

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**INCIDÊNCIA DAS MUTAÇÕES 185delAG E 5382insC NO GENE *BRCA1*
EM MULHERES JUDIAS ASHKENAZI DE PORTO ALEGRE**

Crisle Vignol Dillenburg

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Leistner-Segal

Dissertação de Mestrado

2008

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas

**INCIDÊNCIA DAS MUTAÇÕES 185delAG E 5382insC NO GENE *BRCA1*
EM MULHERES JUDIAS ASHKENAZI DE PORTO ALEGRE**

Crisle Vignol Dillenburg

Dissertação de Mestrado em Ciências Médicas
Para a obtenção do título de Mestre
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Pós-Graduação em Ciências Médicas
Faculdade de Medicina

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Leistner-Segal

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, 2008

AGRADECIMENTOS

À Profa. Sandra Leistner-Segal pela sua orientação, ensinamentos e incentivo à pesquisa.

Agradecimento especial à Rosângela Vignol simplesmente por tudo, por estar sempre ao meu lado, pelo apoio, amizade e amor incondicional.

Ao Eduardo Morisso pelo amor, incentivo, parceria e dedicação.

Aos meus pais Rosângela e Júlio pelo presente da vida.

Às minhas queridas irmãs Gisele, Mariana e Helena pelo carinho, amizade e alegria.

À minha avó Lydia Vignol pelas palavras de incentivo, amor e carinho.

À Maria Teresa por ter despertado em mim o interesse pela genética, pelo incentivo e disposição de ajudar-me, desde a preparação para prova de ingresso até hoje.

À Fernanda Bueno pela amizade e por todos os momentos compartilhados.

Às colegas Márcia Portela e Ingrid Ewald pela disponibilidade e incentivo para conclusão deste trabalho.

À Luciana Rossato, Isabel Bandeira e Gustavo Lucena pela participação dos procedimentos realizados no laboratório, que em momentos diferentes, desempenharam as tarefas com dedicação.

À Eleonora Dias por ter gentilmente fornecido as informações a respeito das pacientes que apresentaram as mutações e por ser a responsável pelo Banco de Dados utilizado para realização deste estudo.

Ao GPPG e ao PPG Ciências Médicas pela oportunidade de realizar este trabalho, pelo aperfeiçoamento pessoal e profissional, bem como me proporcionar melhor formação acadêmica.

Ao FIPE pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

A todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular do Serviço de Genética do HCPA pelo auxílio e apoio para conclusão deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>BRCA1</i>	<i>Breast Cancer Gene 1</i>
<i>BRCA2</i>	<i>Breast Cancer Gene 2</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
INCA	Instituto Nacional do Câncer
<i>PCR</i>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>ASCO</i>	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
<i>PSM</i>	<i>PCR Mediated Site-Direct</i>
AG	Aconselhamento Genético
<i>mRNA</i>	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
<i>ASHG</i>	<i>American Society of Human Genetic</i>
TRH	Terapia de Reposição Hormonal
ACO	Anticoncepcional Oral
CI	Consentimento Informado

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.

Tipos de câncer mais freqüentes, estimados para o ano 2008, na população brasileira 13

Tabela 2.

Estimativas para o ano 2008 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer de mama feminino 14

Tabela 3.

Estimativas para o ano 2008 das taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100.000 mulheres, de acordo com a região 22

Tabela 4.

Estimativa para o ano 2008 das taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100.000 mulheres, de acordo com o estado 23

Tabela 5.

Relação entre idade e risco cumulativo de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres portadoras de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* 26

Tabela 6.

Opções de conduta para mulheres portadoras de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.

Carcinoma mamário. Fonte: Revista Super Interessante. Ano 15 – Edição 176, maio 2002 21

Figura 2.

Freqüência estimada dos casos de câncer de mama. Fonte: Adaptado de Wooster, 2003 24

Figura 3.

Localização dos genes *BRCA1* e *BRCA2* nos cromossomos 17q e 13q. Fonte: www.medichecks.com/Images/BRCA1_BRCA2.gif 32

Figura 4.

Contribuição genética para o câncer de mama. Fonte: Adaptado de Ponder, 2001; Venkitaraman, 2002 38

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	12
REVISÃO DA LITERATURA	
1 CÂNCER.....	18
1.1 CÂNCER DE MAMA	20
1.2 FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE MAMA	25
2 GENES SUPRESSORES TUMORAIS <i>BRCA1</i> E <i>BRCA2</i>	29
2.1 IDENTIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES ESPECÍFICAS	36
3 JUDEUS DE ORIGEM ASHKENAZI.....	38
3.1 SUSCETIBILIDADE GENÉTICA AO CÂNCER DE MAMA.....	39
4 ACONSELHAMENTO GENÉTICO	43
JUSTIFICATIVA	49
OBJETIVOS	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ARTIGO (Versão em Português).....	63
ARTIGO (Versão em Inglês).....	88
CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS	112
ANEXOS	
ANEXO I – Carta às pacientes	114

RESUMO

Base Teórica: O câncer de mama é provavelmente o mais temido pelas mulheres devido a sua alta frequência e, sobretudo, pelos seus efeitos psicológicos que afetam a percepção da sexualidade e a própria imagem pessoal. Ele é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente. Estudos indicam que fatores genéticos e ambientais são responsáveis pela incidência do câncer de mama, sendo que a hereditariedade provavelmente tenha participação restrita no desenvolvimento deste tipo de tumor. Os principais genes associados ao desenvolvimento do câncer de mama, *BRCA1* e *BRCA2*, são responsáveis por cerca de 80% desses casos, conferindo um risco de 71 a 85% de chance de desenvolver a neoplasia em alguma fase da vida.

Mutações nesses genes, classificados como supressores tumorais, demonstram que a perda de suas funções não pára o ciclo celular, não permite a ação do sistema de reparo, e não estimula a apoptose (morte celular programada), culminando em replicação anormal e câncer.

A observação epidemiológica de que mulheres judias de origem Ashkenazi parecem ser mais vulneráveis ao câncer de mama está sendo explicada através de estudos moleculares dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, onde encontramos a prevalência de três mutações específicas: 185delAG e 5382insC, no gene *BRCA1* e 6174delT, no gene *BRCA2*. Métodos: Utilizou-se um banco de DNA pré-existente, extraído de 209 mulheres da comunidade judaica Ashkenazi da cidade de Porto Alegre. A amplificação do DNA foi realizada por *PCR*, através da técnica *PSM (PCR Mediated site-direct)* seguida de digestão dos produtos de *PCR* com enzimas de restrição. Os objetivos foram verificar se as frequências das mutações 185delAG e 5382insC, no

gene *BRCA1* são significativas nesta população e compará-las com demais frequências encontradas. Resultados: Foram encontradas três pacientes com a mutação 185delAG e duas pacientes com a mutação 5382insC, com as frequências de 1,435% (95% IC: 0,366; 3,856) e 0,957% (95% IC: 0,161; 3,125), respectivamente.

Palavras-chave: gene *BRCA1*, mutações 185delAG e 5382insC, *PCR-PSM*, enzimas de restrição, câncer de mama.

ABSTRACT

Introduction: Breast cancer is probably the worst diagnosed cancer for women due to its high frequency and furthermore by its psychological problems that affect the perception of sexuality and the self image. It is relatively rare before 35 years of age, but beyond this age its incidence increases rapidly and progressively. Studies show that genetic and environmental factors are responsible for breast cancer incidence, but heredity may play a restrict role in the development of this kind of tumor. The main genes associated to the development of breast cancer, *BRCA1* and *BRCA2*, are responsible for almost 80% of these cases, reaching a chance between 71 and 85% of developing the disease at any life stage. Mutations in these genes, classified as tumor suppressors, do not allow the repair mechanisms of DNA to perform its action and do not stimulate apoptosis, culminating in abnormal replication and cancer. The epidemiological observation in which Ashkenazi Jewish women seems to be more vulnerable to breast cancer is explained through molecular studies of *BRCA1* and *BRCA2* genes, where three specific mutations have been found (185delAG and 5382insC, in the *BRCA1* gene and 6174delT, in the *BRCA2* gene).

Methods: A pre-existent bank of DNA extracted from 209 women of the Ashkenazi Jewish community of Porto Alegre city has been used. The DNA amplification was performed through *PCR*, using the *PSM* (PCR Mediated Site-Direct) technique followed by the digestion of *PCR* products with restriction enzymes. The objectives of this study was to identify the frequencies of mutations 185delAG and 5382insC at the *BRCA1* gene and verify if they are significantly different in this population when compared to frequencies found in other studies. Results: We found three patients

with 185delAG mutation and two patients with 5382insC mutation, with frequencies of 1.435% (95% CI: 0,366; 3,856) and 0,957% (95% IC: 0,161; 3,125), respectively.

Keywords: *BRCA1* gene, 185delAG and 5382insC mutations, *PCR-PSM*, restriction enzymes, breast cancer.

INTRODUÇÃO

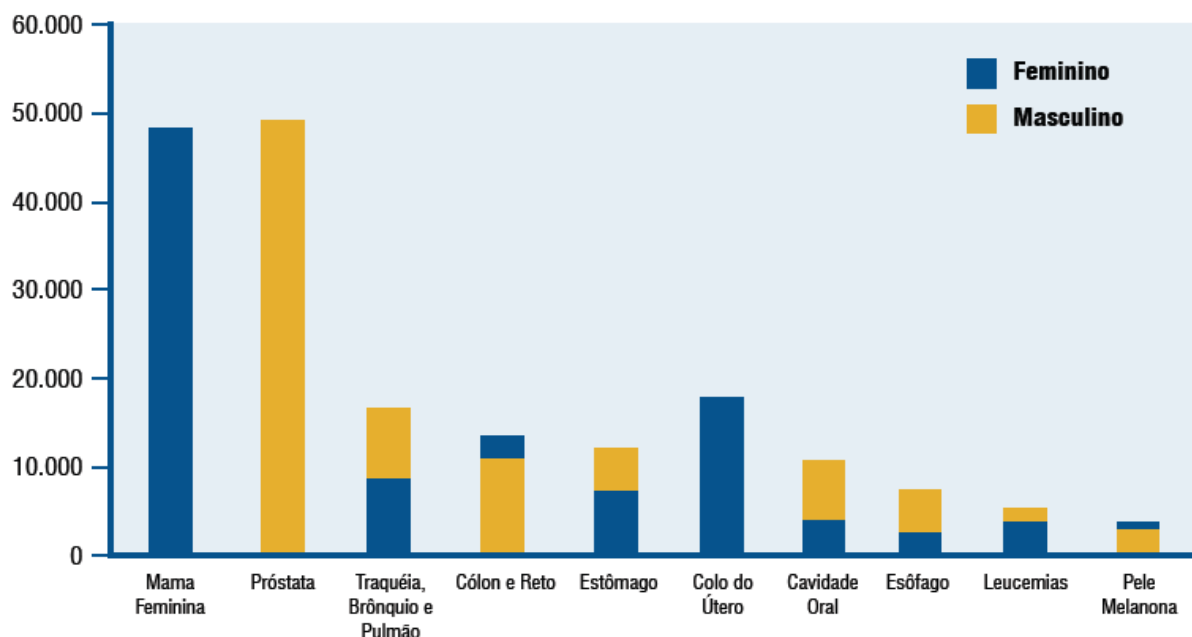
Atualmente, o câncer de mama é a neoplasia mais freqüente e também a principal causa de morte por câncer entre as mulheres. Além disso, o câncer de mama é provavelmente o mais temido, devido ao complicado prognóstico e, especialmente, aos efeitos psicológicos, que afetam a percepção da sexualidade e a própria imagem pessoal. Este tipo de câncer é relativamente raro antes dos 35 anos, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente. (1)

O câncer de mama representa nos países ocidentais, uma das principais causas de morte em mulheres. Estudos indicam o aumento da sua freqüência tanto nos países desenvolvidos, quanto nos países em desenvolvimento. (1)

Dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer) revelaram que, no ano de 2005, de um total de 7,6 milhões de mortes ocorridas em decorrência de câncer no mundo, representando 13% do total de todas as mortes, o câncer de mama foi responsável por 502 mil mortes. No Brasil, a estimativa para 2008, válida para 2009, indica que ocorrerão 466.730 novos casos de câncer e, destes, 231.860 para o sexo masculino e, 234.870 para o sexo feminino. Estima-se que o câncer de pele do tipo não-melanoma (115 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (49 mil), de mama feminino (49 mil), de pulmão (27 mil), de estômago (22 mil) e de colo do útero (19 mil) (Tabela 1). (1)

Tabela 1 - Tipos de câncer mais incidentes, estimados para o ano de 2008, na população brasileira (Exceto câncer de pele do tipo não-melanoma):

Nº de Casos



Fonte: MS/Instituto Nacional do Câncer – INCA. (1)

Dos 49.400 casos esperados em 2008 para o câncer de mama feminino, estima-se um risco de 51 casos a cada 100.000 mulheres. Na região sul, o risco aumenta para 67 casos a cada 100.000 mulheres (Tabela 2). Este dado representa o segundo tipo de câncer, em mulheres, de maior incidência, perdendo apenas para o câncer de pele do tipo não-melanoma, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo.

