (JA) e indivíduos de outras ancestralidades (IOA).

4.3 Coleta dos dados

Os dados empregados neste estudo provêm de 106 mutações de ponto, sendo, 104 mulheres e 2 homens, detectadas a partir da extração do DNA e armazenados no Laboratório de Pesquisa Experimental do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. As guardas obtidas provenientes de todas as amostras dos indivíduos de pesquisa e de seus familiares tiveram a autorização do

responsável (Res. CNS 196). Os dados clínicos, por sua vez, foram obtidos através da coleta dos dados armazenados na Clínica Paulista de Oncologia, após a autorização do diretor e responsável pela manipulação dos resultados obtidos durante as consultas pré e pós-testes realizadas (Res. CNS 196). A coleta dos dados somente teve início após a obtenção da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein.

Salientamos que aos familiares dos pacientes portadores de mutação nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* foi oferecida a pesquisa específica desta mutação. Todos os pacientes com indicação clínica receberam aconselhamento genético pré e pós-teste, sob a responsabilidade dos médicos assistentes responsáveis (Res. CNS 340, parágrafo III) que incluíram as seguintes orientações de acordo com a *American Society of Clinical Oncology*:

- 4.3.1 Informações específicas sobre o teste a ser realizado e sobre as possibilidades de se estimar o risco de câncer sem a realização do teste;
- 4.3.2 As implicações para o paciente e seus familiares, de um resultado positivo, negativo ou não informativo;
- 4.3.3 O grau de eficácia da técnica empregada;
- 4.3.4 O custo dos testes e do aconselhamento;
- 4.3.5 O sigilo acerca dos resultados;
- 4.3.6 O grau de risco em transmitir a mutação aos descendentes;
- 4.3.7 As possibilidades e limitações do acompanhamento médico após o teste.

4.4 Coleta do sangue e preparação das amostras

O sangue periférico (10 ml) foi coletado em tubos com EDTA e transferido para outro tubo graduado de 50 ml com 40 ml de tampão TE (Tris e EDTA). O tubo foi homogeneizado e centrifugado (Eppendorf 5810R, Hamburg, Alemanha, 2011) a 4400 rpm, por sete minutos. O sobrenadante foi desprezado e o restante utilizado. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, adicionando-se 20 ml e 15 ml de TE, respectivamente. O material resultante foi precipitado em 5 ml de TE, homogeneizado e armazenado em 5 tubos de 1,5 ml.

4.5 Extração do DNA

O DNA foi extraído dos leucócitos do sangue periférico utilizando-se o Gentra® Puregene® Blood Kit (QIAGEN, Califórnia, USA, 2007). O material foi transferido para um tubo de 15 ml, contendo 6 ml de solução de lise celular. Todo o material foi homogeneizado e incubado a 40 °C por aproximadamente 30 minutos. Uma solução para precipitação de proteínas foi adicionada à amostra (3 ml) que foi homogeneizada por 30 segundos e centrifugada por mais sete minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 6 ml de isopropanol a 100 % e misturado por inversão cerca de 50 vezes. Centrifugou-se a 2000 rpm por 5 minutos e desprezou-se o sobrenadante. Etanol a 70% foi misturado ao material (6 ml) por mais 3 minutos, e após nova centrifugação retirou-se com cuidado o sobrenadante. Após secar em temperatura ambiente por 20 minutos o DNA foi ressuspensionado em 250 µl de solução de hidratação e transferido para um tubo de 1,5 ml, onde foi armazenado a -80 °C. Posteriormente, realizou-se a quantificação do material pelo Nanovue (Ge Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA, 2011) em leituras a 260 e 280nm, respectivamente. A razão 260/280 nm foi cerca de 1,8 e a concentração expressa em ng/µL. Os DNAs foram diluídos nas concentrações de 40 ng/µL e depois armazenados a -20 °C.

4.6 Amplificação dos Fragmentos de DNA por PCR

As regiões codificantes dos genes *BRCA1* e *BRCA2* foram divididas em 31 e 44 fragmentos, respectivamente. Os fragmentos variaram entre 160 a 665 pb e foram amplificados utilizando-se a técnica de PCR. Para cada reação de PCR com volume total de 100 µL foram utilizados: tampão 10X (1,5 mM de MgCl); dNTP's a 100 µM, *Taq* DNA Polimerase 0,5U, iniciadores a 20 µM e DNA diluído a 40 ng/µL. Cada ciclo foi repetido por 39 vezes e os iniciadores utilizados flanquearam regiões intrônicas adjacentes às regiões codificantes de cada fragmento conforme descritos por Friedman e colaboradores (Friedman et al., 1994; 1997; *Breast Cancer Information Core*, 2011) com algumas alterações para otimizar a análise por dHPLC (Transgenomic®, Nebraska, USA, 2011). Os iniciadores utilizados são mostrados nos quadros 2A e 2B (anexo). Os resultados foram armazenados em planilhas, para análises e comparações estatísticas posteriores.

4.7 Rastreamento gênico e caracterização das mutações

As mutações foram identificadas e caracterizadas por uma combinação sequencial de rastreamento através da análise por Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance - *dHPLC* (Transgenomic®, Nebraska, USA) e posteriormente, pelo sequenciador automático por capilaridade *MegaBace 1000* (Ge Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA, 2011).

4.8 Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance (*dHPLC*)

O produto amplificado pela PCR foi analisado pelo *Wave Nucleic Acid Fragment Analysis System* (Transgenomic®, Nebraska, USA), que é um sistema de Cromatografia Líquida Desnaturante de Alta Performance utilizado para o rastreamento das mutações e polimorfismos por pareamento iônico.

As amostras são submetidas a um aquecimento de 95 °C por cinco minutos, e resfriadas gradativamente até a temperatura ambiente, possibilitando a formação das seguintes hibridações dos fragmentos (Figura 8).

Figura 8: Possíveis formações após o pareamento entre os alelos por *dHPLC*. O quadro 1 mostra a formação de homodúplex e a representação cromatográfica com um pico. O quadro 2 mostra a combinação de heterodúplex com a representação de dois picos, o primeiro de heterodúplex e o segundo de homodúplex.

- Heterodúplex: pareamento entre um alelo normal e um mutado quando a mutação ou polimorfismo está presente em heterozigose;
- Homodúplex: pareamento entre dois alelos normais.

Após as formações dos híbridos, as amostras foram analisadas pelo *dHPLC*. Antes da leitura da amostra no *dHPLC*, é necessário salientar que a sequência de cada fragmento (do iniciador senso até o iniciador antisenso) foi inserida na forma FASTA no diretório do computador ligado ao *dHPLC*. Para tanto, ele analisou alguns parâmetros (citados mais abaixo) para a determinação de temperaturas adequadas para a parcial desnaturação de cada um dos fragmentos estudados.

No cromatógrafo, 8 μ L de amostra de PCR foram injetados e transportados em tampão contendo íon trietilamônia (TEAA) e o solvente acetonitrila para a uma coluna (*DNASep[®] HT Cartridge*), formada pela matriz composta de micropartículas hidrofóbicas de poliestireno (Figura 9). A coluna, localizada dentro do forno, é aquecida a temperaturas pré-estabelecidas pelo programa *WaveMaker[®]* (Transgenomic[®], Nebraska, USA, 2011), baseando-se no número de pares de bases, sequência do amplicon e do conteúdo de C-G, promovendo a parcial desnaturação de cada amostra (Quadros 2A e 2B). Na primeira fase, o TEAA, que possui carga positiva e negativa, forma uma associação com o lado positivo ao DNA carregado negativamente e se adsorve às micropartículas da matriz da coluna. Uma espécie de ponte é formada entre o DNA e a matriz.

Figura 9: Coluna *DNASep[®] HT* onde a amostra é injetada e os fragmentos heteroduplexes e homoduplexes são detectados.

Na fase seguinte, a acetonitrila liberada no tampão promove o rompimento da ligação do DNA com a matriz da coluna. Como os heteroduplex se ligam fracamente à coluna eluem antes do que os homoduplex. Os fragmentos passam por um detector de ultravioleta que capta a intensidade de absorbância sobre o tempo de eluição, originando dois tipos de cromatogramas diferentes: a presença de um pico significa ausência de mutação ou polimorfismo, e gráficos complexos, com dois ou mais picos indicam a presença de um alelo normal e um mutado ou polimórfico (Figura 8). Os cromatogramas das amostras foram comparados aos cromatogramas controles, e as amostras que apresentaram perfis sugestivos no *dHPLC* foram posteriormente submetidas à caracterização por sequenciamento automático.

4.9 O Sequenciamento Automático

Este sequenciamento foi realizado a partir do produto de PCR purificado, utilizando-se o *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Ge Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA, 2011). As amostras foram sequenciadas no equipamento *MegaBace 1000*, utilizando-se o *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems* (Ge Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA, 2011). Após a purificação o produto foi quantificado no *Nanovue* em 260 e 280 nm, razão 1,8 e concentração expressa em ng/μL.

Para o cálculo da massa de DNA ideal para a reação, foi utilizada a seguinte fórmula: Massa do DNA (ng) = Comprimento total do DNA (em pares de base) x 0.1 (Ge Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA, 2011).

Para cada reação utilizaram-se 4 μL de Mix (fornecido pelo fabricante), 1 μL do iniciador em uma concentração de 5,0 pmol, água e DNA totalizando um volume final de 10 μL. As reações foram levadas ao termociclador, e submetidas a 25 ciclos conforme o programa: 95 °C por 20 segundos; 55 °C por 15 segundos; 60 °C por 1 minuto. Após a termociclagem, as amostras foram precipitadas conforme o protocolo fornecido: 1 μL de acetato de amônia a 7,5 M e 27,5 μL de álcool etílico a 100% misturados por inversão e centrifugados durante 40 minutos a 4400 rpm (Eppendorf 5810R, Hamburg, Alemanha, 2011). O sobrenadante foi retirado e 55 μL de álcool etílico a 70% foram adicionados e o material centrifugado novamente por 10 minutos a 4400 rpm (Eppendorf 5810R, Hamburg, Alemanha, 2011). O sobrenadante foi retirado e a amostra ressuspensa em alíquotas de 10 μL de tampão *Loading* fornecido pelo fabricante. Os parâmetros de corrida utilizados no equipamento *MegaBace* foram: 2 KV por 75 segundos, e 9 KV por 90 minutos.

As sequências senso e anti-senso de cada amplicon foram visualizadas com o programa *Chromas 2.33* (Technelysium Pty LTD., Tewantin, Austrália, 2011) e as amostras dos pacientes foram comparadas com as sequências dos nucleotídeos depositados no *Genbank*, *BRCA1* (U14680) e *BRCA2* (NM_000059) utilizando o programa *Lasergene 8.1* (DNASTAR inc., Madison, Wisconsin, USA).

5 RESULTADOS

Podemos observar que as maiores frequências de mutações encontradas no gene *BRCA1* foram as das mutações fundadoras 185delAG e 5382insC. Também notamos que o tipo de carcinoma mais diagnosticado dentre os indivíduos foi o de mama. Os valores mínimos de idade no teste (IT) e idade no diagnóstico do tumor (IDT) variaram entre os 30 anos e a máxima em torno dos 70 anos (tabela 3).

Tabela 3 - Mutações encontradas no gene *BRCA1* (n=32). Idade no teste (IT), idade no diagnóstico do tumor (IDT), tipo de tumor em Judeus *Ashkenazi* (JA)* e indivíduos de outras ancestralidades (IOA).