Tabela 2 - Estimativas, para o ano 2008, das taxas brutas de incidência por 100 mil e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária, na região sul do Brasil:

Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	9.500	67,09	1.780	92,74
Colo do Útero	3.470	24,44	480	25,35
Cólon e Reto	3.100	21,89	650	34,13
Traquéia, Brônquio e Pulmão	2.290	16,22	400	20,93
Estômago	1.470	10,44	220	11,15
Leucemias	790	5,64	130	6,56
Cavidade Oral	520	3,66	120	6,16
Pele Melanoma	940	6,58	170	8,58
Esôfago	820	5,79	80	3,88
Outras Localizações	13.090	92,49	2.620	136,60
Subtotal	35.990	254,28	6.650	346,72
Pele não Melanoma	11.590	81,91	1.590	83,02
Todas as Neoplasias	47.580	336,12	8.240	429,02

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

Fonte: MS/Instituto Nacional do Câncer – INCA. (1)

No Brasil, a distribuição dos casos novos de câncer, segundo sua localização primária, é bem heterogênea. As regiões sul e sudeste apresentam uma das maiores taxas, sendo que no Rio Grande do Sul é a principal *causa mortis* entre mulheres de 20 a 49 anos de idade, sendo a média mensal de diagnóstico de 68 mulheres. (2)

Espera-se para 2008 uma incidência de 4.880 novos casos e, especificamente na capital, Porto Alegre, serão 950 casos novos. (1)

Investigações epidemiológicas indicam que fatores ambientais e genéticos são responsáveis pela incidência do câncer de mama, sendo que a hereditariedade provavelmente tenha participação restrita no desenvolvimento deste tipo de câncer. (3,4)

Os avanços nas técnicas de genética molecular resultaram na identificação de genes que, quando alterados, aumentam significativamente o risco de desenvolver câncer de mama, ovário e outros tipos de câncer. (5,6)

A literatura informa que, de todos os casos de câncer de mama hereditários, 80 a 90% são causados por mutações específicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. (7,8)

A descoberta do gene *BRCA1* foi produzida através de estudos de ligação por Hall *et al.* (1990), que localizou no braço longo do cromossomo 17 (17q 12-21), o provável *locus* do gene. Estas informações foram provenientes de estudos com perda de heterozigosidade em tecido tumoral, envolvido tanto em casos de câncer esporádico quanto familiar. (5,9,10,11)

Este gene, localizado no cromossomo 17, composto por 22 exons, com extensão de 100kb de DNA genômico que codifica uma proteína de 1.863 aminoácidos, parece ser responsável por cerca de 45-50% de todos os casos de câncer de mama hereditário e a chance de desenvolver este tipo de tumor, em alguma fase da vida, é de 56 a 85%. (5,12,13,14,15,16)

Posteriormente foi identificado um segundo gene, localizado no braço longo do cromossomo 13, que foi denominado *BRCA2*. Este gene é composto por 27 exons e codifica uma proteína de 3.418 aminoácidos. (17)

Este gene é descrito como sendo responsável por 30 a 40% de todos os casos de tumores de mama hereditários e a chance de desenvolver a neoplasia, aos 70 anos, é de até 86%. (5,18) Homens portadores desta mutação também apresentam uma chance significativamente maior de desenvolver câncer de mama, em torno de 6% aos 70 anos de idade, proporção que indica um aumento no risco de 100 a 200 vezes, em relação a homens não portadores. (19)

Até o momento, mais de 600 mutações no gene *BRCA1* e 500 no gene *BRCA2* foram identificadas. (20)

As evidências indicam que estes dois genes, em atividade normal, são supressores tumorais, envolvidos tanto em casos de câncer esporádico quanto familiar. (21)

Estudos posteriores, desenvolvidos por Hall *et al.* (1990), Miki *et al.* (1994), Weitzel *et al.* (1994) e Easton *et al.* (1995) estabeleceram a relação do *BRCA1* com o câncer de mama e ovário. (5,9,10,11)

As duas mutações mais freqüentes no gene *BRCA1* são: 185delAG e 5382insC, localizadas nos exons 2 e 20 do cromossomo 17, respectivamente, e correspondem a aproximadamente 19% de todas as mutações neste gene. (22)

A mutação mais freqüente, identificada no exon 11 do cromossomo 13, no gene *BRCA2*, é a 6174delT e corresponde a aproximadamente 8% das mutações neste gene. (23,24)

Estudos moleculares relacionados à presença de mutações, que podem causar predisposição ao desenvolvimento de alguns tipos de tumores, têm sido bem evidenciados. Estes estudos incluem a análise de certos grupos que, cientificamente comprovada, possuem maior suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer. Um desses grupos é o de judeus de origem Ashkenazi, onde um pequeno número de mutações causa a doença na maioria dos casos. (25,26)

Os judeus formam um grupo único, ligados por seu idioma, religião e costumes. Em razão da sua tradição de casamentos intra-religião e intracomunidade, várias doenças genéticas são mais comuns, incluindo alguns tumores. Os judeus de origem Ashkenazi são os descendentes da Europa Central e Oriental e atribuiu-se a ocorrência de efeito fundador como explicação para a disseminação destas mutações. (27)

Nesta população, estima-se que cerca de uma em quarenta mulheres seja portadora de uma dessas mutações mais comuns (23), enquanto entre as mulheres em geral, a frequência é de uma para oitocentas.

Primeiramente, foi observado que a mutação 185delAG, no gene *BRCA1*, aparecia em 1,1% das mulheres judias de origem Ashkenazi, a mutação 5382insC, no mesmo gene, aparecia em 0,2% dessas mulheres e no gene *BRCA2*, a mutação 6174delT, do tipo *frameshift*, aparecia com uma frequência mais elevada, de 1,4%. (23)

Um outro estudo apresentou as seguintes frequências para as referidas mutações: 1,0% para 185delAG, 0,3% para 5382insC e 0,6% para 6174delT. (24)

Posteriormente, foi observada a seguinte frequência para as mutações comuns nos genes *BRCA1* e *BRCA2*: 0,15% para 185delAG, 0,02% para 5382insC e 0,07% para 6174delT. (28)

REVISÃO DA LITERATURA

1. CÂNCER

A doença denominada câncer aplica-se ao crescimento desordenado de células de uma parte do organismo, que pode migrar para locais diferentes de seu órgão de origem. O câncer é composto por múltiplas etapas, nas quais um conjunto de eventos ocorre, contribuindo para a transformação celular e os subseqüentes estágios malignos. (29)

A doença se desenvolve através de modificações no comportamento de um pequeno número de células que deixam de responder aos mecanismos de controle devido a alterações em seu material genético, chamadas mutações. Estas mutações podem determinar profundas alterações no formato ou função celular e, assim, correspondendo ao mecanismo básico de formação de uma célula maligna. (29)

Como foi dito, o desenvolvimento do câncer segue um processo de múltiplos estágios, a partir da célula normal, caracterizado pelo acúmulo de alterações genéticas. (30)

Estas alterações podem ser herdadas ou adquiridas, levando a uma desordem progressiva dos mecanismos de controle do ciclo celular. A resposta das células aos danos ao seu material genético e sua habilidade de manter a estabilidade genética através de mecanismos de reparo é essencial na prevenção da iniciação e progressão tumorais. (29)

O câncer resulta quando uma célula fica livre de suas atribuições e deixa o seu aspecto anormal proliferar. As mutações que desencadeiam a transformação maligna, geralmente ocorrem nos genes que comandam a divisão celular ou que

controlam os processos de amadurecimento e morte celular, assim passando a crescer e multiplicar, originando o tumor. Três grupos de genes e eventos são os causadores desta desestabilização: ativação dos proto-oncogenes a oncogenes, inativação dos genes supressores tumorais e falha nos genes de reparo do DNA. (21,31)

Neste trabalho daremos ênfase aos genes supressores tumorais, que são o objetivo do nosso estudo.

Os genes supressores tumorais são os genes necessários para a regulação da proliferação e diferenciação celulares. A inativação destes genes e conseqüente perda da função controladora por eles exercida, favorece o aparecimento e/ou desenvolvimento de um tumor, ou seja, possuem ação anti-neoplásica que atuam na inibição das células malignas. (21,29)

Nestes genes, o crescimento deve ser controlado por diversos sinais externos, para manter um estado estável (homeostase). A falta de inibição do crescimento é uma das alterações fundamentais no processo da carcinogênese. As proteínas que vêm a frear a proliferação celular são os produtos dos genes supressores de tumor.

Mutações herdadas em uma das cópias de um gene supressor não são suficientes para determinar uma mudança de comportamento da célula. No entanto, quando sua segunda cópia se torna alterada por uma mutação somática (não herdada), a célula pode adquirir um comportamento neoplásico. (32)

1.1. CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama compreende o processo biológico que leva uma célula mamária normal a se transformar em uma célula maligna, com capacidade invasiva e metastática. (33)

O desenvolvimento de um carcinoma de mama é um processo que evolui em etapas sucessivas. O início do processo neoplásico, ou seja, a primeira transformação de uma célula normal em uma célula tumoral, parece prescindir pela ação de hormônios. Este carcinoma é originado por uma multiplicação anormal, exagerada e desordenada das células da mama (células epiteliais). Essas células dividem-se e formam mais células com uma velocidade maior que as normais, desencadeando o aparecimento de massas celulares denominadas neoplasias ou tumores (Figura 1). O carcinoma geralmente começa com um pequeno nódulo (tumor benigno) que com o tempo pode crescer e espalhar-se para áreas próximas (tumor maligno). As primeiras metástases, comumente, aparecem nos gânglios linfáticos das axilas. (33,34)

Figura 1. Carcinoma de Mama:



Fonte: Revista Super Interessante. Ano 15 – Edição 176, maio 2002.

Este tipo de câncer constitui-se um grave problema de saúde pública em todos os países, devido a sua alta incidência, alta morbi-mortalidade e o alto custo do tratamento. (1)

Além disso, o diagnóstico do tumor mamário vem acompanhado de temor, angústia, sofrimento, desinformação, dúvidas e incertezas na mente das mulheres acometidas, aumentando assim, de forma física e emocional, o problema que estão enfrentando.

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres (1). No Brasil, para o ano de 2008, espera-se 49.400 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres. (1)

Na região sudeste estima-se 68 casos a cada 100 mil mulheres, seguida da região sul, com 67 casos a cada 100 mil mulheres (Tabela 3). A cada ano, cerca de 23% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama (35), dados confirmados pelas estimativas do INCA que predizem cerca de 22% de novos casos.

Tabela 3 – Estimativas para o ano de 2008 das taxas brutas de incidências por 100.000 e de números de casos novos por câncer de mama feminino:

Regiões	Casos novos	Taxas brutas
Sul	9.500	67,09
Sudeste	28.430	68,12
Centro-Oeste	2.630	38,17
Nordeste	7.630	28,38
Norte	1.210	15,62

Fonte: MS/ Instituto Nacional do Câncer – INCA. (1)

Na região sul do país, desconsiderando os tumores de pele do tipo não-melanoma, é o tipo de câncer mais freqüente nas mulheres. É a primeira causa de morte por câncer em mulheres desta região e a capital, Porto Alegre, possui a 2^a incidência mais elevada do país. (1)

Em 2008 é previsto que as maiores taxas de incidência, por 100.000 mulheres, de câncer de mama, ocorrerão no estado do Rio de Janeiro, seguido pelo estado do Rio Grande do Sul e São Paulo. Para o Rio Grande do Sul são estimados 4.880 novos casos, com uma taxa de incidência de 85,50 casos para cada 100.000 mulheres. A capital, Porto Alegre, apresentará uma taxa bruta de incidência, por 100.000 mulheres, de 119,72 (Tabela 4). (1)

Tabela 4 – Estimativa para o ano de 2008 das taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100.000 mulheres:

Estados	Taxa bruta	Capital	Taxa bruta
Rio de Janeiro	92,77	Rio de Janeiro	120,93
Rio Grande do Sul	85,50	Porto Alegre	119,72
São Paulo	72,52	São Paulo	95,30
Paraná	56,16	Curitiba	76,02
Santa Catarina	52,02	Florianópolis	62,45
Distrito Federal	51,11	-	-
Pernambuco	44,82	Recife	87,90
Minas Gerais	42,46	Belo Horizonte	64,97
Ceará	35,65	Fortaleza	49,64
Bahia	24,92	Salvador	50,87

Fonte: MS/ Instituto Nacional do Câncer – INCA. (1)

Observa-se nas últimas décadas um grande avanço no conhecimento dos mecanismos biológicos que determinam a ocorrência de tumores malignos. O câncer de mama é hoje compreendido como uma doença resultante do acúmulo de alterações genéticas. A maioria destas alterações decorre de forma esporádica, ou seja, complexas interações entre o ambiente e a constituição genética do indivíduo.

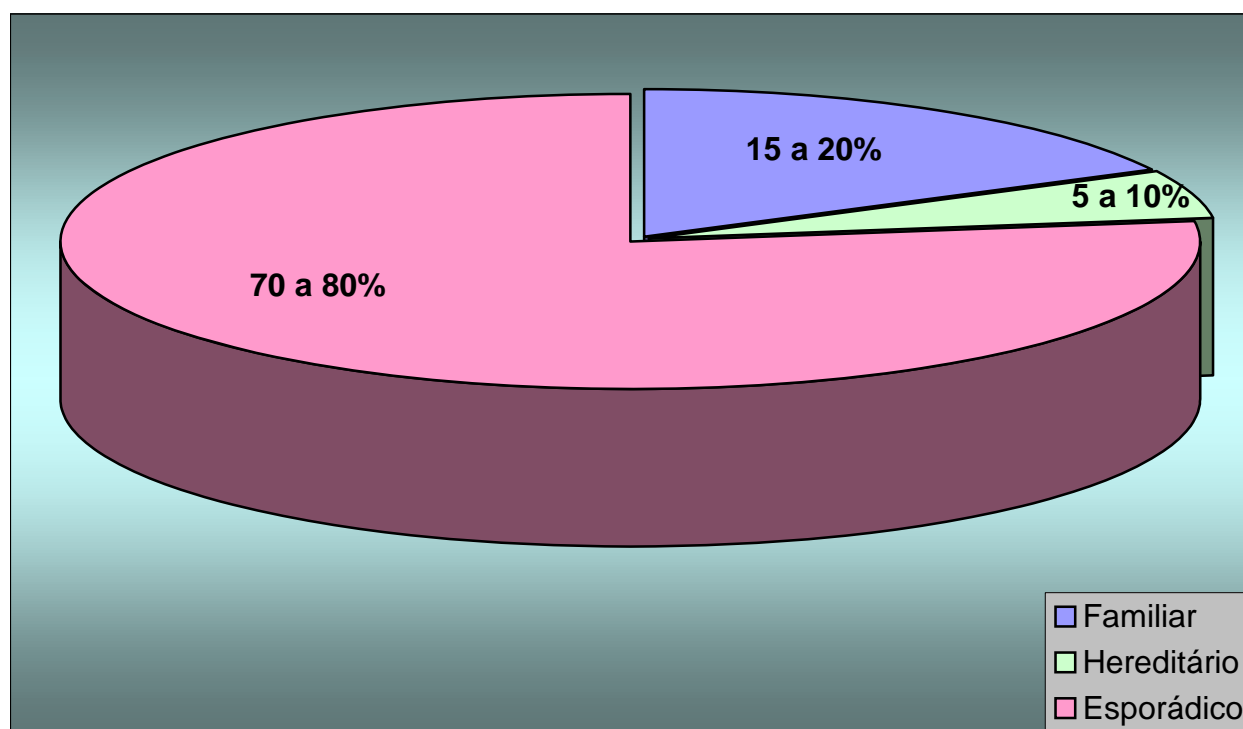
(33)

Geralmente ocorrem em um paciente sem histórico familiar de câncer de mama até o segundo grau, na família materna ou paterna. Os casos de câncer de

mama de origem familiar ocorrem em pacientes com histórico familiar em um ou mais parentes de primeiro ou segundo grau, da família materna ou paterna e que não se encaixam na definição de câncer de mama hereditário. (36)

Do total de casos dos tumores mamários diagnosticados a cada ano, estima-se que de 5 a 10% sejam hereditários, isto é, causados predominantemente por uma alteração genética herdada que confere ao seu portador um risco de câncer significativamente maior que o da população em geral (Figura 2). (37,38)

Figura 2 – Frequência estimada dos casos de câncer de mama:



Fonte: Adaptado de Wooster, 2003. (39)

Normalmente ocorre em uma idade mais precoce (em média aos 45 anos), com um excesso de casos bilaterais e uma frequência elevada de casos de câncer de ovário associados a um padrão de herança autossômica dominante. (37,38)

A identificação de indivíduos em risco para o câncer hereditário é importante, uma vez que os afetados apresentam risco cumulativo vital muito superior ao da população em geral e os familiares de um indivíduo afetado podem também estar predispostos ao desenvolvimento do tumor. (38, 39)

O câncer de mama é uma doença comum e, quando afeta dois ou mais membros de uma mesma família, pode ser em decorrência de puro acaso ou, às vezes, pode ser resultado do compartilhamento do mesmo fator ambiental. (40)

Suspeita-se da forma hereditária quando uma pessoa possui dois ou mais parentes de primeiro grau com o mesmo tipo de câncer ou tipos diferentes, que possam ser geneticamente relacionados, quando a doença é diagnosticada em idade precoce e quando se apresentam tumores bilaterais ou múltiplos. (41)

Por ser uma das doenças mais comuns que afetam as mulheres, é que um histórico familiar positivo torna-se um importante fator de risco epidemiológico para a doença.

1.2. FATORES DE RISCO PARA O CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença rara nos homens. No entanto, estudos indicam que uma em cada nove mulheres será afetada pela doença em algum momento de suas vidas e uma em cada treze mulheres que atingem os noventa anos no mundo ocidental. (42)

Diversos fatores físicos, químicos e biológicos, capazes de causar danos ao genoma, estão descritos em associação confirmada ao carcinoma mamário,

aumentando o risco de desenvolver a doença. Entre os itens descritos a seguir, a idade e a história familiar positiva são os fatores de maior relevância. (33)

Idade: A idade é de importância crítica, é um dos mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento do tumor mamário. O risco de desenvolver o câncer de mama muda dramaticamente com a idade, quanto maior a idade, maior o risco (Tabela 5). Mais de 80% dos tumores mamários ocorrem em mulheres acima dos 50 anos. A média de diagnóstico da doença é em torno dos 64 anos. As taxas de incidência aumentam abruptamente até os 50 anos e, posteriormente, seguem aumentando, porém, de forma mais lenta. Essa mudança no comportamento da taxa é conhecida na literatura como “*Clemmesen’s hook*” e tem sido atribuída à menopausa. (1)

Tabela 5 – Relação entre idade e Risco Cumulativo de desenvolvimento de câncer de mama em mulheres portadoras de mutações em *BRCA1* e *BRCA2*:

Idade (anos)	Riscos	
	Mutação em <i>BRCA1</i>	Mutação em <i>BRCA2</i>
30	3,2%	4,6%
40	19,1%	12%
50	50,8%	46%
60	54,2%	61%
70	85%	86%

Fonte: Adaptado de Ford, 1994; Antoniou, 2003; King, 2003. (43,44,45)

Condições ambientais: As condições ambientais são fatores de risco de grande importância para o desenvolvimento do câncer de mama. A dieta, como o consumo elevado de gordura saturada e carne e a toxicidade e a carcinogenicidade dos alimentos. Obesidade na pós-menopausa e consumo precoce e prolongado de álcool. Também são fatores de risco, classificados como complexos, no entanto relevantes, a região geográfica (Estados Unidos da América e países ocidentais, principalmente), exposição à radiação ionizante (na infância), ambientes próximos a indústrias, a etnia, a situação socioeconômica e os componentes culturais.

Vida reprodutiva da mulher: Todos estes fatores estão bem estabelecidos em relação ao desenvolvimento do tumor mamário:

- Menarca precoce: anterior aos 12 anos. Meninas que passaram a menstruar regularmente desde então, têm um risco aumentado em quatro vezes em relação às aquelas que apresentaram menarca aos 13 anos e que tiveram irregularidade menstrual nos primeiros ciclos;
- Nuliparidade: mulheres que encerram a fase reprodutiva sem nunca ter engravidado;
- Idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos. As mulheres que tiveram filhos antes dos 20 anos têm um risco reduzido de 1,9x a 3,5x. As gestações subsequentes exercem um impacto menor;
- Uso precoce e prolongado de anticoncepcionais orais (ACO);
- Menopausa tardia, acima dos 54 anos. Aos 45 anos, o risco diminui em 50% em relação aos 55 anos. Menstruar por mais de 40 anos, dobra o risco em relação às mulheres que menstruam por 30 anos;
- Terapia de Reposição Hormonal (TRH).

Histórico pessoal e familiar de câncer de mama: É de fundamental importância para avaliação dos riscos. É definido como histórico pessoal e familiar:

- História de doença benigna da mama;
- Famílias com três gerações de câncer de mama e/ou ovário;
- Indivíduos com câncer de mama e/ou ovário bilaterais;
- Famílias com câncer de mama em homens, associado a câncer de mama familiar;
- Famílias que apresentem dois casos de câncer de mama e/ou ovário entre parentes de 1º. grau com diagnóstico anterior aos 40 anos (período pré-menopausa).

A ocorrência de pelo menos uma dessas características, num mesmo grupamento familiar, sugere a existência de um componente genético hereditário que predispõe a doença. (46,47)

A importância da informação sobre a história familiar dos pacientes resulta de seu papel como fator de risco para várias doenças em geral, notadamente o câncer. (48,49)

A história familiar positiva é reconhecida como um dos fatores mais relevantes para estimar o risco pessoal de desenvolver câncer. (36,50)

Herança genética: Para uma pequena parcela da população, a herança genética tem uma importância maior. O risco de desenvolver um câncer de mama e/ou ovário pode ser maior entre os familiares de pacientes com uma dessas doenças. Nas situações em que o componente hereditário é conhecido, é possível identificar uma mutação genética que predispõe ao desenvolvimento do câncer. No entanto, devido ao fato da doença ser relativamente freqüente nos dias atuais,

devemos considerar o fato de que um ou dois familiares podem apresentar a doença, em decorrência do acaso, sem caracterizar uma situação de herança genética, talvez por compartilhar do mesmo fator de risco ambiental.

2. GENES SUPRESSORES TUMORAIS *BRCA1* E *BRCA2*

Com os rápidos avanços nas técnicas de Biologia Molecular, nas últimas décadas, foi possível definir o papel da hereditariedade no desenvolvimento do câncer.

Estes avanços resultaram na identificação de genes que, quando alterados, aumentam significativamente o risco de desenvolver câncer de mama, ovário e outros. (5,6)

Estes genes foram classificados como supressores tumorais, ou seja, atuam no sistema de reparo de danos no DNA e sua alteração desencadeia a função reguladora no crescimento celular. Para que um gene seja classificado como supressor tumoral é preciso que se determine que a sua mutação, deleção ou inativação funcional em células primordiais ou em células somáticas seja a causa fundamental da transformação maligna. (21)

Estes genes atuam na regulação da proliferação celular, mantendo-a sob controle e restringindo o crescimento celular, controlando uma rede protéica intracelular que respondem aos diversos sinais e modulam sua retransmissão ao núcleo. (21)

Os genes supressores tumorais são genes capazes de suprimir a formação de um tumor. São responsáveis pela função regulatória de crescimento celular, na

qual o efeito cancerígeno só vai aparecer quando eles estão ausentes ou são defeituosos nos dois cromossomos do genoma, ou seja, para eles perderem sua função ambos os alelos têm que estar afetados. (51,52,53)

Os principais mecanismos que inativam a função desses genes supressores são a perda de heterozigidade, metilação, alterações cromossômicas, mutações de ponto e ganho de função auto-inibitória. Dessa forma, quando esses genes perdem sua função eles não param o ciclo celular e não estimulam o sistema de reparo e a apoptose, provocando o efeito carcinogênico. (51,52,53)

Em 1990, Hall e colaboradores evidenciaram as primeiras demonstrações convincentes da localização de um gene ligado ao câncer de mama através de estudos genéticos de análise de ligação envolvendo famílias com numerosos casos deste tipo de câncer, verificando no braço longo do cromossomo 17 (17q21) a banda 21, provável *locus* do *BRCA1* (Figura 3). (9)

Neste mesmo ano, a geneticista Mary-Claire King buscava a identificação de um gene específico do câncer de mama. Procedeu então a seleção de famílias de alto risco, nas quais o tumor mamário parecia estar relacionado a marcadores polimórficos genéticos específicos, sem atividade biológica. Assim, selecionou o cromossomo 17, pois além de ser rico em genes, é sítio de vários outros genes que se relacionam com o desenvolvimento normal da mama e de células de câncer.

Estes genes poderiam ser candidatos ao câncer de início precoce ou outro tipo de câncer de mama. (54)

Em setembro de 1994, pesquisadores da Universidade de Utah divulgaram a descoberta de um gene, denominado *BRCA1*, como forte candidato a determinar a predisposição individual de até 85% em se desenvolver tumor mamário durante a vida, no caso deste gene apresentar mutações. (5,24,44,45)

O gene *BRCA1* possui herança autossômica dominante, é constituído por mais de 80kb, distribuídos em 24 exons, dos quais 22 codificam uma proteína e está envolvido no processo de proliferação celular, em resposta à estimulação hormonal, na apoptose e na recombinação. (5)

A proteína codificada por este gene possui 1.863 aminoácidos, com peso molecular de 220kd, a qual se localiza no núcleo de forma fosforilada; apresenta dois domínios: um domínio em anel (*ring*), próximo ao N-terminal (55) e um domínio BRCT ao C-terminal (56), sendo de difícil análise molecular. A mutação gerada nesta proteína ocasiona um defeito no reparo de danos ao DNA e a instabilidade genética, que favorecem a tumorigênese. (57) Este dado, através de estudos subseqüentes, foi associado a neoplasias de mama e de ovário.

Até o momento, foram descritas mais de 600 mutações no gene *BRCA1*. (20)

Estudos posteriores revelaram que, mulheres com mutações no gene *BRCA1* apresentam até 87% de chance de desenvolverem carcinoma de mama e de 40-60% de chance de desenvolver um carcinoma de ovário durante toda a vida. Ainda, 65% de chance de desenvolver um segundo carcinoma mamário se viverem até os 70 anos. (3,58,59)

As mutações hereditárias no gene *BRCA1* estão presentes em cerca de 80% dos casos de câncer de mama familiar. (60) Os pacientes com mutações no gene *BRCA1* apresentam menor tempo de sobrevida livre de doença e maior taxa de mortalidade, assim como maior tendência à bilateralidade. (61)

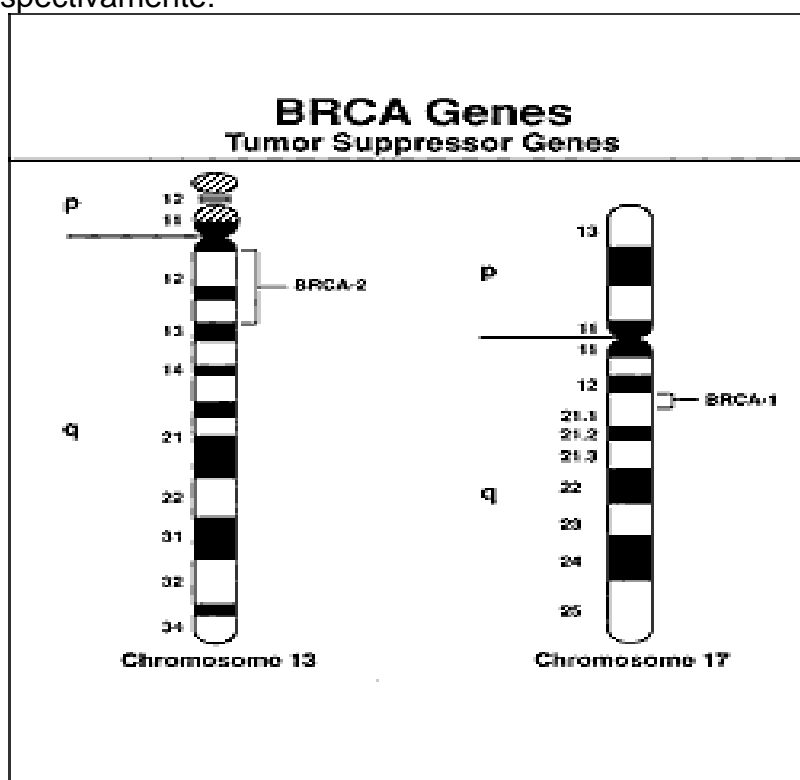
Posteriormente, um segundo *locus* foi identificado, localizado no braço longo do cromossomo 13 (13q12-13) (Figura 3) (6) denominado *BRCA2* (*Breast Cancer Gene 2*). Este gene, mais tarde, foi caracterizado e também relacionado a casos de câncer familiar e com surgimento em idade precoce, anterior aos 45 anos. (62)

O gene *BRCA2*, assim como o *BRCA1*, também é supressor tumoral e está envolvido na recombinação homóloga, porém pouco se sabe sobre as suas funções.