Código ID	Mutação	IT	IDT	Tipo de carcinoma
70	330 A>G (R71G)	47	Nd	Não afetada
20	2337 G>C (C740L)	75	73	ovário
24	5181delGTT (V1688del)	35	35	mama
31	4003 G>T (R1495M)	40	43	ovário
40	5083 del19	50	50	mama
75	589delCT (stop157)	39	38	mama
80	2157insCC (stop701)	56	58	ovário
86	2596delCA	34	37	mama
97	3137del4 (stop1022)	50	45	mama
98	IVS8-64delT	52	50	mama
100	220C/T	52	49	mama
101	S1613G	36	39	mama
106	S1613G	59	59	mama
1	5382insC	49	37	mama
7	5382insC*	44	46	ovário
15	5382insC*	62	36	mama
16	5382insC*	34	55	endométrio
8	4035delTT (Stop 1328)	32	Nd	ovário
11	185delAG*	66	57	ovário
12	185delAG*	53	51	mama
18	185delAG*	53	67	mama
19	185delAG*	56	43	mama
25	185delAG*	50	36	mama
28	185delAG	50	57	mama
46	185delAG*	47	46	mama
54	185delAG*	38	41	ovário
68	185delAG*	50	Nd	mama e ovário
69	185delAG*	75	Nd	Nd
74	185delAG*	Nd	Nd	Nd
85	185delAG*	30	31	mama
37	330 A>G (R71G)	Nd	Nd	Nd
67	330 A>G (R71G)	67	Nd	mama

Nd= não divulgado.

Em relação aos indivíduos que apresentaram mutações no gene *BRCA2*, foram observados dois casos da mutação fundadora 6174delT, assim como a mutação 7966 C>T. Houve o diagnóstico de dois casos de câncer masculino, e o carcinoma mais detectado foi de mama. As idades no IT e IDT variaram dos 30 aos 75 anos (tabela 4).

Tabela 4 - Mutações encontradas no gene *BRCA2* (n=22). Idade no Teste (IT), idade no diagnóstico do tumor (IDT), tipo de tumor em Judeus *Ashkenazi* (JA)* e indivíduos de outras ancestralidades (IOA).

Código ID	Mutação	IT	IDT	Tipo de carcinoma
3	6174delT*	42	44	mama
42	6174delT*	39	37	mama
4	10462 A>G (I3412V)	57	57	mama
5	9266 C>T (T3013I)	31	28	mama
9	3743 C>T (S1172L)	55	49	mama
17	2024del5 (stop 599)	53	46	mama
38	353 A>G (Y42C)	41	36	mama
43	7966 C>T (Q2580X)	Nd	Nd	mama masculino
44	7966 C>T (Q2580X)	50	36	mama
45	2509 T>C (Y761H)	Nd	42	mama e ovário
51	7907delTT (stop 2564)	40	36	mama
53	4742C>A (T1505N)	66	Nd	mama masculino
63	IVS2-7T>A	64	Nd	mama
65	384insALU	42	41	mama
79	7235 G>A (R2336H)	47	49	mama
82	2117 C>T (T630I)*	60	54	mama
87	6328 C>T (R2034C)	52	50	mama
94	4234insA (stop1337)	68	74	mama
99	V2171V	38	36	mama
103	K1183F	60	63	mama
104	T582P*	50	38	mama
105	4791G/A*	65	69	endométrio

Nd= não divulgado.

As idades dos indivíduos que não apresentaram mutações nos testes variaram dos 30 aos 72 anos (tabela 5). O carcinoma mais observado foi o de mama, assim como dois casos de câncer de mama masculino foram observados e um caso de carcinoma de trompa uterina.

Tabela 5 - Indivíduos que apresentaram resultados negativos no teste referente a *BRCA1* e *BRCA2* (n=52). Idade no teste (IT), idade no diagnóstico do tumor (IDT), tipo de tumor em Judeus *Ashkenazi* (JA)* e indivíduos de outras ancestralidades (IOA).

Código ID	IT	IDT	Tipo de carcinoma
2	37	32	mama
6*	78	72	mama
10	30	32	mama
13	42	42	mama
14*	42	43	ovário
21	46	45	mama
22	63	48	mama
23	64	Nd	mama masculino
26	53	32	mama
27*	69	53	mama
29	43	44	mama
30	61	60	mama
32	47	44	mama
33*	46	41	mama
34	56	53	mama
35	62	46	mama
36	57	37	mama
39*	44	37	ovário
41	57	61	mama
47*	49	Nd	Nd
48*	28	32	mama masculino
49	54	54	mama
50	44	42	mama
52	34	33	mama
55*	50	Nd	Nd
56	34	34	mama
57	49	Nd	Nd
58*	67	Nd	mama
59*	43	Nd	Nd
60	52	50	mama
61	56	Nd	Nd
62	45	Nd	mama
64	50	46	trompa uterina
66*	47	Nd	Nd
71	42	Nd	Nd
72	44	Nd	Nd
73	47	37	mama
76	58	58	mama
77	46	48	mama
78	57	54	mama
82*	60	54	mama
83	47	49	mama
84	38	39	mama
88	47	44	mama
89	58	63	mama
90	55	51	mama
91	52	53	mama
92	63	60	mama
93	50	54	mama
95	42	39	mama
96	44	44	mama

Nd= não divulgado.

Na figura 10 notamos que a percentagem de mutações encontradas no gene *BRCA1* foi maior do que no gene *BRCA2* e maior no grupo de indivíduos judeus *Ashkenazi* (JA). O grupo IOA apresentou 55,6% das mutações no gene *BRCA1* enquanto que 44,4% das mutações foram encontradas no gene *BRCA2*. No grupo JA, 73,7% das mutações foram encontradas no gene *BRCA1* e 26,3% pertenciam ao gene *BRCA2*.

Figura 10: Distribuição das mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* nos grupos de indivíduos de outras ancestralidades (IOA) e Judeus *Ashkenazi* (JA) .

A mutação fundadora 185delAG do gene *BRCA1* foi detectada em 41,4% dos indivíduos submetidos ao teste de BRCA ($p=0,002$). Os 58,6% dos indivíduos restantes não apresentaram esta mutação no gene *BRCA1* (Figura 11).

Figura 11: Distribuição da mutação 185delAG do gene *BRCA1* entre os indivíduos submetidos ao teste de *BRCA1* e *BRCA2*.

No grupo IOA, 96,3% dos indivíduos não apresentaram a mutação 185delAG. Neste mesmo grupo, 3,7% dos indivíduos apresentaram a mesma mutação. No grupo JA, esta mutação foi encontrada em 57,9% dos indivíduos ($p < 0,001$), enquanto que em 42,1% dos indivíduos deste grupo, esta mutação não foi encontrada (Figura 12).

Figura 12: Gráfico da distribuição da mutação 185delAG do gene *BRCA1* nos grupos de indivíduos de outras ancestralidades (IOA) e Judeus Ashkenazi (JA).

A distribuição das mutações fundadoras nos genes *BRCA1* e *BRCA2* está representada na figura 13. Podemos observar que as mutações fundadoras mais frequentes foram do gene *BRCA1* (185delAG e 5382isnC) 55,20% e a do gene *BRCA2* (6174delT) foram 11,80%. enquanto que 88,20% das mutações restantes encontradas neste gene eram de origens diversas ($p=0,004$).

Figura 13: Distribuição das mutações fundadoras encontradas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

As mutações fundadoras 185delAG, 5382insC (*BRCA1*) e 6174delT (*BRCA2*) foram também observadas em maior número no grupo JA, porém em menor quantidade no grupo de indivíduos de outras ancestralidades (IOA). Estas mutações foram encontradas em 84,2% nos JA, enquanto que 15,8% dos indivíduos deste grupo não apresentaram estas mutações ($p < 0,001$). No grupo IOA, as mutações fundadoras não estavam presentes em 92,6% dos indivíduos, porém, estas mutações foram detectadas em 7,4% dos indivíduos de outras ancestralidades (Figura 14).

Figura 14: Gráfico da distribuição das mutações fundadoras nos genes *BRCA1* e *BRCA2* nos grupos de indivíduos de outras ancestralidades (IOA) e Judeus Ashkenazi (JA).

Na figura 15 observamos que a mutação 330 A>G do gene *BRCA1*, ocorreu em 11,1% dos casos e a mutação 7966 C>T, do gene *BRCA2*, foi observada numa frequência de 7,4%.

Figura 15: Distribuição das mutações 330A>G do gene *BRCA1* e da mutação 7966C>T do gene *BRCA2*.

Na figura 16 observa-se que o carcinoma de mama foi o mais diagnosticado, tanto no grupo do gene *BRCA1* quanto no grupo do gene *BRCA2*. O carcinoma mais freqüente encontrado foi o carcinoma de mama, tanto em indivíduos que apresentaram mutações no gene *BRCA1*, quanto no gene *BRCA2*, 65,2% e 73,3%, respectivamente. O carcinoma de ovário foi o segundo tipo tumoral mais observado, porém sua freqüência foi maior nos sujeitos que apresentaram as mutações no gene *BRCA1*, 30,4% e no gene *BRCA2*, 6,7%. O carcinoma masculino foi detectado apenas em indivíduos que apresentaram mutações no gene *BRCA2*, e sua freqüência foi de 13,3%. Foram diagnosticados também carcinomas endométrioides, 4,3% e 6,7%, em indivíduos que apresentaram as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, respectivamente.

Figura 16: Distribuição dos tipos de tumores encontrados nos grupos de indivíduos de outras ancestralidades (IOA) e Judeus *Ashkenazi* (JA) nos genes *BRCA1* e *BRCA2*

Os carcinomas mais encontrados nos grupos IOA foram de mama (71,4%), ovário (19%) e câncer de mama masculino (9,5%). Neste grupo não houve casos de carcinoma endometrióide. No grupo JA observamos também que o carcinoma de mama foi o mais freqüente (64,7%), seguido do carcinoma de ovário (23,5%) e carcinoma endométrioide (11,8%). Neste grupo, não foi diagnosticado nenhum caso de carcinoma de mama masculino (Figura 17).

Figura 17: Gráfico da distribuição dos tipos de carcinomas encontrados nos grupos de indivíduos de outras ancestralidades (IOA) e Judeus *Ashkenazi* (JA).

E finalmente, dentre os 72 indivíduos que apresentaram testes negativos, observamos que o carcinoma de mama foi o mais freqüente nos dois grupos, JA e IOA, 94,3% e 75%, respectivamente. O carcinoma de ovário foi o segundo carcinoma mais observado no grupo JA. O carcinoma de mama masculino foi diagnosticado em maior número no grupo JA (12,5%) e o carcinoma de trompa uterina somente foi detectado no grupo IOA, 2,9% (Figura18).

Figura 18: Distribuição dos tumores entre os indivíduos de outras ancestralidades (IOA) e Judeus Ashkenazi (JA).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram utilizados 106 sujeitos de pesquisa com SMOH submetidos ao teste genético para a detecção de mutações de ponto, no período de 1998 a 2006, quanto aos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Todos os testes foram conduzidos no IIEPAE. A seleção dos indivíduos com relação à origem Judaica *Ashkenazi* fundamentou-se na declaração da etnia no momento da consulta pré-teste, como um dos fatores de inclusão para a realização do mesmo.

Considerando o total das mutações identificadas, observamos uma distribuição diferente das mutações entre os genes *BRCA1* e *BRCA2*. A ocorrência de 32 mutações no gene *BRCA1* foi mais alta quando comparada ao gene *BRCA2* (22 casos), nos dois grupos estudados: JA e IOA. No grupo JA, as mutações no gene *BRCA1* foram detectadas em maior número quando comparadas ao gene *BRCA2*, enquanto que no grupo IOA a distribuição das mutações nos dois genes foi muito semelhante. A mutação fundadora do gene *BRCA1*, 185delAG, foi responsável pela frequência de 41% do total das mutações identificadas neste gene e diferiu significativamente em relação às mutações encontradas no gene *BRCA2* ($p < 0,002$). No grupo JA esta mutação ocorreu em 58% dos casos ($p < 0,001$) e em 4% no grupo IOA.

Desde a década de 90, novas investigações mostraram uma frequência elevada quanto à mutação fundadora 185delAG na população JA. Outro estudo de Struwing et al. (1995) detectou esta mutação em aproximadamente 1%, dentre 858 indivíduos Judeus *Ashkenazi*. Em 1996 Roa e colaboradores identificaram dentre 3000 JA uma frequência de similar da mutação 185delAG nestes indivíduos. Porém, em nosso estudo, esta mutação fundadora também ocorreu no grupo de indivíduos sem a ancestralidade judaica *Ashkenazi*. O fato chamou a atenção, pois estudos com populações não judaicas revelaram que esta mutação ocorreu somente em populações de relativo isolamento genético e endogamia, como por exemplo, no estudo no qual a mutação 185delAG foi detectada em duas mulheres: únicas ciganas de origem espanhola presentes nesta investigação genética realizada em 1998. As mutações foram detectadas nestas mulheres dentre 160 mulheres com histórico familiar para SMOH. Além disso, estas amostras mutadas compartilhavam alelos marcadores presentes em amostras de Judeus com a mutação 185delAG. O resultado indica que provavelmente esta mutação foi transferida para esta população cigana pelos Judeus já que estes se estabeleceram primeiramente nos países do Mediterrâneo (Díez et al., 1998). A presença desta mutação foi igualmente

descoberta em indivíduos de origem marroquina e em 150 Judeus iranianos (Bar-Sade *et al.*, 1998). Posteriormente em 2003, em um estudo com 19 indivíduos na pequena cidade de São Luis Valley, nos estado do Colorado (EUA), observaram-se 6 casos da mutação 185delAG, do total de 10 mutações encontradas, e todos os participantes eram de origem latina/espanhola, sem ancestralidade judaica (Mullineaux *et al.*, 2003).

As mutações fundadoras 185delAG e 5382insC no gene *BRCA1* foram responsáveis por uma freqüência de 55% significativamente maior ($p < 0,004$) do que a freqüência da mutação fundadora 6174delT (12%) no gene *BRCA2*. Dos indivíduos que apresentaram mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, cerca de 84% ($p < 0,001$) eram mutações fundadoras (185delAG, 5382insC e 6174delT) detectadas no grupo JA. As mutações diversas neste grupo foram de 16%. No grupo IOA, as mutações fundadoras 185delAG e 5382insC ocorreram em 7,4% dos casos. Novamente identificamos mutações que são reconhecidamente associadas aos Judeus de origem *Ashkenazi*. Ao compararmos os resultados de Roa e colaboradores em 1996 com o presente trabalho, temos que cerca de 1050 indivíduos controle (sem ancestralidade judaica) foram rastreados no que se refere às mutações 185delAG e 5382insC. Os resultados indicam que dos 72 indivíduos sem origem judaica do nosso estudo, 3% apresentam mutações fundadoras identificadas em relação ao estudo de Roa ($p < 0,001$). É importante salientar que o outro estudo não detectou nenhuma destas mutações no seu grupo controle (Figura 19).

Figura 19: Comparação entre os resultados do presente trabalho e Roa *et al.*, 1996.

No Brasil, três estudos genéticos no mesmo âmbito foram realizados entre os anos de 2003 e 2005. Entretanto, nenhum estudo foi realizado em população com etnia judaica e na sua maioria foram realizados para identificar especificamente as mutações fundadoras na população de determinados estados do país. Em outra pesquisa foram estudados outros 31 casos de mulheres com história positiva para câncer de mama e/ou ovário, tendo sido observadas quatro mutações, dentre estas apenas uma mutação fundadora, 5382insC (Dufloth et al., 2005). Dois anos depois, conduziu-se um estudo com 402 mulheres também com história familiar positiva e foram identificadas ao todo apenas nove mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. A mutação 5382insC foi identificada em seis casos (Gomes et al., 2007). E em 2009, 612 indivíduos foram submetidos ao testes de *BRCA* e foram demonstradas neste estudo 21 mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, sendo que dentre estas, quatro foram 5382insC e duas foram 185delAG (Esteves et al., 2009).

Devemos salientar que em nosso estudo, de 106 indivíduos, encontramos 54 mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, o que representa cerca de 51% das mutações identificadas. Dentre estas, cerca de 92% são mutações fundadoras, tanto do gene *BRCA1* quanto do gene *BRCA2*, nos dois grupos estudados, JA (84,2%) e IOA (7,4%). A mutação 6174delT foi encontrada apenas no grupo JA numa frequência de 12% (figura 13), o que é um dado esperado, já que a mutação fundadora fora identificada em dois importantes trabalhos anteriores ligados aos Judeus (Struewing et al., 1995; Neuhausen et al., 1996). Comparativamente em relação ao número de participantes, o presente estudo obteve uma frequência significativa.

Ainda com relação a estas mutações, o estudo de Neuhausen e colaboradores investigou 107 mulheres Judias *Ashkenazi*, e identificou 8 mutações do tipo 6174delT (Neuhausen et al., 1996). No início do século XXI, foi realizado o rastreamento das três mutações fundadoras *Ashkenazi* em cerca de 380 mulheres chilenas com história de câncer de mama familiar, e nenhuma das mutações 5382insC e 6174delT foram identificadas (Jara et al., 2002). Outras duas mutações também foram observadas com uma frequência maior em relação ao total de mutações deste trabalho, a 330A>G do gene *BRCA1* e a 7966C>T do gene *BRCA2*, sendo que estas mutações estiveram presentes somente no grupo IOA.

A mutação *missense* 330A>G, caracteriza-se pela mudança do aminoácido arginina pela glicina e foi primeiramente detectada em 1999 no probando de uma

família. Neste trabalho foram estudadas 83 famílias espanholas (um probando para cada família) e 100 controles, nos quais esta mutação não foi detectada (Diez et al., 1999). Noutro estudo realizado em famílias com câncer de mama em diferentes centros como França, Espanha e Reino Unido, mostrou-se que esta mutação foi independentemente identificada em 6 famílias, todas com ancestralidade espanhola (Vega et al., 2001). Este achado também foi confirmado em uma investigação com mais de 400 famílias com história positiva, onde sete famílias apresentaram esta mutação, todas originadas da Galícia (Diez et al., 2003). Os resultados de estudos de haplótipos foram consistentes com o fato de que a mutação 330A>G é uma mutação fundadora de origem espanhola (Vega et al., 2001). Demonstrou-se também que as famílias portuguesas carregam a variante 330A>G.

Em duas famílias portuguesas e uma portuguesa de origem galega, todas informativas, notou-se que os mRNAs analisados apresentaram dois transcritos alternativos, tanto nos portadores desta mutação quanto nos controles. Um haplótipo foi segregado nas duas famílias portuguesas e na de origem galega. Então, o surgimento de transcritos alternativos pode ser o provável mecanismo que causa SMOH associado à mutação 330A>G, bem como, indicam um ancestral comum entre as famílias portuguesas e galegas compartilhando esta mutação (Santos et al., 2009).

A mutação *nonsense* 7966C>T, que resulta na troca do aminoácido glicina e causa uma interrupção na leitura do mRNA, foi primeiramente depositada no BIC, pelo nosso grupo e foi mencionada em um trabalho italiano. O estudo de caso para dupla heterozigose nos dois genes, *BRCA1* e *BRCA2*, observou esta mutação em uma mulher italiana sem origem Judaica *Ashkenazi*, diagnosticada com câncer de mama aos 37 anos. Sua mãe foi diagnosticada precocemente com câncer de mama, porém, nenhum outro parente foi observado com a mesma doença (Musolino et al., 2005). Coincidentemente, em nosso estudo uma das pacientes que apresentou esta mutação 7966C>T foi diagnosticada com câncer de mama aos 36 anos de idade. Também observamos uma maior quantidade de câncer de mama diagnosticada em indivíduos tanto nos grupos JA (65%) quanto no grupo IOA (71%) em relação aos outros tipos de tumor, e que de forma semelhante, apresentaram mutações nos genes *BRCA1* (65%) e *BRCA2* (73%).

Por outro lado, o câncer de ovário, o segundo tumor mais detectado, foi diagnosticado nos indivíduos que apresentaram mais mutações no gene *BRCA1* (30

%) do que no gene *BRCA2* (7%), porém sua distribuição nos grupos JA (24%) e IOA (19%) foi similar. Os riscos para o desenvolvimento do câncer de mama em portadores de mutações no gene *BRCA1* é de 50% a 70%, e para o câncer de ovário é de 30% a 40%. Para o gene *BRCA2* estas taxas são de 40% a 50% para o câncer de mama, e 10% a 15% para o desenvolvimento de câncer de ovário (Antoniou et al., 2003). Podemos afirmar ainda que o risco para os portadores de mutações no gene *BRCA1* manifesta-se mais em mulheres com cânceres de mama e ovário, enquanto que as mutações no gene *BRCA2* apresentam risco elevado para o desenvolvimento de outros tipos de câncer, como CMM, câncer de pâncreas e próstata (Antoniou et al., 2003).

O pesquisador Esteban Cardeñosa et al. (2010) sugerem que as taxas de risco para o desenvolvimento do câncer de mama e ovário têm divergido muito ao longo dos estudos realizados: 87% a 84% para câncer de mama e 44% a 27% para câncer de ovário (Ford et al., 1994, 1998) enquanto trabalhos mais recentes apontam 65% a 45% para câncer de mama e 39% a 11% para câncer de ovário (Antoniou e Easton, 2003). Porém estes dados, mesmo que divergentes entre si, são compatíveis com os nossos, já que o diagnóstico foi maior para o câncer de mama nos dois grupos, JA e IOA.

O CMM foi diagnosticado no trabalho atual somente no grupo IOA, 9,5%, e apenas nos portadores de mutação no gene *BRCA2* (13%). A associação entre o gene *BRCA1* e CMM não é tão forte, se comparado ao gene *BRCA2*. O risco para o desenvolvimento do CMM em um portador de mutação no gene *BRCA2* é de cerca de 7%, ou seja, 80 a 100 vezes mais alto do que para a população em geral (Liede et al., 2004; Levy-Lahad e Friedman, 2007; Daly, 2009). Estima-se que 4% a 40% dos pacientes CMM carreguem uma mutação no gene *BRCA2* (Giordano et al., 2004; Friedman et al., 1997; Thorlacius et al., 1997). Assim, os dados de CMM de nosso trabalho tornam-se importantes, já que nenhum trabalho realizado no Brasil apresentou resultados de CMM, e poucos estudos no mundo foram realizados e apresentaram dados sobre este carcinoma. Por fim, detectamos o carcinoma endometrióide dentre os indivíduos que apresentaram mutações nos genes *BRCA1* (4%) e *BRCA2* (7%), e todos os casos foram de indivíduos pertencentes ao grupo JA. Dentre a variedade de câncer ginecológico que não o de ovário, há vários relatos de casos de carcinoma nas trompas de Falópio que ocorrem em portadores de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (Schubert et al., 1997; Zweemer et al., 2000;

Rose et al., 2000). Entretanto, as perdas somáticas do alelo selvagem dos genes *BRCA* e suas similaridades fisiopatológicas com os tumores de trompa de Falópio e de ovário, suportam a idéia de uma relação etiológica entre estes tumores com a mutação nos genes *BRCA* (Levine et al., 2001).