O gene é constituído por 10,4kb dispostas em 27 exons que codificam uma proteína de 3.418 aminoácidos, encontrada no núcleo da célula, em formato fosforilado. (63)

Foram referidas mais de 450 mutações neste gene, sendo as mais frequentes do tipo *frameshift* e *nonsense*, que produzem proteínas truncadas ou inativas. (24)

Figura 3 – Localização dos genes *BRCA2* e *BRCA1* nos cromossomos 13q e 17q, respectivamente:



Fonte: www.medichecks.com/Images/BRCA1_BRCA2.gif. (6,9)

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* estão implicados na Síndrome do Câncer de Mama Hereditário. Mulheres portadoras de mutações no gene *BRCA* possuem cerca

de 85% de chance (penetrância) de desenvolverem um tumor mamário durante toda sua vida. (3,58,64)

Embora mutações em vários genes tenham sido descritas em associação ao câncer de mama de origem familiar, estima-se que estes dois genes, *BRCA1* e *BRCA2*, sejam responsáveis por 80 a 90% dos casos. (65)

Inúmeros estudos têm estimado a frequência das mutações de regiões codificantes de *BRCA1* e *BRCA2* em famílias com câncer de mama e/ou ovário. (18,41,66,67)

Os resultados de uma análise de heterogeneidade baseada nos dados de ligação do *Breast Cancer Linkage Consortium* sugerem que 88% das famílias com pelo menos quatro casos de câncer de mama diagnosticados até os 60 anos de idade, e com pelo menos um caso de câncer de ovário, são atribuídos às mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, e em famílias com pelo menos dois casos de câncer de ovário e quatro casos de câncer de mama, o percentual das famílias mostra ligação com estes dois genes de 100%. (18)

Este dado sugere que as mutações ligadas aos genes *BRCA1* e *BRCA2* acometem a total maioria das famílias com susceptibilidade hereditária para ambos tipos de câncer: mama e ovário. (9,68)

Estudos indicam que o gene *BRCA1* parece ser responsável por metade dos casos de câncer de mama familiar, de 45 a 50%. Além disso, outros 30 a 40% dos casos podem ser creditados ao *BRCA2*. Os casos restantes provavelmente se devem a outros genes ainda desconhecidos.

A mulher que faz parte de uma família de alto risco para o desenvolvimento da doença e não apresenta mutações no gene tem a mesma chance de desenvolver a doença do que a população em geral.

Na ausência de mutações nesses genes, a probabilidade de uma mulher desenvolver o câncer de mama em alguma fase da sua vida está próxima de 10% na maior parte dos países desenvolvidos, enquanto o risco para o câncer de ovário é de aproximadamente 1%. Assim, não ser portador dessas alterações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* não significa estar livre desses tumores.

De 10 a 15% dos casos de câncer de mama são de origem familiar e cerca de um terço destes casos são devidos a mutações nos genes de predisposição *BRCA1* e *BRCA2*. Essas mutações são associadas ao desenvolvimento e diagnóstico precoce da doença, abaixo dos 45 anos. (8)

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* são muito extensos e, em função de seus tamanhos, tornam-se suscetíveis a inúmeras mutações. Algumas alterações da seqüência normal de *BRCA1* e *BRCA2* são variantes normais, chamados polimorfismos, e estes não apresentam um risco elevado para desenvolvimento de câncer, outras podem levar à doença. (69)

Estes genes são também associados a outros tipos de neoplasias. Mutações no *BRCA1*, além de mama e ovário, são relacionadas ao câncer de próstata (risco três vezes maior para seus portadores em comparação com o risco populacional global), enquanto alterações no gene *BRCA2* elevam o risco para câncer de mama em ambos os sexos, câncer de ovário, próstata, pâncreas, estômago e vias biliares. (69,70,71)

O segundo tipo de câncer mais freqüente, em alterações no gene *BRCA1*, é o câncer de ovário. Portadoras de mutações neste gene possuem um risco aproximado de 40 a 60% de chance de desenvolver a doença em algum momento da vida. Quanto ao *BRCA2*, a chance é de 10 a 20%.

Câncer de cólon é o terceiro mais freqüente, tanto em mulheres quanto em homens e as mutações ocorridas nos genes elevam a chance de desenvolvimento deste tipo de tumor em 6% durante a vida.

A identificação dos genes *BRCA1* e *BRCA2* provocou um grande impacto em nosso meio, não só pela prevalência do câncer de mama, mas também pela freqüência elevada de alterações nestes genes. Desta forma, tornaram-se os principais genes de predisposição descritos até o momento e, desencadearam inúmeros estudos visando a investigação de predisposição genética para o câncer de mama e ovário.

Estudos evidenciaram que, de todos os casos de câncer de mama hereditário, de 80 a 90% deles são causados por mutações específicas, nos genes supressores tumorais, denominados *BRCA1* e *BRCA2*. Outros genes de predisposição ao câncer de mama também foram identificados e são igualmente importantes no risco para a doença, como *p53*, *CHEK2*, *ATM*, *PTEN*, *STK11*, *TWIST1* e mais recentemente, *CDH1*, porém correspondem a uma parcela menor nos casos hereditários. Estas descobertas inauguraram uma nova era para a avaliação dos riscos. (72,73,74,75,76,77,78)

As mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis pela maioria dos casos de câncer familiar de mama e/ou ovário e, quanto às mutações somáticas, freqüentemente são detectadas nos eventos esporádicos. (79)

Estas mutações conferem ao seu portador, doente ou não, 50% de chance de transmiti-las para cada um dos seus filhos.

2.1. IDENTIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES ESPECÍFICAS

Após a descoberta destes genes, a ciência começou a investigar e melhor entender a maior ocorrência de câncer em algumas famílias, através de mutações específicas, que seriam transmitidas através das gerações.

Porém, a procura por uma mutação é um processo complexo e dispendioso, que depende do seqüenciamento completo dos genes. No entanto, se um membro da família apresentar uma mutação específica e esta for diagnosticada, todos os outros membros poderão realizar os testes para verificar se possuem a mesma mutação.

As mutações mais freqüentes, observadas no gene *BRCA1*, são a 185delAG e 5382insC. No gene *BRCA2* é a 6174delT. (25)

As três mutações citadas provocam uma mudança na matriz de leitura da fita de *mRNA*, acarretando, conseqüentemente, o término prematuro da síntese dessas proteínas, responsáveis por impedir a reprodução descontrolada das células.

A maioria das doenças associadas a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* resultam em terminação prematura dos códons e são devidas a pequenas alterações nos genes, apesar de pequenas deleções de grandes segmentos de *BRCA1* terem sido encontradas em células germinativas. (80)

Indivíduos que têm uma mutação em *BRCA1* ou *BRCA2* têm uma cópia normal de cada gene e uma cópia alterada. Cada membro de uma prole de homem ou mulher que for portador tem uma chance igual de herdar tanto uma cópia normal quanto uma cópia mutada. Os que receberem as cópias mutadas têm o risco bastante aumentado de desenvolver a neoplasia mamária.

Dessa forma, as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são segregadas conforme o padrão de herança autossômica dominante, onde 50% dos descendentes serão portadores de uma mutação e os outros 50% não herdarão uma mutação, tendo um risco de desenvolvimento de câncer de mama igual ao da população em geral. (81,82,83,84)

Um indivíduo pode ter três possibilidades de genótipo:

- 1) Portador de dois alelos não mutantes (condição homocigoto normal);
- 2) Portador de um alelo mutante e um alelo normal (condição heterocigoto);
- 3) Portador de dois alelos mutantes (condição homocigoto mutado)

Os dois últimos genótipos são afetados ou têm risco de serem afetados, baseado na penetrância do gene.

A existência de indivíduos homocigotos para genes relacionados à doença autossômica dominante é muito rara, particularmente devido à baixa probabilidade de ambos os progenitores serem portadores do gene mutado e, parcialmente, devido a um defeito potencialmente letal em um feto afetado de forma homocigota. (85)

Em estudos realizados, a morte aparece como resultado de uma completa falta de proliferação celular em ratas homocigotas, com dois alelos nulos (sem função) no *locus* do gene *BRCA1*. (86,87)

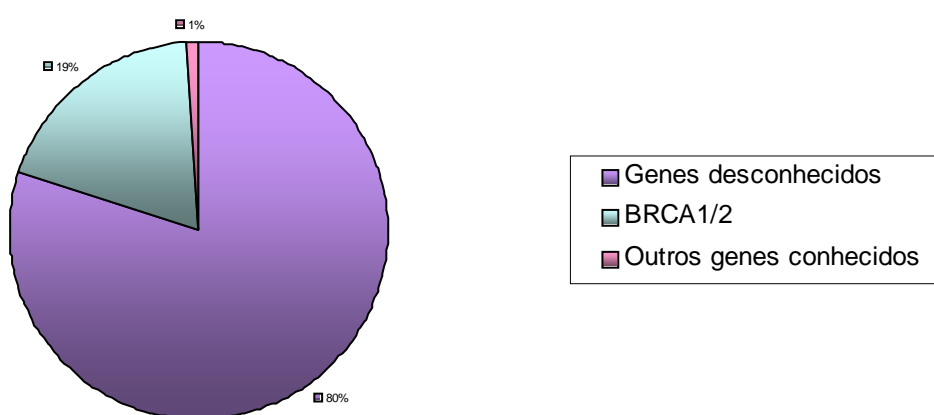
Cerca de 5% a 20% das mulheres com neoplasia de mama possuem história familiar, e um quarto herda anomalias cromossômicas autossômicas dominantes, principalmente mutações. (3,88)

Mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis por aproximadamente 20% do total do risco familiar observado (Figura 4). (89)

Os restantes 80% se devem a uma combinação dos efeitos produzidos por

mutações em genes conhecidos de elevada penetrância, como *p53*, *PTEN* e *ATM* (cerca de 1%) e alterações em genes ainda desconhecidos (Figura 4). (90)

Figura 4 – Contribuição genética para o câncer de mama:



Fonte: Adaptado de Ponder, 2001; Venkitaraman, 2002. (89,90)

3. JUDEUS DE ORIGEM ASHKENAZI

Para iniciar os comentários a respeito desta população é preciso conhecer um pouco de sua história e sua dispersão pelo mundo, para poder compreender quais os fatores que os relacionam tão intimamente à predisposição de doenças provenientes de herança genética.

Há cerca de 4.000 anos atrás, os hebreus surgiram no Oriente Médio. Conforme descrito na Bíblia, Abraão saiu de Ur, antiga cidade da Mesopotâmia, para

Israel. De Israel, os hebreus se dispersaram pelo mundo e formaram algumas comunidades: judeus Orientais, judeus Sefárdicos e judeus Ashkenazi.

Entre o sexto e o nono séculos, os judeus Ashkenazi migraram da Palestina para a Alemanha, ao longo do Rio Reno para a França e até o norte da Inglaterra.

Com a ascensão do Cristianismo e as Cruzadas, eles foram forçados a fugir, migrando para Polônia, Lituânia, Ucrânia e Rússia. Assim, estes judeus são classificados como descendentes da Europa Central e Oriental.

Dessa forma, o termo Ashkenazi tem sua origem em um vocábulo germânico que designava o povo que vivia na região onde hoje fica a Alemanha e foi apropriado pelos judeus que se estabeleceram nesta área.

As comunidades de judeus Ashkenazi (guetos) viviam isoladas, desde o século XII e a prática de casamentos consangüíneos era muito comum.

A Revolução Francesa permitiu que estes judeus pudessem sair à procura de locais com maior liberdade de expressão, migrando para o sul da África, Austrália, Nova Zelândia e Américas (Norte, Central e Sul).

Os judeus são um povo que até hoje mantém grande parte das tradições herdadas de seus antepassados, em especial, os casamentos intracomunidade.

3.1. SUSCETIBILIDADE GENÉTICA AO CÂNCER DE MAMA

Há muito tempo tem se observado a maior ocorrência de câncer em algumas famílias. Entretanto, somente durante as últimas décadas foi possível definir o papel da hereditariedade no desenvolvimento do câncer.