De forma similar ao carcinoma de trompa de Falópio, tem sido relatada a associação com o carcinoma de endométrio e os genes *BRCA*. Em um trabalho efetuado no ano de 1999, duas irmãs Judias *Ashkenazi* que apresentaram a mutação fundadora 5382insC foram diagnosticadas, respectivamente, com carcinoma de endométrio e carcinoma de ovário, sendo que, em ambos os casos para os dois tumores houve perda de heterozigose na região do gene *BRCA1* (Hornreich et al., 1999). Na presente investigação, obtivemos o diagnóstico de um caso de carcinoma de endométrio, em uma paciente de origem *Ashkenazi*, portadora da mutação 5382insC, porém, infelizmente os testes para detectar a perda de heterozigose no gene *BRCA1* não puderam ser realizados.

Um aspecto relevante nesta abordagem e que devemos considerar são os resultados dos indivíduos (n=52) que foram submetidos ao teste de *BRCA*, com história positiva para câncer, mas não apresentaram as mutações esperadas. Na distribuição dos tumores diagnosticados nestes indivíduos, notamos uma maior frequência de carcinoma de mama nos dois grupos, JA 75% e IOA, 94%. Também chamamos a atenção para as frequências, ainda que inferiores, nos diagnósticos para câncer de ovário e CMM, cada um com 12,5% de ocorrência no grupo JA.

Há uma gama de estudos publicados que tentam explicar o fato de que os indivíduos com histórico positivo e muitas vezes com o tumor diagnosticado, obtêm resultados negativos para o teste genético. Todos os testes para os genes *BRCA* têm a finalidade de permitir a identificação de mulheres que possuem alto risco para o desenvolvimento do câncer de mama e ovário, com conseqüentes alterações na conduta clínica. Outra característica que podemos ressaltar em relação aos testes genéticos desses genes, é a identificação dos indivíduos que foram negativos, mas que possuíam uma mutação conhecida por estar segregada naquela determinada família. Um indivíduo que é submetido ao teste de *BRCA*, proveniente de uma família com uma mutação conhecida e obtém um resultado negativo, tem sido por muito tempo considerado como um 'negativo verdadeiro', e é informado de que possui um risco similar ao da população em geral para o desenvolvimento do câncer de mama e ovário (Domchek et al., 2010). Porém, em dois outros estudos, relatou-

se que uma proporção substancial do risco em famílias com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* seria devido, além das próprias mutações nestes genes, a um conjunto de genes ‘modificadores’ (Nathanson et al., 2002; Kadouri et al., 2004). Esta hipótese poderia justificar o fato de que membros de famílias com alto risco para câncer de mama e ovário na realidade possuem o mesmo nível de risco, apesar dos testes negativos (Evans et al., 2004). Em 2007, Smith e colaboradores identificaram fenocópias de 277 famílias com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e calcularam os riscos para o câncer de mama em indivíduos testados negativos que possuíam uma mutação patogênica na família. A definição para fenocópias seria algo como as mulheres que apresentam o fenótipo para câncer de mama mas não possuem o genótipo (mutação em *BRCA1* e *BRCA2*) e estas seriam resultantes de causas ambientais ou ainda de outra mutação de alto risco na família como certos vieses ou mesmo a presença de genes modificadores. Neste estudo, alegou-se que estas mulheres que tiveram testes negativos possuíam risco aumentado para o câncer de mama.

Vários estudos de famílias onde as mutações em *BRCA1* e *BRCA2* não foram identificadas mostraram que ocorreu uma mutação no gene *RAD51*, onde as duas proteínas de *BRCA* interagem. Sem dúvida, os portadores de mutações em *BRCA2* apresentam um risco muito maior para o câncer de mama se carregarem não só a mutação em *BRCA2* mas também uma mutação no gene *RAD51* (Kadouri et al., 2004).

A presença de um gene chamado *BRCA3*, com uma penetrância estimada em 42% ou mesmo um modelo poligênico - genes modificadores que potencializariam o efeito da mutação em indivíduos positivos e negativos – também foi um modelo proposto (Antoniou et al., 2001). Mais recentemente, Domchek et al. (2010) acompanharam cerca de 400 indivíduos ‘negativos verdadeiros’, e não observaram nenhum aumento no risco para o desenvolvimento de câncer de mama invasivo. Não houve casos de câncer de ovário e 9 indivíduos desenvolveram outros tipos de câncer, como pele, tireóide, melanoma, linfoma não-Hodgkin e câncer renal. O risco calculado para o carcinoma de mama *in situ* foi muito menor do que no estudo citado anteriormente. Por um lado há dados ainda divergentes, por outro, devemos considerar de grande importância a identificação dos ‘negativos verdadeiros’, pois influenciam nas recomendações clínicas e evitam estratégias de rastreamento caras e desnecessárias para ao paciente.

Importante salientar que variações nas técnicas moleculares empregadas certamente afetam o número de mutações detectadas. Em nosso caso, foi utilizada a combinação das técnicas de rastreamento por *dHPLC* e posterior sequenciamento, sendo este até então, o procedimento mais utilizado pela questão de tempo de entrega dos resultados e custo total do procedimento. Analisando trabalhos mais recentes, estudos de rastreamento nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em populações diversas, podemos observar uma maior utilização de sequenciamento direto dos fragmentos associados à métodos de detecção de grandes deleções ou inserções como por exemplo, a técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* - *MLPA* (Negura et al., 2010; Iyevleva et al., 2010; Dobricié et al., 2010; Konecny et al., 2011). A técnica de *MLPA* (MRC-Holland, Amsterdã, Holanda, 2011) é baseada na detecção dos números de cópias aberrantes dentre mais de 45 seqüências específicas amplificadas em uma única reação de *PCR*, utilizando-se um único par de iniciador na reação. Porém, por uma questão de custo operacional e implementação da estrutura para a utilização deste método, tornou-se pouco difundido fora da Europa. Outro fator importante que podemos destacar é a discrepância de resultados que são provenientes da inabilidade dos métodos de detecção de mutação, como, por exemplo, a técnica de *PCR* na detecção das grandes deleções e rearranjos no DNA. Sabe-se ainda que os rearranjos genômicos no gene *BRCA1* ocorrem e são identificados numa taxa de 1% a 5% nas famílias com história positiva e alta predisposição genética. Estes rearranjos são responsáveis por 8% a 19% de todas as mutações encontradas no gene *BRCA1* (Puget et al., 1999; Petrij-Bosch et al., 1997; Gad et al., 2002; Agata et al., 2006; Ramus et al., 2007; Woodward et al., 2005; Palma et al., 2008). O fato de não empregarmos neste estudo técnicas concomitantes à investigação das mutações pelos métodos de rastreamento por *dHPLC* e posterior sequenciamento, pode ter influenciado no número de mutações totais detectadas. Alterações em seqüências intrônicas e promotoras não estudadas no presente trabalho e na literatura também pode ter influenciado na percentagem de mutações detectadas.

De forma mais geral, vários avanços importantes para o entendimento da patogênese dos vários tipos de câncer associados aos genes *BRCA*, têm sido consequência principal das importantes elucidações nas funções celulares dos genes *BRCA1* e *BRCA2* e suas diversas funções na biologia molecular. Entretanto, este conhecimento ainda permanece incompleto e a perspectiva para obtermos um

tratamento realmente efetivo e preventivo câncer nos portadores das mutações nos genes *BRCA* ainda é uma realidade a ser considerada distante.

7 CONCLUSÃO

A população brasileira, excetuando-se as populações de determinadas etnias ou grupos específicos declarados, é formada por indivíduos com origem ancestral diversificada. Como conta a história, é resultante em sua maioria pelas colonizações européias, escravidão e imigração de indivíduos de diversas regiões do mundo, que acabaram por miscigenar e estruturar o padrão populacional atual. Ao pensar neste fato e comparar os resultados dos estudos citados com os nossos, podemos sugerir de maneira decisiva a inclusão das mutações 330A>G, 7966C>T e a inserção das mutações fundadoras 185delAG, 5382insC e 6174delT na rotina de rastreamento dos testes genéticos. Isto deve ser considerado principalmente, quando realizados em probandos de ancestralidade indefinida, paralelamente ao rastreamento dos genes *CHECK2* e a verificação dos rearranjos no gene *BRCA1* com predisposição para SMOH. A presente conduta economizaria tempo e diminuiria o custo para a realização desnecessária de um teste genético completo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

Adank MA, Brogi E, Bogomolny F, Wadsworth EA, Lafaro KJ, Yee CJ, Kirchhoff T, Meijers-Heijboer EJ, Kauff ND, Boyd J, Offit K. Accuracy of BRCA1 and BRCA2 founder mutation analysis in formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) tissue. *Am J Cancer*. 2006;5(4):337-42.

Aida H, Takakuwa K, Nagata H, Tsuneki I, Takano M, Tsuji S, Takahashi T, Snoda T, Hatae M, Takahashi K, et al. Clinical features of ovarian cancer in Japanese women with germ-line mutations of BRCA1. *Clin Cancer Res*. 1998;4:235-40.

Agata S, Viel A, Della Puppa L, Cortesi L, Fersini G, Callegaro M, Dalla Palma M, Dolcetti R, Federico M, Venuta S, Miolo G, D'Andrea E, Montagna M. Prevalence of BRCA1 genomic rearrangements in a large cohort of Italian breast and breast/ovarian cancer families without detectable BRCA1 and BRCA2 point mutations. *Genes Chromosomes Cancer*. 2006;45:791-7.

Agrawal A, Ayantunde AA, Rampaul R and Robertson JF: Male breast cancer: a review of clinical management. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;103:11-21.

American Cancer Society. What are the risk factors for breast cancer? Available from: <http://www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/DetailedGuide/breast-cancer-risk-factors>. [2007 June 11].

American Medical Association. Family medical history in disease prevention. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/physician-resources/medical-science/genetics-molecular-medicine/family-history.shtml>. [2007 June 11].

American Society of Clinical Oncology: Statement of the American Society of the Clinical Oncology. Genetic Testing for Cancer Susceptibility. *Journal of Clinical Oncology*. 1996 (A);14:1730-6.

Anderson WF, Jatoi I, Tse J and Rosenberg PS: Male breast cancer: A population-based comparison. *J Clin Oncol*. 2010;28: 232-9.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from <http://icmje.org> [2007 May 22].

Antoniou AC, Easton DF. Polygenic inheritance of breast cancer: Implications for design of association studies. *Genet Epidemiol.* 2003;25(3):190-202.

Antoniou AC, Gayther SA, Stratton JF, Ponder BAJ, Easton DF. Risk models for familial ovarian and breast cancer. *Genet Epidemiol.* 2000;18:173–90.

Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G, Day NE, Ponder BA, Easton D. Evidence for further breast cancer susceptibility genes in addition to BRCA1 and BRCA2 in a population-based study. *Genet Epidemiol.* 2001;21:1–18.

Antoniou AC, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, Tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjakoski K, Kallioniemi OP, Thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG, Easton DF. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* 2003;72:1117–30.

Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev.* 2001;22:255–88.

Bar-Sade RB, Kruglikova A, Modan B, Gak E, Hirsh-Yechezkel G, Theodor L, Novikov I, Gershoni-Baruch R, Risel S, Papa MZ, Ben-Baruch G, Friedman E. The 185delAG BRCA1 mutation originated before the dispersion of Jews in the diaspora and is not limited to Ashkenazim. *Hum Mol Genet* 1998;5:801–5.

Batzer M. A. Deininger P. L. Alu Repeats and Human Genomic Diversity. *Nature Reviews: Genetics.* 2002;3:370-9.

Beckmann WM, Niederacher D, Schnürch H-G, Gusterson BA, Bender HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med.* 1997;75:429–39.

Ben David Y, Chetrit A, Hirsh-Yechezkel G, Friedman E, Beck BD, Beller U, Ben-Baruch G, Fishman A, Levavi H, Lubin F, et al. Effect of BRCA mutations on the length of survival in epithelial ovarian tumors. *J Clin Oncol.* 2002;20:463–6.

Bewtra C, Watson P, Conway T, Read-Hippee C, Lynch HT. Hereditary ovarian cancer: a clinicopathological study. *Int J Gynecol Pathol.* 1992;11:180–7.

Bignon YJ, Eeles RA, Eason, DF, Ponder BAJ, Eng C. Biological basis of cancer predisposition. Genetic Predisposition to câncer. 2^o ed. London: Arnold; 2004;11-20.

Boyd J. Molecular genetics of hereditary ovarian cancer. *Oncology*.1998;12:399–406.

Boyd J, Sonoda Y, Federici MG, Bogomolnii F, Rhei E, Maresco DL, Saigo PE, Almadrones LA, Barakat RR, Brown CL, Chi DS, Curtin JP, Poynor EA, Hoskins WJ. Clinicopathologic features of BRCA-linked and sporadic ovarian cancer. *JAMA*. 283; 2000:2260–5.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. 2009; Rio de Janeiro: INCA; 2009. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/controle_cancer. [14 jan. 2011].

Brinton LA, Carreon JD, Gierach GL, McGlynn KA and Gridley G: Etiologic factors for male breast cancer in the U.S. Veterans Affairs medical care system database. *Breast Cancer Res Treat*. 2010:185-92.

Brinton LA, Richesson DA, Gierach GL, Lacey JV Jr, Park Y, Hollenbeck AR, Schatzkin A. Prospective evaluation of risk factors male breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2008:1477-81.

Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, Stopfer JE, Nathanson KL, Weber BL. Cancer risk estimates for BRCA1 mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst*. 2002:1365-72.

Carmichael AR, Bendall S, Lockerbie L, Prescott RJ, Bates T. Does obesity compromise survival in women with breast cancer? *Breast*. 2004;13:93-6.

Cass I, Baldwin RL, Varkey T, Moslehi R, Narod SA, Karlan BY. Improved survival in women with *BRCA*-associated ovarian carcinoma. *Cancer*. 2003; 97:2187–95.

Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer*. 1996;77:2318–24.

Chetrit A, Hirsh-Yechezkel G, Ben-David Y, Lubin F, Friedman E, Sadetzki S. Effect of BRCA1/2 mutations on long-term survival of patients with invasive ovarian cancer: the national Israeli study of ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26:20–5.

Contractor KB, Kaur K, Rodrigues GS, Kulkarni DM and Singhal H. Male breast cancer: is the scenario changing. *World J Surg Oncol*. 2008;6:58.

Czene K, Bergqvist J, Hall P, Bergh J. How to treat male breast cancer. *Breast*. 2007;16:S147-S154.

Daly MB. The impact of social roles on the experience of men in *BRCA1/2* families: implications for counseling. *J Genet Couns* 2009;18:42-8.

Díez O, Doménech M, Alonso MC, Brunet J, Sanz J, Cortés J, del Río E, Baiget M. Identification of the 185delAG *BRCA1* mutation in a Spanish Gypsy population. *Hum Genet*. 1998;103(6):707-8.

Díez O, Cortés J, Doménech M, Brunet J, Del Río E, Pericay C, Sanz J, Alonso C, Baiget M. *BRCA1* mutation analysis in 83 Spanish breast and breast/ovarian cancer families. *Int J Cancer*. 1999;83(4):465-9.

Díez O, Osorio A, Durán M, Martínez-Ferrandis JI, de la Hoya M, Salazar R, Vega A, Campos B, Rodríguez-López R, Velasco E, Chaves J, Díaz-Rubio E, Jesús Cruz J, Torres M, Esteban E, Cervantes A, Alonso C, San Román JM, González-Sarmiento R, Miner C, Carracedo A, Eugenia Armengod M, Caldés T, Benítez J, Baiget M. Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects.. *Hum Mutat*. 2003;22(4):301-12.

Dobricić J, Branković-Magić M, Filipović S, Radulović S. Novel *BRCA1/2* mutations in Serbian breast and breast-ovarian cancer patients with hereditary predisposition. *Cancer Genet Cytogenet*. 2010;202(1):27-32.

Domchek SM, Gaudet MM, Stopfer JE, Fleischaut MH, Powers J, Kauff N, Offit K, Nathanson KL, Robson M. Breast cancer risks in individuals testing negative for a known family mutation in *BRCA1* or *BRCA2*. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;119(2):409-14.

Duflath RM, Carvalho S, Heinrich JK, Shinzato JY, dos Santos CC, Zeferino LC, Schmitt F. Analysis of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. *Sao Paulo Med J*. 2005;123:192–7.

Easton DF, Ford D, Bishop DT. The Breast Cancer Linkage Consortium. Breast and ovarian cancer incidence in *BRCA1* mutation carriers. *Am J Hum Genet*. 1995;56:265–71.

Easton DF, Steele L, Fields P, Ormiston W, Averill D, Daly PA, McManus R, Neuhausen SL, Ford D, Wooster R, Cannon-Albright LA, Stratton MR, Goldgar DE. Am J Hum Genet. 1997;61:120–8.

Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP. The Breast Cancer Linkage Consortium. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. Am J Hum Genet. 1993;52:678–701.

Easton DF, Ford D, Bishop DT. The Breast Cancer Linkage Consortium. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. Am J Hum Genet. 1995; 56:265–71.

Edwards QT, Seibert D, Maradiegue, A, MacDonald, D, Lowstuter K, Weitzel. Breast cancer and the family tree. An issue for all practice settings. Advance for Nurse Practicals. 2007;15(5):34-42.

Elazar, DJ. Can Sephardic Judaism be reconstructed? Jerusalem Center for Public Affairs. Available from: <http://www.jcpa.org/dje/articles3/sephardic.htm>. [2001 Jan. 14].

Esteban Cardeñosa E, Bolufer Gilabert P, de Juan Jiménez I, Palanca Suela S, Barragán González E, González Anguix V, Lerma Alejos E, Chirivella González I, Segura Huerta A, Guillén Ponce C, Martínez de Dueñas E, Cuevas Cuerda D, Salas Trejo D; Group for Assessment for Hereditary Cancer of Valencian Community. Relationship of BRCA1 and BRCA2 mutations with cancer burden in the family and tumor incidence. Fam Cancer. 2010;9(3):291-5.

Esteves VF, Thuler LC, Amêndola LC, Koifman RJ, Koifman S, Frankel PP, Vieira RJ; Brazilian Network of Breast and Ovarian Familial Cancer Aggregation. Braz J Med Biol Res. 2009;42(5):453-7.

Evans DG, Neuhausen SL, Bulman M, Young K, Gokhale D, Lalloo F. Haplotype and cancer risk analysis of two common mutations, BRCA1 4184del4 and BRCA2 2157delG, in high risk northwest England breast/ovarian families. J Med Genet. 2004;41(2):e21.

Fentiman IS, Fourquet A and Hortobagyi GN: Male breast cancer. Lancet. 2006;367: 595-604.

Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Breast Cancer Linkage Consortium. Risks of cancer in *BRCA1*-mutation carriers. *Lancet*. 1994;343:692–5.

Ford D, D F Easton, M Stratton, S Narod, D Goldgar, P Devilee, D T Bishop, B Weber, G Lenoir, J Chang-Claude, H Sobol, M D Teare, J Struwing, A Arason, S Scherneck, J Peto, T R Rebbeck, P Tonin, S Neuhausen, R Barkardottir, J Eyfjord, H Lynch, B A Ponder, S A Gayther, M Zelada-Hedman and the Breast Cancer Linkage Consortium. Genetic Heterogeneity and penetrance analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer families. *American Journal of Human Genetics*. 1998; 62(3):676-89.

Friedenson B. The *BRCA1/2* pathway prevents hematologic cancers in addition to breast and ovarian cancers. *BMC Cancer*. 2007;7:152-63.

Friedenreich, CM, Orenstein, MR. Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *Journal of Nutrition*. 2002;132:2456S-64S.

Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King MC. Confirmation of *BRCA1* by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet*. 1994;8(4):399-404.

Friedman LS, Gayther SA, Kurosaki T, Gordon D, Noble B, Casey G, Ponder BA, Anton-Culver H. Mutation analysis of *BRCA1* and *BRCA2* in a male breast cancer population. *Am J Hum Genet*. 1997;60:313-19.

Gad S, Caux-Moncoutier V, Pages-Berhouet S et al. Significant contribution of large *BRCA1* gene rearrangements in 120 French breast and ovarian cancer families. *Oncogene*. 2002;21:6841-7.

Garber JE. Hereditary Cancer Predisposition Syndrome. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(2):276-92.

Giordano SH, Cohen DS, Buzdar AU, Perkins G and Hortobagyi GN: Breast carcinostudy. *Cancer*. 2004;101:51-7.

Gomes MC, Costa MM, Borojevic R, Monteiro AN, Vieira R, Koifman S, Koifman RJ, Li S, Royer R, Zhang S, Narod SA. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;103(3):349-53.

Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of Early-Onset Familial Breast Cancer to Chromosome 17q21. *Science*. 1990;250:1684-9.

Hansen J. Elevated risk for male breast cancer after occupational exposure to gasoline and vehicular combustion products. *American Journal of Industrial Medicine*. 2000;37:349-52.

Harvie M, Howell T. Need for weight management among postmenopausal early breast cancer patients receiving adjuvant endocrine therapy. *Womens Health*. 2005;1(2):205-22.

Hill DA, Gilbert E, Dores GM, Gospodarowicz M, van Leeuwen FE, Holowaty E, Glimelius B, Andersson M, Wiklund T, Lynch CF, Van't Veer M, Storm H, Pukkala E, Stovall M, Curtis RE, Allan JM, Boice JD, Travis LB. Hill DA, Gilbert E, Dores GM, Gospodarowicz M, van Leeuwen FE, Holowaty E, Glimelius B, Andersson M, Wiklund T, Lynch CF, Van't Veer M, Storm H, Pukkala E, Stovall M, Curtis RE, Allan JM, Boice JD, Travis LB. Breast cancer risk following radiotherapy for Hodgkin lymphoma: modification by other risk factors. *Blood*. 2005;106(10):3358-65.

Hines SL, Tan W, Larson JM, Thompson KM, Jorn HK, Files JA. A practical approach to guide clinicians in the evaluation of male patients with breast masses. *Geriatrics*. 2008;63(6):19-24.

Hines LM, Risendal B, Slattery ML, Baumgartner KB, Giuliano AR, Sweeney C, Rollison DE, Byers T. Comparative analysis of breast cancer risk factors among Hispanic and non-Hispanic white women. *Cancer*. 2010;116(13):3215-23.

Hornreich G, Beller U, Lavie O, Renbaum P, Cohen Y, Levy-Lahad E. Is uterine papillary carcinoma a BRCA1-related disease? Case report and review of the literature. *Gynecol Oncol*. 1999;75:300-4.

Hultborn R, Hanson C, Kopf I, Verbiene I, Warnhammar E and Weimarck A: Prevalence of Klinefelter's syndrome in male breast cancer patients. *Anticancer Res* 1997;17:4293-7.

International Agency for Research on Cancer. Available from: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr>. [2011 Jan. 15].

Iyevleva AG, Suspitsin EN, Kroeze K, Gorodnova TV, Sokolenko AP, Buslov KG, Voskresenskiy DA, Togo AV, Kovalenko SP, Stoep N, Devilee P, Imyaninov EN. Non-

founder BRCA1 mutations in Russian breast cancer patients. *Cancer Lett.* 2010; 298(2):258-63.