Os avanços na área da Biologia Molecular e da Genética, nas últimas décadas, permitiram o estabelecimento de uma correlação direta entre a presença de mutações germinativas em genes de suscetibilidade e predisposição do desenvolvimento do tumor mamário. (91)

Algumas mutações são mais prevalentes em indivíduos de grupos étnicos específicos ou geográficos. Isso se deve à presença de mutações iniciadoras nesta população, que provavelmente surgiram há várias gerações. (92)

Simard e colaboradores, em 1994, identificaram duas mutações recorrentes no gene *BRCA1* (185delAG e 5382insC) em uma série de famílias em Quebec, Canadá. Os autores descobriram que estas mutações estavam presentes em ancestrais judeus e denominaram-nas mutações fundadoras. Posteriormente relacionou-se outra mutação fundadora no gene *BRCA2* (6174delT). (27)

A história familiar positiva é reconhecida como um dos fatores de risco mais relevantes para estimar o risco pessoal de desenvolver a neoplasia mamária. (50)

Mulheres que apresentam histórico familiar possivelmente carregam um componente genético e ambiental no desenvolvimento da neoplasia. Pesquisas de genética molecular evidenciaram que mulheres com mutações em *BRCA1* e *BRCA2* possuem características clínicas e familiares distintas, as quais podem ser utilizadas para selecionar os indivíduos que se beneficiariam de um teste molecular para pesquisa de mutações nestes genes. (3)

De 50 a 85% das mulheres, portadoras de mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, um dia terão câncer de mama, normalmente de diagnóstico precoce. A presença de alterações nesses genes também aumenta, substancialmente, o risco de câncer de ovário (de 20 a 40% no decorrer da vida). (43,44,45)

A identificação de ancestralidade Judaica Ashkenazi é particularmente importante, visto que modelos de probabilidade de algumas mutações incluem esta etnicidade como um fator de risco. (93)

Esta característica genética, entretanto, aumenta muito a probabilidade de herança das mutações em *BRCA1* e *BRCA2*. Nas mulheres com câncer de mama, mutações são encontradas em aproximadamente 0,3%; na população das mulheres em geral, em 0,12%. (94) Nas mulheres judias Ashkenazi, da comunidade em geral, as mutações ocorrem em 1% e nas mulheres com casos de câncer de mama, as mutações ocorrem em 4%. (95)

Estudos demonstram que mutações nesses genes ocorrem em cada 500 a 800 mulheres, mas entre os judeus de ascendência Ashkenazi a prevalência é muito alta. Cerca de um em quarenta judeus Ashkenazi é portador de mutação em *BRCA1* ou *BRCA2*. (23,24,96)

Na população judaica Ashkenazi, um pequeno número de mutações causa a doença na maioria dos casos. (25,26)

Duas mutações em *BRCA1* e uma mutação em *BRCA2* são responsáveis pela grande maioria dos casos de câncer de mama e de ovário familiar nas mulheres desta população, estimando-se que cerca de 2,5% dos indivíduos seja portador. (23)

Estima-se que 7,5% das mulheres não judias e 38% de mulheres judias com câncer de mama inferior a trinta anos possuam mutações germinativas nos genes *BRCA*. (97)

Os judeus formam um grupo único, ligados por sua religião, cultura, idioma e tradições. Em decorrência da união deste povo, desde as origens até os dias atuais, e em função de todos os eventos relatados acima, atribui-se à ocorrência de um

efeito fundador. Por este motivo, estas mutações são mais comuns nessa população e a sua transferência se propaga através das gerações.

Dessa forma, os estudos genéticos servem como ferramenta para reconstruir a história desta população, onde se estima que a aproximadamente 600 anos atrás houve a ocorrência de um efeito fundador como causador da incidência das mutações que prevalecem até hoje.

Os dois genes de predisposição ao câncer, *BRCA1* e *BRCA2*, são muito estudados e têm sido relatados com frequência, associados à elevada ocorrência de mutações específicas nesta população. (98)

No gene *BRCA2*, foi identificada a mutação 6174delT. Esta mutação confere um risco de predisposição ao tumor mamário de 56 a 85% e de 15 a 44% ao tumor de ovário, em alguma fase da vida. (23,24)

Estima-se que cerca de um em quarenta judeus Ashkenazi é portador de mutação em *BRCA1* ou *BRCA2*. (23,24,96)

Em mulheres com histórico familiar, como a descendência judaica Ashkenazi, após a identificação da mutação de uma das afetadas, torna-se viável desenhar um exame específico para esta mutação, através de *PCR*, que pode ser realizado em todas as mulheres desta família.

Atualmente, existem aproximadamente dez milhões de judeus Ashkenazi em todo o mundo.

No Rio Grande do Sul, existem cerca de doze mil judeus, sendo que em Porto Alegre, sede do nosso estudo, são aproximadamente nove mil judeus.

Em populações não-judaicas, a maioria das mutações são privadas, ou seja, aparecem em apenas uma ou poucas famílias. (92)

4. ACONSELHAMENTO GENÉTICO

A descoberta do DNA trouxe significativas transformações no que se refere ao suporte preventivo e terapêutico de muitas patologias, principalmente as de origem hereditária.

A associação do câncer com fatores genéticos hereditários gera medo, angústia, sofrimento e muita preocupação por parte dos pacientes e também dos familiares, que acompanham todo o histórico de eventos envolvidos a partir do diagnóstico. O tratamento, as perspectivas e também a dúvida em relação à suscetibilidade familiar aumenta a procura de informações através da televisão, rádio, jornais, revistas, *internet* e apoio junto a especialistas, a fim de conhecer, entender e, possivelmente, minimizar os riscos e incertezas.

O AG (Aconselhamento Genético) foi estabelecido em 1975 pela Sociedade Americana de Genética Humana e o termo foi definido como um “processo de comunicação que trata dos problemas humanos causados pela ocorrência de uma doença genética na família” (*Ad Hoc Committee of the American Cancer Society of Human Genetics – ASHG*).

Com este objetivo, o Aconselhamento Genético foi definido como um processo de comunicação que lida com os problemas associados à ocorrência ou à possibilidade de ocorrência de um distúrbio genético em uma família, ou seja, visa estabelecer e explicar o risco individual e familiar, mostrar alternativas de tratamento, profilaxia, desenvolvimento e histórico da doença e, principalmente, fornecer proteção à privacidade e confidencialidade da informação genética, suporte para esclarecer os fatos que envolvem a doença e a tomada de decisão voluntária,

transmitindo segurança, confiabilidade e amparo psico-social e afetivo relacionado ao impacto e manejo dos resultados genéticos.

Atualmente existem programas de Aconselhamento Genético com a finalidade de identificar indivíduos com maior risco para o desenvolvimento do câncer de mama, a fim de promover uma intervenção, buscando reduzir o sofrimento e a mortalidade por tumor mamário.

Um resultado de teste molecular positivo confirma que a paciente tem um risco elevado, em relação à população em geral, de desenvolver o câncer de mama. Algumas famílias podem decidir sobre procedimentos, incluindo cirurgias. Por essas razões, a paciente deve ter a oportunidade de conhecer todos os profissionais que poderão lhe dar suporte, como geneticistas, oncologistas e cirurgiões.

No futuro, a identificação das mutações genéticas específicas que ocorrem nos tumores poderá ser aplicada como método diagnóstico e prognóstico. Uma melhora na compreensão desses mecanismos moleculares, enfatizando o desenvolvimento do câncer de mama pode, eventualmente, produzir novas estratégias terapêuticas que interfiram na história natural do tumor.

Dessa forma, pode-se oferecer às pacientes portadoras de mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* opções de conduta para detecção precoce do tumor (Tabela 6).

Tabela 6 – Opções de conduta para mulheres com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*:

Exames de Detecção precoce	Quimioprofilaxia	Cirurgia Profilática
<u>Auto-exame</u> : Mensal, iniciando-se aos 18-21 anos de idade;	<u>Anti-estrogênios</u> (<i>Tamoxifeno</i>)	<u>Mastectomia simples bilateral</u> (não elimina totalmente o risco pois podem restar células de tecido mamário)
<u>Exame clínico pelo médico</u> : A cada 6-12 meses, iniciando-se aos 25-35 anos de idade;		
<u>Mamografia anual</u> : Iniciando-se aos 25-35 anos de idade.		

Fonte: *Cancer Genetics Studies Consortium*, 1997. (99)

Cabe salientar a questão referente à discriminação, no que diz respeito aos testes preditivos de doenças genéticas. A identificação de uma mutação não é condição pré-existente da doença, ou seja, a presença de uma mutação não é o diagnóstico da doença, é uma indicação da pesquisa genética que deve orientar a paciente sobre todos os fatores de risco e as alternativas profiláticas do tumor mamário.

A possibilidade de identificar indivíduos de elevado risco para o desenvolvimento de câncer traz a possibilidade de uma abordagem preventiva e de detecção precoce do câncer. Por outro lado, levanta outras questões médicas, psicológicas e éticas. Com o objetivo de regulamentar os aspectos éticos envolvidos na investigação genética de câncer familiar, é que a partir de 1996 a *ASCO* (*American Society of Clinical Oncology*) estabeleceu os princípios que regulamentam os testes de suscetibilidade ao câncer:

- 1- Informação pré-teste, onde o médico geneticista explica claramente a doença, esclarecendo os riscos e os benefícios do teste;
- 2- O AG deve ser individualizado e não direcionado, de modo que o geneticista não interfira na decisão do paciente em realizar ou não o teste;
- 3- O Consentimento Informado (CI) deve conter informações detalhadas sobre o teste de DNA e ser assinado pelo indivíduo candidato ao teste ou pelo responsável;
- 4- O aconselhamento pós-teste, onde o geneticista comunica o “risco” e as opções terapêuticas preventivas e o acompanhamento clínico adequado;
- 5- O teste genético e a identidade do indivíduo são confidenciais.

Se após a análise do histórico familiar e resultado positivo, nos testes genéticos, para uma das mutações e constatação de doença hereditária, os demais membros da família devem ser investigados, para verificar se herdaram a mesma mutação.

Caso contrário, se após avaliação de uma família com alta incidência de câncer de mama, apresentar um resultado negativo nos testes genéticos, não significa que o desenvolvimento dessas doenças não esteja associado a uma predisposição genética. Existem outras possibilidades que devem ser consideradas, como uma falha nas técnicas disponíveis para identificar alterações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, alterações da função do *BRCA1* ou *BRCA2* determinadas por mutações em outros genes e, também, a presença de um outro gene ainda desconhecido que poderia estar associado à suscetibilidade e/ou predisposição de desenvolvimento do tumor em questão.

A recomendação de testes genéticos para investigação de suscetibilidade e/ou predisposição genética ao câncer de mama, com suspeita de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, segue alguns critérios. Mulheres com:

- Câncer de mama ou ovário em idade jovem (anterior à menopausa);
- Câncer de mama bilateral a qualquer idade;
- Câncer de mama e ovário a qualquer idade;
- Câncer de mama ou ovário a qualquer idade mais dois parentes de primeiro ou segundo grau com câncer de mama ou ovário;
- Câncer de mama ou ovário a qualquer idade mais um parente de primeiro ou segundo grau com câncer de mama ou ovário em idade jovem (anterior à menopausa);
- Homens ou mulheres com história familiar de câncer de mama ou ovário em dois ou mais parentes de primeiro ou segundo graus;
- Homens com câncer de mama;
- Parentes de primeiro ou segundo grau de indivíduo com mutação nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*.
- Judeus de origem Ashkenazi.

O maior benefício do AG e, conseqüentemente, dos testes genéticos é a avaliação precisa do risco individual para o desenvolvimento das doenças hereditárias. Assim, não apenas os pacientes, como também seus familiares, podem ser investigados e, dependendo do risco estimado, serem incluídos em programas de rastreamento e prevenção.

Atualmente, todos os centros internacionais preconizam a realização do Aconselhamento Genético como parte obrigatória da investigação de anormalidades

dos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Desta forma, é possível fornecer aos pacientes toda informação preliminar à realização do teste e o suporte adequado para implementação das medidas que se fizerem necessárias após sua conclusão.

No Brasil, os Serviços de Genética estão em processo de desenvolvimento.

Nas últimas décadas, dezenas de Serviços de Genética e Câncer foram criados, principalmente nos hospitais universitários das capitais, proporcionando assim maior viabilidade na procura destes serviços.

No país, os testes genéticos para detecção precoce das mutações comuns em *BRCA1* e *BRCA2* poderiam ser oferecidos às mulheres com câncer de mama diagnosticado antes dos cinquenta anos ou com história familiar de câncer de mama e/ou ovário em parentes de primeiro grau. (100)

JUSTIFICATIVA

Atualmente, o câncer de mama constitui-se em um grave problema de saúde pública. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. No Brasil, estimativas recentes do INCA indicam que este tumor é associado ao maior número de mortes em mulheres, prevendo para o ano de 2008 a ocorrência de 51 casos para cada 100 mil mulheres. Na região Sul do Brasil, este risco eleva-se para 67 casos para cada 100 mil mulheres. (1)

Estudos indicam que a maioria dos processos neoplásicos ocorre a partir de interações entre os fatores ambientais e a constituição genética do indivíduo.

Estima-se que os fatores hereditários estejam envolvidos em até 10% do total de casos de câncer diagnosticados a cada ano, conferindo aos portadores um risco de desenvolvimento do tumor significativamente maior que o da população em geral. (38)

A observação epidemiológica de que mulheres judias apresentam maior suscetibilidade ao tumor mamário foi comprovada e explicada pela análise de DNA dos genes supressores tumorais *BRCA1* e *BRCA2*.

Dessa forma, deve-se propor um mecanismo de controle e diagnóstico precoce da doença, para assim poder ampliar a sobrevivência, diminuir a mortalidade e minorar o sofrimento físico e psicológico das mulheres afetadas, proporcionando um exame que possa diagnosticar as chances de vir a ter um tumor, através da análise por *PCR* das duas principais mutações que ocorrem no gene supressor tumoral *BRCA1*.

A detecção de uma das mutações pode representar um alívio da incerteza do risco futuro, proporcionando às pacientes, através de acompanhamento médico, maiores informações a respeito do seu risco real e a tomada de decisão sobre as condutas profiláticas, como intensificação da vigilância, cirurgias, quimioprevenção e eliminação dos demais fatores de risco.

OBJETIVOS

- Verificar a frequência das mutações 185delAG e 5382insC, no gene *BRCA1*, em mulheres da população judaica Ashkenazi de Porto Alegre.

- Testar e estabelecer as técnicas de Biologia Molecular, já descritas na literatura (101), como rotina laboratorial, visando realizar testes preditivos para câncer de mama para detecção das mutações específicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer (INCA), Ministério da Saúde, 2007. Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 28 Fev. 2008.
2. Bittencourt R, Scaletzky A, Boehl JAR. Perfil epidemiológico do câncer na rede publica em Porto Alegre – RS. Rev Bras Cancerologia. 2004; 50(2): 95-101.
3. Andersen TI. Genetic heterogeneity in breast cancer susceptibility. Acta Oncologica. 1996; 35(4): 407-10.
4. Koifman S, Koifman RJ. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. Mutation Research. 2003; 544: 305-11.
5. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshmann K, Tavtigian S, Liu Qingyiun, *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. Science. 1994; 266: 66-71.
6. Wooster R. ,Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, *et al.* Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. Science. 1994; 265: 2088-90.
7. Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP and 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.
8. Newman B, Mu H, Butler LM, Milliken RC, Moorman PG, King MC. Frequency of breast cancer attributable to *BRCA1* in a population-based series of American women. JAMA. 1998; 279: 915-21.