Jan Ole Kriegs, Gennady Churakov, Jerzy Jurka, Jürgen Brosius, and Jürgen Schmitz. Evolutionary history of 7SL RNA-derived SINEs in Supraprimates. *Trends in Genetics.* 2007; 23(4):158-61.

Jara L, Ampuero S, Seccia L, Bustamante M, Blanco R, Ojeda JM. Analysis of 5382insC (BRCA1) and 6174delT (BRCA2) mutations in 382 healthy Chilean women with a family history of breast cancer. *Biol Res.* 2002;35(1):85-93.

Johansen Taber KA, Morisy LR, Osbahr AJ 3rd, Dickinson BD. Male Breast Cancer: Risk factors, diagnosis and management (Review). *Oncology Reports*, 2010;1116-20.

Johannesdottir G, Gudmundsson J, Bergthorsson JT, Arason A, Agnarsson BA, Eiriksdottir G, et al. High prevalence of the 999del5 mutation in Icelandic breast and ovarian cancer patients. *Cancer Res* 1996;56:3663–5.

Kadouri L, Kote-Jarai Z, Hubert A, Durocher F, Abeliovich D, Glaser B, Hamburger T, Eeles RA, Peretz T. *Br J Cancer.* 2004;90(10):2002-5.

Kenemans P, Bosman A. Breast cancer and post-menopausal hormone therapy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003;17:123–37. at least two different lines of genetic evolution. *J Pathol* 2001;194:165–70.

Kenemans P, Verstraeten RA, Verheijen RH. Oncogenic pathways in hereditary and sporadic breast cancer. *Maturitas.* 2004;49(1):34-43.

Kenemans P, Bosman A. Breast cancer and post-menopausal hormone therapy. 2003;17:123–37.

King MC, Marks JH, Mandell JB. New York Breast Cancer Study Group. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science.* 2003;302:643–6.

Konecny M, Milly M, Zavodna K, Weismanova E, Gregorova J, Milkva I, Ilencikova D, Kausitz J, Bartosova Z. Comprehensive genetic characterization of hereditary breast/ovarian cancer families from Slovakia. *Breast Cancer Res Treat.* 2011; 126(1):119-30.

Kriege M, Brekelmans CT, Boetes C, Besnard PE, Zonderland HM, Obdeijn IM, Manoliu RA, Kok T, Peterse H, Tilanus-Linthorst MM, Muller SH, Meijer S, Oosterwijk JC, Beex LV, Tollenaar RA, de Koning HJ, Rutgers EJ, Klijn JG; Magnetic Resonance Imaging Screening Study Group. Efficacy of MRI and mammography for breast-cancer screening in women with a familial or genetic predisposition. *N Engl J Med*. 2004;351(5):427-37.

Kriege M, Seynaeve C, Meijers-Heijboer H, Collee JM, Menke-Pluymers MB, Bartels CC, Tilanus-Linthorst MM, van den Ouweland A, van Geel B, Brekelmans CT, Klijn JG. Distant disease-free interval, site of first relapse and post-relapse survival in BRCA1- and BRCA2-associated compared to sporadic breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2008;111(2):303-11.

Lanitis S, Rice AJ, Vaughan A, Cathcart P, Filippakis G, Al Mufti R, Hadjiminis DJ. Diagnosis and management of male breast cancer. *World J Surg* 2008;32: 2471-6.

Land CE, Tokunaga M, Koyama K, Soda M, Preston DL, Nishimori I, Tokuoka S. Incidence of female breast cancer among atomic bomb survivors, Hiroshima and Nagasaki, 1950-1990. *Radiat Res*. 2003;160(6):707-17.

Lenz SK, Goldberg MS, Labrèche F, Parent ME, Valois MF. Association between alcohol consumption and postmenopausal breast cancer: results of a case-control study in Montreal, Quebec, Canada. *Cancer Causes Control*. 2002;13(8):701-10.

Levine DA, Lin O, Barakat RR, Robson ME, McDermott D, Cohen L, Satagopan J, Offit K, Boyd J. *Gynecol Oncol*. 2001;80(3):395-8.

Levy-Lahad E and Friedman E: Cancer risks among *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. *Br J Cancer* 2007;96:11-5.

Liede A, Karlan BY, Baldwin RL, Platt LD, Kuperstein G, Narod SA. *J Clin Oncol*. Cancer incidence in a population of Jewish women at risk of ovarian cancer. 2002; 20(6):1570-7.

Liede A, Karlan BY and Narod SA: Cancer risks for male carriers of germline mutations in *BRCA1* or *BRCA2*: a review of the literature. *J Clin Oncol*. 2004;22:735-42.

Lippman SM, Levin B, Brenner DE, Gordon GB, Aldige CR, Kramer BS, Garber JE, Hawk E, Ganz PA, Somerfield MS. Cancer Prevention and the American Society of Clinical Oncology. JCO. 2004;3848-51.

Lynch HT, Krush AJ. Carcinoma of the breast and ovary in three families. Surg Gynecol Obstet. 1971;133(4):644-48.

Lynch HT, Krush AJ, Lemon HM, Kaplan AR, Condit PT, Bottomley RH. Tumor variation in families with breast cancer. JAMA. 1972;222(13):1631-5.

Lynch HT, Guirgis H, Albert S, Brennan M. Familial breast cancer in a normal population. Cancer. 1974;34(6):2080-6.

Lynch HT, Casey MJ, Lynch J, White TEK, Godwin AK. Genetics and ovarian carcinoma. Sem Oncol. 1998;25:265–81.

Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL, Bewtra C, Lynch JF, Butts M, Godwin AK. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. Mol Oncol. 2009;3(2):97-137.

Malandar S, Rambech E, Kristoffersson U, Halvarsson B, Ridderheim M, Borg Å, Nilbert M. The contribution of the hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome to the development of ovarian cancer. Gynecol Oncol 2006;101:238–43.

Maradiegue A, Edwards Qt. An overview of ethnicity and assessment of family history in primary care settings. Journal of Academic Nurse Praticals. 2006; 18(10):447-56.

McTiernan A, Kooperberg C, White E, Wilcox S, Coates R, Adams-Campbell LL, Woods N, Ockene J; Women's Health Initiative Cohort Study. Recreational physical activity and the risk of breast cancer in postmenopausal women: The women's Health Initiative Cohort Study. JAMA 2003; 290(10):1331-6.

Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(,)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. Nat Genet. 2002;31:55–9.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z,

Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R, Dayananth P, Ward J, Tonin P, Narod S, Bristow PK, Norris FH, Helvering L, Morrison P, Rosteck P, Lai M, Barrett JC, Lewis C, Neuhausen S, Cannon-Albright L, Goldgar D, Wiseman R, Kamb A, Skolnick MH. A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Science*. 1994;266:66-71.

Milne RL, Osorio A, Cajal TR, Vega A, Llort G, de la Hoya M, Díez O, Alonso MC, Lazaro C, Blanco I, Sánchez-de-Abajo A, Caldés T, Blanco A, Graña B, Durán M, Velasco E, Chirivella I, Cardeñosa EE, Tejada MI, Beristain E, Miramar MD, Calvo MT, Martínez E, Guillén C, Salazar R, San Román C, Antoniou AC, Urioste M, Benítez J. The average cumulative risks of breast and ovarian cancer for carriers of mutations in BRCA1 and BRCA2 attending genetic counseling units in Spain. *Clin Cancer Res*. 2008;14:2861-9.

Mohamad HB and Apffelstaedt JP: Counseling for male *BRCA* mutation carriers: a review. *Breast*. 2008;17:441-50.

Mullineaux LG, Castellano TM, Shaw J, Axell L, Wood ME, Diab S, Klein C, Sitarik M, Deffenbaugh AM, Graw SL. *Cancer*. 2003;98(3):597-602.

Musolino A, Naldi N, Michiara M, Bella MA, Zanelli P, Bortesi B, Capelletti M, Savi M, Neri TM, Ardizzoni A. A breast cancer patient from Italy with germline mutations in both the BRCA1 and BRCA2 genes. *Breast Cancer Res Treat*. 2005;91(2):203-5.

Myung K, Datta A, Kolodner RD. Suppression of spontaneous chromosomal rearrangements by S phase checkpoint functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 2001;104:397–408.

Nathanson KL, Shugart YY, Omaruddin R, Szabo C, Goldgar D, Rebbeck TR, Weber BL. *Hum Mol Genet*. 2002;11(11):1327-32.

National Cancer Institute. Genetics of the breast and ovarian cancer (PDQ): health professional version. Available from: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/genetics/breast-and-ovarian/HealthProfessional/page4>, 2007(B). [2007 Dec. 20].

Narod SA, Feunteun J, Lynch HT, Watson P, Conway T, Lynch J, Lenoir GM. Familial breast-ovarian cancer locus on chromosome 17q12-q23. *Lancet*. 1991; 338(8759):82-3.

Narod S, Ford D, Devilee P, Barkardottir RB, Eyfjord J, Lenoir G, Serova O, Easton D, Goldgar D. Breast Cancer Linkage Consortium. Genetic heterogeneity of breast-

ovarian cancer revisited. *Am J Hum Genet.* 1995a;57:957–8.

Narod SA, Ford D, Devilee P, Barkardottir RB, Lynch HT, Smith SA, Ponder BAJ, Weber BL, Garber JE, Birch JM, Cornelis RS, Kelsell DP, Spurr NK, Smyth E, Haites N, Sobol H, Bignon Y, Chang-Claude J, Hamann U, Lindblom A, Borg A, Piver MS, Gallion HH, Struwing JP, Whittemore A, Tonin P, Goldgar DE, Easton DF. An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet.* 1995b;56:254–64.

National Cancer Institute. SEER Surveillance, Epidemiology and Results, Find Cancer Statistics, Cancer Fact Sheet, Cancer of the Ovary, 2007a. Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>. [2007 Dec. 20].

National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Practical Guidelines Oncology: Genetic/Familial high-risk assessment: breast and ovarian, 2007b. Available from: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp. [2007 Dec. 20].

National Comprehensive Cancer Network (NCCN): Breast cancer risk reduction. NCCN Practical Guidelines Oncology, 2007c. Available from: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp. [2007 Dec. 20].

Negura L, Uhrhammer N, Negura A, Artenie V, Carasevici E, Bignon YJ. Complete BRCA mutation screening in breast and ovarian cancer predisposition families from a North-Eastern Romanian population. *Fam Cancer.* 2010;9(4):519-23.

Neuhausen SL, Mazoyer S, Friedman L, Stratton M, Offit K, Caligo A, Tomlinson G, Cannon-Albright L, Bishop T, Kelsell D, Solomon E, Weber B, Couch F, Struwing J, Tonin P, Durocher F, Narod S, Skolnick MH, Lenoir G, Serova O, Ponder B, Stoppa-Lyonnet D, Easton D, King MC, Goldgar DE. Haplotype and phenotype analysis of six recurrent BRCA1 mutations in 61 families: results of an international study. *Am J Hum Genet.* 1996;58(2):271-80.

O'Connell P. Genetic and cytogenetic analyses of breast cancer yield different perspectives of a Breast Cancer Res Treat. 2003;78:347–57.

O'Connell P. Genetic and cytogenetic analyses of breast cancer yield different perspectives of a complex disease. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;78:347–57.

Offit K, Garber JE, Grady M, et al. ASCO curriculum: cancer genetics and cancer prevention testing. 2nd ed. Alexandria, V/A: ASCO publishing; 2004.

Offit K, Thom P. Ethical and legal aspects of cancer genetic testing. *Semin Oncol*. 2007;34(5):435-43.

Osin PP, Anbazhagan R, Bartkova J, Nathan B, Gusterson BA. Breast development gives insights into breast disease. *Histopathology*. 1998;33:275–83.