9. 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.
10. Weitzel JN, Patel J, Smith DM, Goodman A, Safaii H, Ball H. Molecular genetic changes associated with ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. 1994; 55: 245-52.
11. Easton DF, Ford D, Bishop DT. Breast Cancer Linkage Consortium. Breast and ovarian cancer incidence in *BRCA1*-mutation carriers. *Am J Hum Genet*. 1995; 56(1): 265-71.
12. Neuhausen S, Marshall C. Loss of heterozygosity in familial tumors from three *BRCA1*-linked kindreds. *Cancer Research*. 1994; 54: 6069-72.
13. Weber BL, Abel KJ, Brody LC, Flejter WL, Chandrasekharappa SC, Couch FJ, Merajver SD, Collins FS. Familial breast cancer. Approaching the isolation of a susceptibility gene. *Cancer*. 1994; 74: 1013-20.
14. Boyd M, Harris F, McFarlane R, Davidson HR, Black DM. A human *BRCA1* gene knockout (letter). *Nature*. 1995; 375(6532): 541-2.
15. Coughlin SS, Khoury MJ, Steinberg KK. *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations and risk of breast cancer. Public health perspectives. *Am J Prev Med*. 1999; 16(2): 91-8.
16. Gayther SA, Harrington P, Russel P, Kharkevich G, Garkavtseva RF, Ponder BA. Rapid detection of regionally clustered germ-line *BRCA1* mutations by multiplex heteroduplex analysis. UKCCCR Familial Ovarian Cancer Study Group. *Am J Hum Genet*. 1996; 58(3): 451-6.

17. Cohen MM. Statement of the American Society of Human Genetics on genetic testing of breast and ovarian cancer predisposition. *Am J Hum Genet.* 1994; 55: I-IV.
18. Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod S, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT, *et al.* Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer families. *Am J Hum Genet.* 1998; 62: 676-89.
19. Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in *BRCA2* mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 1310-16.
20. The Human Gene Mutation Database, Cardiff. Disponível em www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg. Acesso em Jul 2006.
21. Macleod K. Tumor Suppressor Genes. *Curr Opin Genet Dev.* 2000; 10: 81-93.
22. Shattuck-Eidens D, McClure M, Simard J, *et al.* A collaborative survey of 80 mutations in the *BRCA1* breast and ovarian cancer susceptibility gene. *JAMA.* 1995; 273: 535-41.
23. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Nat Genet.* 1996; 14: 185-7.
24. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, *et al.* The risk of cancer associated with specific mutations of *BRCA1* and *BRCA2* among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med.* 1997; 336: 1401-8.
25. Abeliovich D, Kaduri L, Lerer I, Weinberg N, Amir G, Sagi M, Zlotogora J, Heching N, Peretz T. The founder mutations 185delAG and 5382insC in *BRCA1* and 6174delT in *BRCA2* appear in 60% of ovarian cancer and 30% of early-onset breast cancer patients among Askenazi women. *Am J Hum Genet.* 1997; 60: 505-14.

26. Tonin P, Weber B, Offit K, *et al.* Frequency of recurrent *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer families. *Nature Med.* 1996; 2: 1179-83.
27. Simard J, Dumond M, Moisan AM, Gaborieaus V, Malouin H, Durocher F, Chiquette J, Plante M, Avard D, Bessete P, *et al.* Evaluation of *BRCA1* and *BRCA2* mutation prevalence, risk prediction models and a multistep testing approach in French-Canadian families with high risk of breast and ovarian cancer. *J Med Genet.* 2007; 44(2): 107-21.
28. Tobias DH, Eng C, McCurdy LD, Kalir T, Mandelli J, Dottino PR, Cohen CJ. Founder *BRCA1* and 2 mutations among a consecutive series of Ashkenazi Jewish ovarian cancer patients. *Gynecol Oncol.* 2000; 78(2): 148-51.
29. Bau DT, Mau YC, Shen CY. The role of *BRCA1* in non-homologous end-joining. *Cancer Lett.* 2006; 240(1): 1-8.
30. Vogelstein B and Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004; 10: 789-99.
31. Lanfrancone L, Pelicci G, Pelicci PG. *Cancer genetics.* 1994; 4(1): 109-19.
32. Simao TA, Ribeiro FS, Amorim LM, Albano RM, Andrada-Serpa MJ, Cardoso LE, *et al.* TP53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio de Janeiro, Brazil: association with risk factors and tumor characteristics. *Int J Cancer.* 2002; 101(1): 69-73.
33. Veronesi U, Luini A, Costa A, Andreoli C. *Mastologia Oncológica.* Rio de Janeiro. Medsi. 2002. 580p.
34. Machniewicz PH, Faucz FR. Associação de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. *Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.* 2003. 31 ed. v. 6, n. 31.

35. Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P. Global Cancer Statistics. *Cancer J Clin.* 2005; 55: 74-108.
36. Hulka BS, Moorman PG. Breast cancer: hormones and other risk factors. 2001; 38(1): 103-13.
37. Walsh T, Casadei S, Coats KH, *et al.* Spectrum of mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* and *TP53* in families at high risk of breast cancer. *Jama.* 2006; 295(12): 1379-88.
38. Hartikainen JM, Kataja V, Pirskanem M, *et al.* Screening for *BRCA1* and *BRCA2* mutations in eastern finnish breast/ovarian cancer families. *Clinical Genetics.* 2007; 72: 311-20.
39. Wooster R., Weber BL. Breast and Ovarian Cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348: 2339-2347.
40. Fostira F, Thodi G, Konstantopoulos I, Sandaltzopoulos R, Yannoukakos D. Hereditary cancer syndromes. *J Byon.* 2007; 1: 13-22.
41. Narod S, Ford D, Deville P, Barkardottir RB, Eyfjord J, Lenoir G, Serova O, Easton D, Goldgar D. Genetic heterogeneity of breast ovarian cancer revisited. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet.* 1995; 57(4): 857-8.
42. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DEC, *et al.* Prevalence and penetrance of germline *BRCA1* and *BRCA2* mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet.* 2001; 68: 700-10.
43. Ford D, Easton DF, Bishop DT, *et al.* Risks of cancer in *BRCA1*-mutation carriers: Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet.* 1994; 343: 692-5.
44. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, *et al.* Average risks of breast and ovarian cancer associated with *BRCA1* and *BRCA2* mutations detected in case series

- unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet.* 2003; 72: 1117-30.
45. King M-C, Marks JH, Mandell JB, et al. Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Science.* 2003; 302: 643-6.
 46. Rosenthal TC, Puck SM. Screening for genetic risk of breast cancer. *Am Fam Phys.* 1999; 59(1): 99-104.
 47. Kerr P, Ashworth A. New complexities for *BRCA1* and *BRCA2*. *Curr Biol.* 2001; 11: 668-76.
 48. Eberl MD, Sunga A, Farrel C, Mahoney M. Patients with a family history of cancer: identification and management. *Journal of the American Board of Family Medicine.* 2005; 18: 211-7.
 49. Kelly KM, Shedlosky-Shoemaker R, Porter K, et al. Cancer Family History Reporting: Impact of Method and Psychosocial Factors. *Journal of Genetic Counseling.* 2007; 16(3): 373-82.
 50. Hall IJ, Burke W, Coughlin S, Lee NC. Population-Based Estimates of the Prevalence of Family History of Cancer Among Women. *Community Genetics.* 2001; 4: 134-2.
 51. Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia Celular e Molecular.* Rio de Janeiro. 2000. 7 ed. p 292-5.
 52. Hill ADK. Hereditary Breast Cancer. *The Brit J of Sur.* 1997; 84(10):1334-39.
 53. Greene MH. Genetics of Breast Cancer. *Mayo Clin Proc.* 1997; 72(1): 54-65.
 54. Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King M-C. Confirmation of *BRCA1* by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in the families. *Nat Genet.* 1994; 8: 399–404.

55. Boddy, MN, *et al.* The *p53*-associated protein MDM2 contains a newly characterized zinc-binding domain called the RING finger. *Trends Biochem Sci.* 1994; 19: 198-9.
56. Bork, P. *et al.* A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins. *FASEB J.* 1997; 11: 68-76.
57. Dorssers LC, *et al.* The prognostic value of *BRCA1* in patients with primary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(18): 6194-202.
58. Pharoah, P.D. *et al.* Family history and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer.* 1997; 71: 800-9.
59. Ellisen L. & Haber D. Hereditary breast cancer. *Ann. Rev. Med.* 1998; 49: 425-36.
60. Lee JS, Wacholder S, Struewing JP, AcAdams M, Pee D, Brody LC, *et al.* Survival after breast cancer in Ashkenazi Jewish *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91: 259–63.
61. Verhoog LC, Brekelmans C, Seynaeve C, Van Den Bosch L, Dahmen G, Van Geel AN, *et al.* Survival and tumour characteristics of breast-cancer patients with germline mutations of *BRCA1*. *Lancet.* 1998; 351(9099): 316-21.
62. Tavtigian SV, Simard J, Rommens J, Couch F, Shattuck-Eidens D, Neuhausen S, *et al.*, The complete *BRCA2* gene and mutations in chromosome 13q-linked kindreds. *Nat. Genet.* 1996; 12: 333-7.
63. Bertwistle D, Swift S, Marston NJ, Jackson LE, Crossland S, Crompton MR, Marshall CJ, Ashworth A. Nuclear location and cell cycle regulation of the *BRCA2* protein. *Cancer Res.* 1997; 57: 5485-8.
64. Brody L, Biesecker B. Breast cancer susceptibility genes, *BRCA1* and *BRCA2*. *Medicine.* 1998; 77: 208-26.

65. Hoffmann W; Schalag PM. *BRCA1* and *BRCA2* Breast Cancer Susceptibility Genes. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2000; 126(9): 487-96.
66. Couch FJ, DeShano ML, Blackwood A, *et al*. *BRCA1* mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med*. 1997; 336: 1409-15.
67. Moslehi R, Chu W, Karlan B, *et al*. *BRCA1* and *BRCA2* mutation analysis of 208 Ashkenazi Jewish women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet*. 2000; 66: 1259–72.
68. Wooster R, Bignell G, Lancaster JM, *et al*: Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature*. 1995; 378: 789-92.
69. Welcsh PL, King MC. *BRCA1* and *BRCA2* and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum Mol Genet*. 2001; 10(7): 705-13.
70. Offit K. *Clinical Cancer Genetics – Risk, Couseling and Management*. Willey Liss, New York. 1998; pp: 66-156.
71. Brose MS, Rebbeck TR, Calzone KA, Stopfer JE, Weber BL. Cancer risk estimates for *BRCA1* mutation carriers identified in a risk evaluation program. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94: 1365-72.
72. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JR JF, Nelson CE, Kim DH, *et al*. Germ line *p53* mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, ans other neoplasms. *Science*. 1990; 250: 1233-8.
73. Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE, *et al*. Heterozygous germ line *hCHEK2* mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science*. 1999; 286: 2528-31.

74. Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, *et al.* A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*. 1995; 268: 1749-53.
75. Lynch ED, Ostermeyer EA, Lee MK, Arena JF, Ji H, Dann J, *et al.* Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, cowden disease, and juvenile polyposis. *Am J Hum Genet*. 1997; 61(6): 1254-60.
76. Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR, Offerhaus GJ, Gittelsohn AM, Booker SV, *et al.* Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N Engl J Med*. 1987; 316: 1511-4.
77. Sahlin P, Windh P, Lauritzen C, Emanuelsson M, Gronberg H, Stenman G. Women with Saethre-Chotzen syndrome are at increased risk of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2007; 46(7): 656-60.
78. Hagoel L, Neter E, Dishon S, Barnett O, Rennert G. *BRCA1/2* mutation carriers: living with susceptibility. *Community Genet*. 2003; 6: 242-8.
79. Eeles R. Testing for the breast cancer predisposition gene, *BRCA1*. *BMJ*. 1996; 313(7057): 572-3.
80. Welsh PL; Schubert EL; King M-C. Inherited Breast Cancer: an emerging picture. *Clinical Genetics*. 1998; 54(6): 447-58.
81. Frank TS, Manley SA, Olopade OI, *et al.* Sequence analysis of *BRCA1* and *BRCA2*: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 2417-25.
82. Foulkes WD, Wong N, Brunet JS, Begin LR, Zhang JC, Martinez JJ, Rozen F, Tonin PN, Narod SA, Karp SE, Pollak MN. Germ-line *BRCA1* mutation is an adverse prognostic factor in Ashkenazi Jewish women with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1998; 3: 2465-9.

83. Bennett IC, Gattas M, Teh BT. The management of familial breast cancer. *Breast*. 2000; 9(5): 247–63.
84. Fodor FH, Weston A, Bleiweiss IJ, *et al.* Frequency and carrier risk associated with common *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer patients. *Am J Hum Genet*. 1998; 63(1): 45–51.
85. Weber BL; DeMichele. Inherited Genetic Factors. *Disease of the Breast*. 2000; 2: 221-35.
86. Holt JT; Thompson ME; Szabo C *et al.* Growth retardation and Tumour Inhibition by *BRCA1*. *Nat Genet*. 1996; 12: 298-302.
87. Rimoin DL, Connor JM; Pyeritz RE. Breast Cancer. In Emery and Rimoin`s Principles and Practice of Medical Genetics. Churchill Livingstone. New York. 1997. 3ed.
88. Lidereau, R. Major improvement in the efficacy of *BRCA1* mutation screening using morphoclinical features of breast cancer. *Cancer Res*. 2000; 60: 1206-10.
89. Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of *BRCA1* and *BRCA2*. *Cell*. 2002; 108: 171-82.
90. Ponder BAJ. Cancer genetics. *Nature*. 2001; 411(17): 336-41.
91. Amendola LCB, Vieira R. A contribuição dos genes *BRCA* na predisposição hereditária ao câncer de mama. *Rev Bras Canc*. 2005; 51(4): 325-30.
92. Neuhausen SL, Godwin AK, Gershoni-Baruch R, Schubert E, Garber J, Stoppa-Lyonnet D, *et al.*, *et al.* Haplotype and phenotype analysis of nine recurrent *BRCA2* mutations in 111 families: results of an international study. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 1381-8.
93. Motulsky AG. Jewish Diseases and Origins. *Nat Genet*. 1995; 9: 99-101.