Ottini L, Palli D, Rizzo S, Federico M, Bazan V and Russo A: Male breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010;73:141-55.

Ozols RF, Rubin SC, Thomas GM, Robboy SJ. Epithelial ovarian cancer. In: Hoskins WJ, Perez CA, Young RC, Barakat RR, Markman M, Randall ME. *Principles and Practice of Gynecologic Oncology*. Vol. 5. Philadelphia, PA.: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 903-4.

Pal T, Permuth-Wey J, Betts JA, Krischer JP, Fiorica J, Arango H, LaPolla J, Hoffman M, Martino MA, Wakeley K, Wilbanks G, Nicosia S, Cantor A, Sutphen R. BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer*. 2005;104:2807–16.

Pal T, Permuth-Wey J, Kapoor R, Cantor A, Sutphen R. Improved survival in BRCA2 carriers with ovarian cancer. *Fam Cancer*. 2007;6:113–9.

Palma MD, Domchek SM, Stopfer J et al. The relative contribution of point mutations and genomic rearrangements in BRCA1 and BRCA2 in high-risk breast cancer families. *Cancer Res*. 2008;68:7006–14.

Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M et al. BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat Genet*. 1997;17:341–5.

Pike MC, Krailo MD, Henderson BE, Casagrande JT, Hoel DG. “Hormonal” risk factors , “breast tissue age”, and the age-incidence of breast cancer. *Nature*. 1983; 303:767-70.

Puget N, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Audoynaud C, Pagès S, Lynch HT, Goldgar D, Lenoir GM, Mazoyer S. An Alu-mediated 6-kb duplication in the BRCA1 gene: a new founder mutation? *Am J Hum Genet*. 1999;64:300–2.

Preston DL, Mattsson A, Holmberg E, Shore R, Hildreth NG, Boice JD Jr. Radiation effects on breast cancer risk: a pooled analysis of eight cohorts. *Radiat Res*. 2002;

158(2):220-35.

Rafnar T, Benediktsdottir KR, Eldon BJ, Gestsson T, Saemundsson H, Olafsson K, Salvarsdottir A, Steingrimsdottir E, Thorlacius S. BRCA2, but not BRCA1, mutations account for familial ovarian cancer in Iceland: a population-based study. *Eur J Cancer*. 2004;40:2788–93.

Ramus SJ, Harrington PA, Pye C et al. Contribution of BRCA1 and BRCA2 mutations to inherited ovarian cancer. *Hum Mutat*. 2007;28:1207–15.

Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS. *Nat Genet*. 1996;14(2):185-7.

Rose PG, Shrigley R, Wiesner GL. Germline BRCA2 mutation in a patient with fallopian tube carcinoma: a case report. *Gynecol Oncol*. 2000;77:319–20.

Rouse J, Jackson SP. Interfaces between the detection, signalling, and repair of DNA damage. *Science*. 2002;297:547–51.

Rossouw JE. Effect of postmenopausal hormone therapy on cardiovascular risk. *J Hypertens Suppl*. 2002;20(2):S62-5.

Rubin SC, Benjamin I, Behbakht K, Takahashi H, Morgan MA, LiVolsi VA, Berchuck A, Muto MG, Garber JE, Weber BL, Lynch HT, Boyd J. Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of *BRCA1*. *N Engl J Med*. 1996;335:1413–6.

Rubin SC, Blackwood MA, Bandera C, Behbakht K, Benjamin I, Rebbeck TR, Boyd J. BRCA1, BRCA2, and hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene mutations in an unselected ovarian cancer population: relationship to family history and implications for genetic testing. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178:670–77.

Rubinstein WS. Hereditary breast cancer in Jews. *Fam Cancer*. 2004;3(3-4):249-57.

Salmon, AY, Eeles, RA, Easton DF, Ponder, BAJ, Eng, C. Genetic Predisposition to Cancer. *Familial Breast Cancer*. 2004;248:25.

Santos C, Peixoto A, Rocha P, Vega A, Soares MJ, Cerveira N, Bizarro S, Pinheiro M, Pereira D, Rodrigues H, Castro F, Henrique R, Teixeira MR. Haplotype and

quantitative transcript analyses of Portuguese breast/ovarian cancer families with the BRCA1 R71G founder mutation of Galician origin. *Fam Cancer*. 2009; 8(3):203-208.

Sasco AJ, Lowenfels AB and Pasker de Jong P: Epidemiology of male breast cancer: a meta-analysis of published case-control studies and discussion of selected aetiological factors. *Int J Cancer* 1993;53:538-49.

Saslow D, Boetes C, Burke w. American Cancer Society guidelines for breast screening with MRI as an adjunct to mamography. *Cancer J Clinical*. 2007;57:75-89.

Satagopan JM, Boyd J, Kauff ND, Robson M, Scheuer L, Narod S, Offit K. Ovarian cancer risk in Ashkenazi Jewish carriers of BRCA1 and BRCA2. *Clin Cancer Res* 2002;8:3776–81.

Schubert EL, Lee MK, Mefford HC, Argonza RH, Morrow JE, Hull J, Dann JL, King MC. BRCA2 in American families with four or more cases of breast or ovarian cancer: recurrent and novel mutations, variable expression, and the possibility of families whose cancer is not attributable to BRCA1 or BRCA2. *Am J Hum Genet*. 1997;60:1031–40.

Smith TM, Lee MK, Szabo CI, Jerome N, McEuen M, Taylor M, Hood L, King MC. Complete genomic sequence and analysis of 117 kb of human DNA containing the gene BRCA1. *Genome Res*. 1996;6(11):1029-49.

Smith A, Moran A, Boyd MC, Bulman M, Shenton A, Smith L, Iddenden R, Woodward ER, Laloo F, Maher ER, Evans DG. Phenocopies in BRCA1 and BRCA2 families: evidence for modifier genes and implications for screening. *J Med Genet*. 2007;44(1):10-5.

Soegaard M, Kjaer SK, Cox M, Wozniak E, Høgdall E, Høgdall C, Blaakaer J, Jacobs IJ, Gayther SA, Ramus SJ. *BRCA1* and *BRCA2* mutation prevalence and clinical characteristics of a population- based series of ovarian cancer cases from Denmark. *Clin Cancer Res*. 2008;14:3761–7.

Sorensen HT, Friis S, Olsen JH, Thulstrup AM, Møllerhøj L, Linet M, *et al*: Risk of breast cancer in Am J Gastroenterol. 1998;93:231-3.

Starita LM, Parvin JD. The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15(3):345-50.

Struewing JP, Abeliovich D, Peretz T, Avishai N, Kaback MM, Collins FS, Brody LC. The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nat Genet.* 1995;11(2):198-200.

Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med.* 1997; 336(20):1401-08.

Tai YC, Domchek S, Parmigiani G and Chen S: Breast cancer risk among male BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:1811-14.

Tan DS, Rothermundt C, Thomas K, Bancroft E, Eeles R, Shanley S, Ardern-Jones A, Norman A, Kaye SB, Gore ME. "BRCAness" syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Clin Oncol* 2008; 26:5530-36.

Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, Merajver S, Thorlacius S, Offit K, Stoppa-Lyonnet D, Belanger C, Bell R, Berry S, Bogden R, Chen Q, Davis T, Dumont M, Frye C, Hattier T, Jammulapati S, Janecki T, Jiang P, Kehrer R, Leblanc JF, Mitchell JT, McArthur-Morrison J, Nguyen K, Peng Y, Samson C, Schroeder M, Snyder SC, Steele L, Stringfellow M, Stroup C, Swedlund B, Swense J, Teng D, Thomas A, Tran T, Tranchant M, Weaver-Feldhaus J, Wong AK, Shizuya H, Eyfjord JE, Cannon-Albright L, Tranchant M, Labrie F, Skolnick MH, Weber B, Kamb A, Goldgar DE. The complete BRCA2 gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nature Genetics.* 1996;12:333-7.

Thorlacius S, Sigurdsson S, Bjarnadottir H, Olafsdottir G, Jonasson JG, Tryggvadottir L, Tulinius H, Eyfjord JE. Study of a single BRCA2 mutation with high carrier frequency in a small population. *Am J Hum Genet.* 1997;60:1079-84.

Tobias DH, Eng C, McCurdy LD, Kalir T, Mandelli J, Dottino PR, Cohn CJ. Founder BRCA 1 and 2 mutations among a consecutive series of Ashkenazi Jewish ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol.* 2000;78:148-51.

Tompson D, Easton DF. The BRCA1 and BRCA2 genes. *Genetic Preposition to Cancer.* 2^o ed. London: Arnold; 2004. p. 256-76.

Tonin P, Weber B, Offit K, Couch F, Rebbeck TR, Neuhausen S, Godwin AK, Daly M, Wagner-Costalos J, Berman D, Grana G, Fox E, Kane MF, Kolodner RD, Krainer M, Haber DA, Struewing JP, Warner E, Rosen B, Lerman C, Peshkin B, Norton L,

Serova O, Foulkes WD, Garber JE, et al. Frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer families. *Nat Med*. 1996;2(11):1179-83.

Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H, et al. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet*. 2002;71:432–8.

Vega A, Campos B, Bressac-De-Paillerets B, Bond PM, Janin N, Douglas FS, Domènech M, Baena M, Pericay C, Alonso C, Carracedo A, Baiget M, Diez O. The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. *Hum Mutat*. 2001;17(6):520-1.

Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*. 2002;108:171–82.

Venkitaraman AR. Linking the cellular functions of BRCA genes to cancer pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*. 2009;4:461-87.

Wagner T, Stoppa-Lyonnet D, Fleischmann E, Muhr D, Pagès S, Sandberg T, Caux V, Moeslinger R, Langbauer G, Borg A, Oefner P. Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations. *Genomics*. 1999;62(3):369-76.

Wang E, Miller LD, Ohnmacht GA, Liu ET, Marineta FM. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. *Nat Biotechnol*. 2000;18(4):457-9.

Weitzel L, Lagos VI, Cullinane CA, Gambol PJ, Culver JO, Blazer KR, Palomares MR, Lowstuter KJ, MacDonald DJ. Limited family structure and BRCA gene mutation status in single cases of breast cancer. *JAMA*. 2007;297(23):2587-95.

Woodward AM, Davis TA, Silva AG, Kirk JA, Leary JA; kConFab Investigators. Large genomic rearrangements of both BRCA2 and BRCA1 are a feature of the inherited breast/ovarian cancer phenotype in selected families. *J Med Genet*. 2005;42(5):e31.

Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, Collins N, Gregory S, Gumbs C, Micklem G. Identification of the Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA2. *Nature*. 1995;378:789-92.

Wooster R, Weber BL. Breast and ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003;348:2339–47.

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progesterone in healthy postmenopausal women. *JAMA*. 2002;288(3):321-33.

Zakharova LM, Gorovenko NG, Podolskaya SV, Anikuskina NF, Lobanova OE, Pekur KA, Kropelnitskyi VA, Shurygina OV. Breast cancer immunohistochemical features in young women with BRCA 1/2 mutations *Exp Oncol*. 2009;S31(3):174-8.

Ziogas A, Gildea M, Cohen P, Bringman D, Taylor TH, Seminara D, Barker D, Casey G, Haile R, Liao SY, Thomas D, Noble B, Kurosaki T, Anton-Culver H. Cancer risk estimates for family members of a population-based family registry for breast and ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000;9:103-11.

Zweemer RP, van Diest PJ, Verheijen RH, Ryan A, Gille JJ, Sijmons RH, Jacobs IJ, Menko FH, Kenemans P. Molecular evidence linking primary cancer of the fallopian tube to BRCA1 germline mutations. *Gynecol Oncol*. 2000;76:45-50.

ANEXO

ANEXO

Iniciadores para o gene *BRCA1* e *BRCA2*: região amplificada, tamanho do amplicon, iniciadores usados e temperaturas de análise por *dHPLC*.

Quadro 1– Iniciadores para o gene *BRCA1*: região amplificada, o tamanho do amplicon, os iniciadores usados e as temperaturas de análise por *dHPLC*.

FRAGMENTO	TAMANHO (pb)	INICIADORES (5'-3')	ANELAMENTO (°C)	Temperatura <i>dHPLC</i> (°C)
02	258	S=gaagtgatcatttataaaccttt AS= tgtcttttctccctagtagt	55	51/55
03	339	S= tcctgacacagcagacattta AS= ttggatttctgttctactta	55	54/55
05	283	S= ctcttaagggcagttgtgag AS= ttcctactgtggtgcttcc	55	54/55
06	205	S= cttatttttagtgccttaaaagg AS= ttcatggacagcacttgagtg	50	57/58
07	241	S= cacaacaaagagcatacataggg AS= tcgggttctactctgtagaag	55	55/56
08	267	S= tgttagctgactgatgatggt AS= atccagcaattattattaaatac	55	55/57
09	211	S= ccacagtagatgctcagtaaata AS= taggaaaataccagcttcataga	60	54/55
10	241	S= tggtcagcttctgtaatcg AS= gtatctaccactcttcttctcag	55	57/58
11A	472	S= ggaattaaatgaaagagtagagc AS= cttccagcccatctgttatgttg	55	55/56
12	265	S= gtcctgccaatgagaagaaa AS= tgtcagcaaaccttaagaatgt	55	58/60
13	320	S= aatggaaagcttctcaaagta AS= atgttgagctaggtccttac	55	57/59
14	312	S= ctaacctgaattatcactatca AS= gtgtataaatgcctgtatg	55	55/56
15	229	S= cttccatttatcttctagg AS= acagcagatgaaatattacc	50	57/59

S= senso AS= anti-senso

Quadro 1– (continuação).

FRAGMENTO	TAMANHO (pb)	INICIADORES (5'-3')	ANELAMENTO (°C)	Temperatura <i>dHPLC</i> (°C)
16	450	S= aattcttaacagagaccagaac AS= aaaactcttccagaatgttgt	55	56/59
17	263	S= gtgtagaacgtgcaggattg AS= tcgcctcatgtggttta	55	57
18	352	S= ggctcttagcttcttaggac AS= gagaccattttccagcatc	60	55/56
19	249	S= ctgtcattcttctgtgtc AS= cattgttaaggaaagtgggtgc	60	56/57
20	401	S= atatgacgtgtctgtccac AS= gggaatccaaattacacagc	60	55/56/58
21	298	S= aagctcttcttttgaaagtc AS= gtagagaaatagaatagcctct	55	55/59
22	297	S= tccattgagaggcttgct AS= gagaagactctgaggctac	55	59/60
23	255	S= cagagcaagaccctgtctc AS= actgtgctactcaagcacca	55	55/59
24	280	S= atgaattgacactaatctctgc AS= gtagccaggacagtagaagga	60	60/62
11-1	506	S= aacaccactgagaagcgtgcag AS= acgtccaatacatcagctacttgg	55	57/58
11-2	550	S= cctagagatactgaagatgttcctgg AS= tcatcacttgaccattctgtcc	55	56/57
11-3	389	*S= gataaatcagggaactaacc *AS= ctgactggcatttggtgtac	55	55/56
11-4	514	S= aggctgaggaggaagtcttacc AS= cctgagtgcataatcagtagcagg	55	56/57

S= senso AS= anti-senso

Quadro 1 – (continuação).

FRAGMENTO	TAMANHO (pb)	INICIADORES (5'-3')	ANELAMENTO (°C)	Temperatura <i>dHPLC</i> (°C)
11-5	567	S= cagcgatactttccagagctg AS= cattcctcttctgcatttcttg	55	56/57
11-6	604	S= gaaggctttaagtatccattggg AS= ggctaattgtgctcactgtacttg	55	56/57
11-7	665	S= gcaacgaaactggactcattactc AS= gacgcttttgctaaaaacagcag	55	55/55.5
11-8	632	S= gtttgttctgagacacctgatgacc AS= ttatttcttccaagcccggtcc	55	56/57.5
11-9	436	S= cggtgctaccgagtgtctgtctaag AS= gtgctccaaaagcataaa	55	56.5/57.5

S= senso AS= anti-senso

Iniciadores descritos por Friedman *et al.*, 1994

(*) - Iniciadores modificados da referência original.

Quadro 2 – Iniciadores para o gene *BRCA2*: região amplificada, o tamanho do amplicon, os iniciadores usados e as temperaturas de análise por *dHPLC*.

FRAGMENTO	TAMANHO (pb)	INICIADORES (5'-3')	ANELAMENTO (°C)	Temperatura <i>dHPLC</i> (°C)
02	311	S= ccaggagatgggactgaattag AS= ctgtgacgtactgggttttagc	55	55/57
03	424	S= gatctttaactgttctgggtcaca AS= cccagcatgacacaattaatga	55	55/56
04	249	S= agaattgcaaattataatccagagta AS= aatcagattcatctttatagaacaaa	50	52/56
5/6	453	S= tgtgttggcattttaaacatca AS= caggggcaaagggtataacgct	50	52/54

S= senso AS= anti-senso

Quadro 2 – (continuação).

FRAGMENTO	TAMANHO (pb)	INICIADORES (5'-3')	ANELAMENTO (°C)	Temperatura dHPLC (°C)
07	214	S= <i>ccttaatgatcagggcatttc</i> AS= <i>caacctcatctgctcttcttg</i>	55	54/59
08	406	S= <i>gccatatcttaccacctgtga</i> AS= <i>aggtttagagactttctcaaaggc</i>	55	53/54
09	164	S= <i>ctagtgatttaaacataattttg</i> AS= <i>gttcaactaaacagaggact</i>	55	55/56
10A	393	S= <i>gggtgactgaccgaaaaataaa</i> AS= <i>aaacacagaaggaatcgatc</i>	55	53.5/54
10B	332	S= <i>aggaggactccttatgtccaaa</i> AS= <i>aaacacagaaggaatcgatc</i>	60	54.5/55.5
11A	315	S= <i>actgtgcccaaacactacctt</i> AS= <i>cagagaatcagcttctgggta</i>	50	54/55
11B	270	S= <i>tgaactgacagattctaaactgcc</i> AS= <i>ccatactccccaaactgacta</i>	60	56/57
12	387	S= <i>agtgtgttttaagtgtgcaaaa</i> AS= <i>ggatccacctgaggtcagaata</i>	55	53.5/54
13	310	S= <i>gcatccgttacattcactgaaa</i> AS= <i>acgggaagtgttaacttctaacg</i>	55	53.5/53.7
14	633	S= <i>accatgtagcaaatgagggct</i> AS= <i>gggctttaaattaccaccacc</i>	60	54.5/55.5
15	313	S= <i>ggccaggggtgtgctttt</i> AS= <i>aggatactagttaatgaaata</i>	50	54/56
16	380	S= <i>tttgtaaattcagtttggttg</i> AS= <i>agccaacttttagttcgagag</i>	50	53.5/55.5
17	305	S= <i>cagagaatagtgtagtgtgaa</i> AS= <i>agaaaccttaaccatactgc</i>	55	55/57

S= senso AS= anti-senso

Quadro 2 – (continuação).

FRAGMENTO	TAMANHO (pb)	INICIADORES (5'-3')	ANELAMENTO (°C)	Temperatura dHPLC (°C)
18A	457	S= <i>gatccactatttggggattgc</i> AS= <i>gatctaactgggccttaacagc</i>	55	52/55
18B	384	S= <i>gcagatacccaaaaagtggc</i> AS= <i>tctggacctcccaaaaactg</i>	55	54/58
19	296	S= <i>aagtgaatattttaaggcagtt</i> AS= <i>tatatggttaagtttaagaat</i>	55	52/54
20	296	S= <i>cactgtgcctggcctgatac</i> AS= <i>atgttaaattcaaagtctcta</i>	60	53/56
21	304	S= <i>gggtgttttatgctgttct</i> AS= <i>catttcaacatattcctcctg</i>	50	55/57
22	455	S= <i>aaccacacccttaagatgagc</i> AS= <i>gggcattagtagtgattttgc</i>	50	54/57
23	290	S= <i>acttctccattgcatttctca</i> AS= <i>aaaacaaaaacaaaattcaacata</i>	55	53/55
24	290	S= <i>gcagcgacaaaaaaaactca</i> AS= <i>atttgccaactggtagctcc</i>	50	53/55
25	365	S= <i>gctttcgccaaattcagcta</i> AS= <i>tacaaaaatgtgtgtgatgc</i>	55	53.5/55.5
26	428	S= <i>gtcccaaacttttcatttctgc</i> AS= <i>ggagccacataacaaccaca</i>	55	54/56
27A	378	S= <i>ctgtgtgtaatatatttgcgtgct</i> AS= <i>gcaagttcttcgtcagctattg</i>	55	53/58
27B	433	*S= <i>gaattctcctcagatgactcca</i> *AS= <i>tctttgctcattgtgcaaca</i>	60	54.5/56.5
10-1	333	*S= <i>aaagggcttctgatttgctac</i> *AS= <i>aaagggcttctgatttgctac</i>	60	53.5/54.5

S= senso AS= anti-senso

Quadro 2 – (continuação).

FRAGMENTO	TAMANHO (pb)	INICIADORES (5'-3')	ANELAMENTO (°C)	Temperatura dHPLC (°C)
10-2	445	*S= atctgaagtgaaccaaatagatac *AS= cttttgataccctgaaatgaagaag	50	56.5/56.8
10-3	527	*S= taaagcaggcaatatctggaactct AS= <i>aaacacagaaggaatcgatcatc</i>	60	55/56
11-1	575	S= <i>aggttattgcattctctgtgaa</i> AS= <i>ataatttcatttaagcacatacat</i>	60	54/54.8
11-2	461	*S= tctagaggcaaagaatcata *AS= gttgctgtttatcacctgt	60	54.5/55.5
11-3	628	*S= aaccattttcaagaactctacca AS= <i>gtaaattcaactgacttcctgatt</i>	50	54/54.5
11-4	426	*S= agtggttctgattgaaaaatagtc **AS= cccctaacccttcttcat	50	54.5/56
11-5F	587	*S= gggtttaggggctttattc AS= <i>ttgctccgttttagtagcagttaac</i>	60	53.5/54
11-6A	306	S= aagcatgtcatggaataacttc AS= <i>caactgggacactttcttca</i>	60	54.5/55
11-6B	360	S= <i>gaaagaaagtgtcccagttg</i> AS= <i>accacagtctcaatagaacaagg</i>	60	55/57.5
11-7	545	*S= tcatacagctagcgggaaaaaag AS= <i>ttattcttctggttgaccatca</i>	60	55/55.5
11-8	487	*S= gtcctgcaactgtttacac *AS= tctcaacgcaaatacttcat	55	54.5
11-9	685	*S= ttccaaagtaatatccaatgta AS= <i>atacttggaaaagacttgcttgg</i>	55	55/55.5
11-10	507	*S= cacctgtgatgttagttt *AS= ctgggttctcttatcaacacg	55	54.5/55.5
11-11	612	S= agggagtgttagaggaatttg AS= <i>ccactaagataaggggtctcct</i>	50	54.5/55

S= senso AS= anti-senso

Em *itálico* – iniciadores de Friedman et al., 1997

(*) - iniciadores do banco de dados – BIC.

(**) - iniciadores de Wagner et al., 1999.