94. Ford D, Easton DF, Petro J. Estimates of the gene frequency of *BRCA1* and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am J Human Genetics*. 1995; 57: 1457-62.
95. Struewing JP, Tarone RE, Brody LC, Li FP, Boice JD. *BRCA1* mutations in young women with breast cancer. *Lancet*. 1996; 347(9013): 1493.
96. Oddoux C, Struewing JP, Clayton CM, Neuhausen S, Brody LC, Kaback M, et al. The carrier frequency of the *BRCA2* 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. *Nat Genet*. 1996; 14:188–90.
97. Sakorafas GH, Tsiotou AG. Genetic predisposition to breast cancer: a surgical perspective. *Br J Surg*. 2000; 87(2): 149-62.
98. Liede A, Karlan BY, Baldwin RL, Platt LD, Kuperstein G, Narod SA. Cancer Incidence in a Population of Jewish Women at Risk of Ovarian Cancer. *J of Clin Onco*. 2002; 20(6): 1570-77.
99. Cancer Genetics Studies Consortium. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer: *BRCA1* and *BRCA2*. *JAMA*. 1997; 277: 997-1003.
100. Gomes MCB, Costa MM, Borojevic R, Monteiro ANA, Vieira R, Koifman S, Koifman RJ, Li S, Royer R, Zhang S, Narod SA. Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in breast cancer patients from Brazil. *Breast Cancer Res Treat*. 2007; 103: 349-53.
101. Rohlfs EM, Learning WG, Friedman KJ, Couch FJ, Weber BL, Silverman. Direct detection of mutations in the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1* by PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chem*. 1997; 43(1): 24-9.

ARTIGO (Versão em português)

Artigo será submetido ao periódico ***Genetics and Molecular Biology***, conforme Anexo II

Incidência das mutações 185delAG e 5382insC no gene *BRCA1* em mulheres judias Ashkenazi de Porto Alegre

Crisle Vignol Dillenburger¹, Luciana Grazziotin Rossato², Isabel Cristina Bandeira², Gustavo Lucena², Eleonora Souza Dias⁴, Maira Caleffi⁵, Sandra Leistner-Segal^{1,2,3}.

1. Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS
2. Banco de DNA/Tecidos de Mama e de Ovário do Centro de Pesquisas do HCPA
3. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre – HCPA
4. Hospital Materno Infantil Presidente Vargas
5. Núcleo Mama Porto Alegre/HMV

Título Abreviado: Mutações 185delAG e 5382insC no *BRCA1* em judias Ashkenazi

Correspondência para o autor:

Sandra Leistner-Segal; PhD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Serviço de Genética Médica

Rua Ramiro Barcelos 2350

CEP 90035-903, Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone: 51-2101-8011

Fax: 51- 2101-8010

E-mail: ssegal@hcpa.ufrgs.br

Resumo

Nas últimas décadas tem ocorrido em todo o mundo um significativo aumento da incidência do câncer de mama (em torno de 0,5% ao ano), e conseqüentemente, da mortalidade associada à neoplasia. O câncer de mama hereditário corresponde de 5 a 10% do total dos cânceres de mama existentes. *BRCA1* e *BRCA2* são os principais genes envolvidos com essa neoplasia. Nestes genes, centenas de diferentes mutações foram caracterizadas sendo que, na população de judeus Ashkenazi, três mutações (185delAG e 5382insC, no gene *BRCA1* e 6174delT, no gene *BRCA2*) são prevalentes, estando presentes em cerca de 1 a 2,5% dos indivíduos. O propósito deste estudo é determinar a freqüência das mutações 185delAG e 5382insC, no gene *BRCA1*, na população de mulheres judias Ashkenazi de Porto Alegre. Foram analisadas 209 mulheres da comunidade judaica Ashkenazi de Porto Alegre, utilizando a técnica de *PCR-PSM*, seguida de digestão com enzimas de restrição. Nós encontramos três pacientes com a mutação 185delAG e duas pacientes com a mutação 5382insC, com freqüências de 1,435% (95% IC: 0,366; 3,856) e 0,957% (95% IC: 0,161; 3,125), respectivamente.

Palavras-chave: *BRCA1*, mutações 185delAG e 5382insC, *PCR-PSM*, câncer de mama, judeus Ashkenazi.

Introdução

O câncer de mama é provavelmente o tipo de câncer mais temido pelas mulheres, devido à sua alta frequência e, sobretudo, pelos seus efeitos psicológicos que afetam a percepção da sexualidade e a própria imagem pessoal. Ele é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente. (1)

Atualmente, o câncer de mama constitui-se um grave problema de saúde pública em todos os países pela alta incidência, alta morbi-mortalidade e elevado custo de tratamento. (1) É o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e, no Brasil, é considerado como a neoplasia mais freqüente (excluindo o câncer de pele do tipo não melanoma) e também a principal causa de morte por câncer entre as mulheres. (1)

De acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer) são estimados 49.400 novos casos para os anos de 2008 e 2009. (2)

O carcinoma mamário é considerado uma doença complexa em nível genético (3,4,5,6) e é o resultado de uma série de mutações nos genes reguladores do desenvolvimento e do reparo do DNA (7), sendo que a ativação dos proto-oncogenes celulares ou a inativação dos genes supressores tumorais propiciam as principais alterações genéticas envolvidas no desenvolvimento do câncer. (8)

Os genes supressores tumorais são os genes necessários para a regulação da proliferação e diferenciação celulares. A inativação destes genes que normalmente teriam ação anti-neoplásica atuando na inibição das células malignas (9,10) e a conseqüente perda de suas funções controladoras favorecem o aparecimento e/ou desenvolvimento de um tumor.

Mutações herdadas em uma das cópias de um gene supressor não são suficientes para determinar uma mudança de comportamento da célula. No entanto, quando sua segunda cópia se torna alterada por uma mutação somática (não herdada), a célula pode adquirir um comportamento neoplásico. (11)

Do total de casos dos tumores mamários diagnosticados a cada ano, estima-se que de 5 a 10% sejam hereditários, isto é, causados predominantemente por uma alteração genética herdada que confere ao seu portador um risco de câncer significativamente maior que o da população em geral. (12,13)

Os avanços nas técnicas de genética molecular resultaram na identificação de genes que, quando alterados, aumentam significativamente o risco de desenvolver câncer de mama, ovário e outros tipos de câncer. (14,15)

Por métodos de análise de ligação, um grupo liderado por Marie Claire-King, em 1990, mapeou um gene que, quando mutado, predispõe ao câncer de mama e ovário, denominado *BRCA1*, localizado no braço longo do cromossomo 17, composto de 22 exons em 100kb de DNA genômico e que codifica uma proteína de 1.863 aminoácidos (Figura 1). Este parece ser responsável por cerca de 45-50% de todos os casos de câncer de mama hereditário e a chance de desenvolver este tipo de tumor, em alguma fase da vida, é de 56 a 85%. (14,16,17,18,19,20)

Em 1995, um segundo gene foi mapeado, associado ao câncer de mama hereditário. Este gene, chamado *BRCA2*, está localizado no braço longo do cromossomo 13, compreendendo 10,4 kb, organizado em 27 exons e codificando uma proteína de 3.418 aminoácidos. (21,22,23)

A literatura informa que, de todos os casos de câncer de mama hereditários, 80 a 90% são causados por mutações específicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. (24,25)

Mutações nestes genes são particularmente prevalentes em mulheres judias Ashkenazi. (26)

Os judeus de origem Ashkenazi são os descendentes da Europa Central e Oriental e, atribui-se a ocorrência de efeito fundador como explicação para a disseminação destas mutações. (27)

Uma em cada quarenta mulheres judias Ashkenazi é portadora de uma mutação em *BRCA1* ou *BRCA2* que predispõe ao desenvolvimento do câncer de mama. Essa alta frequência é atribuída ao efeito fundador, ocorrido nesta população há aproximadamente 600 anos atrás. (28,29,30)

Três mutações são as responsáveis por esta alta prevalência: 185delAG e 5382insC, no gene *BRCA1* e 6174delT, no gene *BRCA2*.

Existem vários métodos para a identificação de mutações *BRCA* e, normalmente, a escolha do método depende dos recursos disponíveis no laboratório, sendo o seqüenciamento completo dos genes o mais indicado.

No entanto, estudando uma população específica, em que cientificamente comprovadas três mutações são as responsáveis pela alta frequência de carcinoma mamário, principalmente em idade precoce, é que se justifica desenhar um exame específico para estas mutações.

A descoberta de uma mutação nestes genes possibilita ao portador prosseguir com uma posição profilática contra a doença, minimizando os fatores de risco, aumentando a vigilância para detecção do tumor, para poder diagnosticá-lo em fase mais precoce, ampliando assim, de modo significativo, a eficácia dos tratamentos e as chances de cura.

Este estudo tem por objetivo avaliar a frequência das mutações 185delAG e 5382insC, no gene *BRCA1*, em mulheres de ascendência judaica Ashkenazi residentes em Porto Alegre.

Material e Métodos

Amostra Estudada

O trabalho foi desenvolvido utilizando-se um banco pré-existente de DNA genômico previamente extraído de sangue periférico e armazenado em freezer a uma temperatura de -20°C , no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A amostra consistiu de 209 mulheres judias de origem Ashkenazi da cidade de Porto Alegre, todas maiores de 18 anos, com idades entre 19 e 77 anos. Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão Científica e de Ética do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Projeto nº 04-208). Todos os procedimentos foram realizados após o Consentimento Livre e Esclarecido das pacientes.

Amplificação do material genético por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Após a obtenção do DNA, a amplificação foi realizada usando a técnica *PCR-PSM* como descrito por Rohlf s e colaboradores (46). Esta técnica cria sítios de restrição enzimática por adição ou substituição de uma base em um dos *primers*. Os alelos são, então, revelados por eletroforese dos produtos de *PCR* digeridos com enzimas de restrição.

Os exons 2 e 20 do gene *BRCA1* foram amplificados para detecção das mutações 185delAG e 5382insC. Para realização do *PCR*, foi utilizado 5,0 μl de

dNTP 0,2mM (Sigma), 5,0 μ l de tampão Pht (500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8,4, 1% Triton X-100), 0,2 μ l de DNA Taq Polimerase Pht (Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda.), 2,0 μ l de MgCl₂, 1,0 μ l de *primers* específicos (20pmol). Cada reação de *PCR* consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, temperatura de anelamento de 59°C (para 185delAG) e 62°C (para 5382insC) por 30 segundos, 72°C de extensão por 1 minuto e extensão final de 72°C por 10 minutos. Os fragmentos amplificados de 176 pb (pares de base) (para 185delAG) e 273 pb (para 5382insC) foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio, após eletroforese horizontal.

Digestão com enzimas de restrição

Para a identificação de alterações nos exons 2 e 20 do gene *BRCA1*, foi utilizada a técnica de digestão dos produtos amplificados de *PCR* com enzimas de restrição. As enzimas utilizadas foram: *Ddel* (para 185delAG) e *BstNI* (para 5382insC) (*New England Biolabs*). As reações de digestão contiveram: 10,0 μ l de produto de *PCR*, 3,0 μ l de tampão, 1,0 μ l da enzima de restrição em um volume final de 30,0 μ l.

Todos os componentes foram incubados a 37°C *overnight* (para 185delAG) e 60°C por 2 horas (para 5382insC) para digestão completa. As reações de digestão foram visualizadas através de eletroforese horizontal em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídio.

A enzima de restrição *Ddel* normalmente cliva a seqüência no sítio do alelo 185delAG e o do tipo selvagem, porque as bases nitrogenadas Adenina-Guanina (AG) deletadas são precedidas ou seguidas por outra Adenina-Guanina (AG),

preservando o sítio de restrição. No entanto, quando a Citosina (C) no nucleotídeo 188 da região não-codificadora é alterada para uma Timina (T) pelo *primer reverse* não-combinante, o sítio clivado é destruído no alelo mutante. Dessa forma, a amplificação por *PCR* seguido de digestão com enzima de restrição produz fragmentos de 150 e 26 pb, do alelo tipo selvagem não clivado, e um fragmento de 176 pb do alelo mutante (Figura 2). Os 26 pb restantes migram rapidamente através do gel, não sendo visualizados.

Usando a mesma estratégia para o alelo 5382insC, é introduzida uma Adenina (A) na posição 5384 da seqüência de nucleotídeos e a enzima *BstNI* destrói um sítio do alelo tipo selvagem. O sítio de restrição ainda está presente no alelo mutante, mesmo quando é incompatível com a base, pois a Citosina (C) mutante é inserida em uma seqüência de três Citosinas (C). A digestão dos produtos resulta em fragmentos de 250 e 23 pb. Verifica-se na amostra heterozigota os fragmentos digeridos de 250 e 23 pb do alelo mutante e os 273 pb do alelo tipo selvagem (Figura 3).

A computação dos dados e os cálculos estatísticos das freqüências das mutações foi realizada utilizando o programa Pepi versão 4.0.

Resultados e Discussão

Este estudo teve como objetivo verificar a frequência das mutações comuns 185delAG e 5382insC, no gene *BRCA1*, em 209 mulheres da comunidade judaica Ashkenazi de Porto Alegre.

As mulheres não foram selecionadas por histórico prévio pessoal ou familiar de câncer. Os critérios para seleção foram a idade, acima de 18 anos, e a ascendência judaica Ashkenazi. As entrevistas e coletas foram realizadas em festas da comunidade.

A descendência judaica Ashkenazi é um dos mais relevantes fatores de risco para suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama. Outros fatores seriam a idade atual, menarca precoce (abaixo dos 12 anos), patologia benigna prévia, idade do 1º parto acima dos 30 anos e história familiar de câncer de mama em parentes de 1º grau (mãe, irmã ou filha), segundo modelo desenvolvido por Gail e colaboradores. (32)

Obesidade na menopausa, nuliparidade, menopausa tardia (acima dos 54 anos), uso moderado ou abusivo de bebidas alcoólicas, TRH (Terapia de Reposição Hormonal) e outros familiares afetados por câncer também são considerados fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama.

As causas hereditárias de desenvolvimento do câncer de mama são a minoria (5 a 10%). Existe grande heterogeneidade de mutações causadoras da doença, exceto na população judaica Ashkenazi, em que um pequeno número de mutações causa a doença, na maioria dos casos. (25,26)

Em populações não-judaicas a maioria das mutações é privada, ou seja, aparecem em apenas uma ou poucas famílias. (36,37,38)

Em um estudo envolvendo análise do gene *BRCA1* (33) comparando os haplótipos da mutação 185delAG de judeus Ashkenazi e outros judeus (Iraqianos, Marroquinos, Yemenitas e Iranianos), os resultados indicam que os mesmos possuem um padrão alélico igual ou muito similar. Este resultado nos permite estimar que o efeito fundador desta mutação ocorreu anterior à Diáspora, sugerindo um ancestral comum a todos os judeus, não apenas aos judeus de origem Ashkenazi.

Outro estudo, desenvolvido por Claus *et al.* (34) mostra que o histórico familiar de surgimento do câncer de mama é um fator de risco significativa nas mulheres judias que não portam as mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, atribuindo a associação a outros fatores genéticos. Estudos adicionais, como análise de ligação, podem ser usados para determinar a herança existente de outros genes de suscetibilidade e/ou predisposição ao câncer de mama que ainda não tenham sido identificados.

Outra pesquisa, liderada pela Universidade da Pensilvânia (35), analisou 110 não-judeus com histórico familiar positivo para câncer de mama e/ou ovário. Destes, 20% apresentaram mutações no gene *BRCA1* e 7% no gene *BRCA2*. Como controle, analisaram 52 judeus Ashkenazi, e destes 21% portavam uma das duas mutações comuns (185delAG ou 5382insC) no gene *BRCA1* e 8% portavam a mutação 6174delT no gene *BRCA2*. Concluíram que as frequências das mutações BRCA em indivíduos afetados não foram significativamente diferentes neste grupo étnico.

Com relação à sobrevivência após a descoberta do câncer de mama e identificação de mutações nos genes de predisposição *BRCA1* e *BRCA2*, os achados sugerem que mulheres com câncer de mama portadoras de uma das três

mutações específicas não têm um prognóstico diferente (pior ou melhor) do que as mulheres com câncer de mama e que não apresentam mutações. (36)

Quanto à análise molecular das 209 amostras estudadas, constatamos três pacientes com a mutação 185delAG e duas pacientes com a mutação 5382insC, obtendo uma frequência de 1,435% (95% IC: 0,366; 3,856) e 0,957% (95% IC: 0,161; 3,125), respectivamente.

Estimando que as frequências nesta população podem variar até 2,5% (39), consideramos que nossos resultados encontram-se dentro dos parâmetros já descritos na literatura, conforme Tabela 01.

Todas as mutações foram identificadas em pacientes diferentes e não relacionadas entre si.

Tabela 01 – Frequências encontradas na população judaica Ashkenazi:

Origem	Amostra (n)	Autor	Frequências (%)	
			185delAG	5382insC
Boston	31	Tonin, 1995 (40)	0,19	-
Estados Unidos	858	Struewing, 1995 (44)	0,9	-
Texas	3.000	Roa, 1996 (39)	1,1	0,2
Washington	5318	Struewing, 1997 (41)	1,0	0,3
Israel	42	Lahad, 1997 (42)	0,19	0,19
New Jersey	92	Tobias, 2000 (42)	0,15	0,02
Austrália	1200	Bahar, 2001 (45)	1,25	0,25
Eslováquia	120	Cierniková, 2006 (43)	0,008	0,042
Porto Alegre	210	Dillenburg, 2008	1,429	0,952

Com relação à ocorrência de três eventos 185delAG e dois 5382insC encontrados na população em estudo, as mulheres portadoras apresentaram as seguintes informações pessoais, conforme descrito nas Tabelas 02 e 03.

Tabela 02 – Informações das mulheres portadoras de mutação 185delAG:

Informações	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
Data e país de nascimento	1946, Israel	1936, Brasil	1962, Brasil
Ascendência Ashkenazi	Paterna e materna	Paterna e materna	Paterna e materna
Número de abortos	3	2	0
Número de filhos	2	4	0
Idade aos partos	20 e 25 anos	1º filho aos 22 anos	0
Amamentação	Sim	Sim	0
Início e período de uso de ACO (Anticoncepcional Oral)	Início aos 21 anos	Período: 30 meses	Início aos 26 anos
História pessoal de doença da mama	Calcificação mamária	Não	Não
Histórico familiar positivo	Não	Tia e prima maternas: câncer de mama aos 50 anos	Mãe: câncer de cólon aos 63 anos; Avó materna: câncer de cólon aos 55 anos; Tio materno – câncer de cólon aos 51 anos.
Tabagismo	Não	Não	Não
Consumo de álcool	Não	Eventual	Não
Dieta	Frutas e legumes frequentemente	Frutas e legumes frequentemente	Frutas e legumes moderadamente
Obesidade (IMC>30)	IMC: 29,6	IMC: 23,2	IMC: 16,3
Idade da menarca	12 anos	12 anos	10 anos
Idade da menopausa	-	50 anos	-

Tabela 03 - Informações das mulheres portadoras de mutação 5382insC:

Informações	Paciente 1	Paciente 2
Data e país de nascimento	1940, Brasil	1966, Brasil
Ascendência Ashkenazi	Paterna e materna	Paterna e materna
Número de abortos	0	0
Número de filhos	3	0
Idade aos partos	1º aos 21 anos e último aos 29 anos	0
Amamentação	Sim	0
Início e período de uso de ACO (Anticoncepcional Oral)	Início aos 24 anos, uso durante 26 anos	Início aos 21 anos, uso durante 8 anos e 6 meses
História pessoal de doença da mama	Não	Câncer de ovário aos 24 anos
Histórico familiar positivo	Pai: câncer de bexiga aos 60 anos	Avó paterna: câncer de mama aos 42 anos
Tabagismo	Não	Não
Consumo de álcool	Não	Não
Dieta	Frutas e legumes frequentemente	Frutas e legumes moderadamente
Obesidade (IMC>30)	IMC: 25	IMC: 18,8
Idade da menarca	12 anos	14 anos
Idade da menopausa	50 anos	-

Em relação às informações das mulheres portadoras da mutação 185delAG, verificamos que a Paciente 1 apresentou como fatores de risco: a idade, acima de 50 anos (atualmente com 62 anos de idade), a ascendência judaica Ashkenazi paterna e materna e doença benigna prévia de mama (Calcificação mamária). Os demais fatores de risco que poderiam estar associados estavam ausentes nesta paciente.

Observando as informações da Paciente 2, constatamos como fator de risco, além da ascendência judaica Ashkenazi de ambos os pais, o histórico familiar positivo: a portadora possui uma tia e uma prima, do lado materno, acometidas por câncer de mama aos 50 anos. Em consequência do resultado positivo desta paciente, os demais membros dessa família, na linhagem materna, poderiam ser testados para a mesma mutação.

Em relação a Paciente 3, verificamos como fatores de risco para a doença: a ascendência judaica Ashkenazi paterna e materna, paridade inexistente, menarca precoce (aos 10 anos), consumo moderado de frutas e legumes e um forte histórico familiar positivo, com a mãe, avó materna e tio materno acometidos por câncer de cólon, nas idades de 63, 55 e 51 anos, respectivamente. Da mesma forma que a Paciente 2, a linhagem materna desta família poderia ser submetida a investigação de um teste genético, para detecção da mutação específica 185delAG, já diagnosticada na paciente.

Analisando as informações das mulheres portadoras da mutação 5382insC notamos que a Paciente 1 apresentou como fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama: a idade acima dos 50 anos (atualmente com 68 anos de idade), a ascendência judaica Ashkenazi de pai e mãe, uso contínuo de ACO (durante 26 anos) e o histórico familiar positivo, com um câncer de bexiga acometendo seu pai aos 60 anos de idade.

Quanto à Paciente 2, a mesma não apresentou a idade como fator de risco (42 anos de idade). No entanto, verificamos um histórico pessoal e familiar positivo, inclusive com o diagnóstico precoce de um câncer de ovário, aos 24 anos. Este dado confirma que portadores de mutações nos genes de predisposição ao câncer de mama têm um risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasias em idade precoce e o acometimento por outros tipos de câncer, principalmente de ovário. Além disso, essa paciente possui a avó paterna com diagnóstico de câncer de mama aos 40 anos, o que representa, supostamente, que esta mutação foi realmente herdada.

Consideramos de extrema importância a análise de testes genéticos preditivos. No entanto, mesmo na população judaica Ashkenazi, não se justifica que as mulheres desta comunidade sejam rastreadas somente por sua ascendência. Deve-se considerar outros fatores de risco elevado para a doença, como o diagnóstico de doença prévia da mama e a presença de familiares (principalmente os de 1º grau) afetados, pois se sabe que quanto mais elevado for este número, maior será a chance de ser portadora de uma predisposição genética.

A análise de somente estas duas mutações no gene *BRCA1* (além da mutação 6174delT no gene *BRCA2*) é indicada somente para esta população, pois como já relatado esta população tem uma característica distinta das outras populações: perpetua as mutações ocorridas desde os primórdios, em decorrência de um efeito fundador e em consequência as tradições intracomunidade permitem a fixação destas mutações e a transmissão das mesmas para as futuras gerações.

Referências bibliográficas

1. Estimativa 2008 – Incidência de câncer do Brasil. Brasília: Instituto Nacional do Câncer (INCA), Ministério da Saúde, 2005. <http://www.inca.gov.br>. Acesso em Fev. 2008.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55: 74-108.
3. Ghosh S and Collins FS. The Geneticist's Approach to Complex Disease *Annu Ver Med.* 1996; 47: 333-53.
4. Risch N and Merikangas K. The Future of Genetic Studies of Complex Human Disease *Science.* 1996; 273: 156-17.
5. Wooster R and Stratton MR. Breast Cancer Susceptibility. A Complex Disease Unravels. *Trends Genet.* 1995; 11: 3-5.
6. Bennett IC, Gattas M and The BT. The Genetic of Breast Cancer and Its Clinical Implications. *The Australian and New Zealand Journal of Surgery.* 1999; 69 (2): 95-105.
7. Hellman S: Darwin's clinical relevance. *Cancer.* 1997; 79 (12): 2275-2281.
8. Macleod K. Tumor Suppressor Genes. *Curr Opin Genet Dev.* 2000; 10: 81-93.
9. Brown PH, Lippman SM. Chemoprevention of Breast Cancer. *Breast Cancer Research & Treatment.* 2000; 62(1): 1-17.
10. Hoffmann W, Schalang PM. *BRCA1* and *BRCA2* breast cancer susceptibility genes, *J Cancer Res Clin Oncol.* 2000; 126(9): 487-96.
11. Simao TA, Ribeiro FS, Amorim LM, Albano RM, Andrada-Serpa MJ, Cardoso LE, *et al.* TP53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio de

- Janeiro, Brazil: association with risk factors and tumor characteristics. *Int J Cancer*. 2002; 101(1): 69-73.
12. Walsh T, Casadei S, Coats KH, *et al*. Spectrum of mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* and *TP53* in families at high risk of breast cancer. *Jama*. 2006; 295(12): 1379-88.
13. Hartikainen JM, Kataja V, Pirskanen M, Arffman A, Ristonmaa U, Vahteristo P, Ryyanen M, Heinonem S, Kosma VM, Mannermaa A. Screening for *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Eastern Finnish breast/ovarian cancer families. *Clin Genet*. 2007; 72(4): 311-20.
14. 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.
15. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, *et al*. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science*. 1994; 266(5182):66-71.
16. Neuhausen S, Marshall C. Loss of heterozygosity in familial tumors from three *BRCA1*-linked kindreds. *Cancer Research*. 1994; 54: 6069-72.
17. Weber BL, Abel KJ, Brody LC, Flejter WL, Chandrasekharappa SC, Couch FJ, Merajver SD, Collins FS. Familial breast cancer. Approaching the isolation of a susceptibility gene. *Cancer*. 1994; 74: 1013-20.
18. Boyd M, Harris F, McFarlane R, Davidson HR, Black DM. A human *BRCA1* gene knockout (letter). *Nature*. 1995; 375(6532): 541-2.
19. Coughlin SS, Khoury MJ, Steinberg KK. *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations and risk of breast cancer. Public health perspectives. *Am J Prev Med*. 1999; 16(2): 91-8.

20. Gayther SA, Harrington P, Russel P, Kharkevich G, Garkavtseva RF, Ponder BA. Rapid detection of regionally clustered germ-line *BRCA1* mutations by multiplex heteroduplex analysis. UKCCCR Familial Ovarian Cancer Study Group. *Am J Hum Genet.* 1996; 58(3): 451-6.
21. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. *Science.* 1994; 265(5181) :2088-90.
22. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature.* 1995; 378(6559): 789-92.
23. Cohen MM. Statement of the American Society of Human Genetics on genetic testing of breast and ovarian cancer predisposition. *Am J Hum Genet.* 1994; 55: I-IV.
24. Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP and 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.
25. Newman B, Mu H, Butler LM, Milliken RC, Moorman PG, King MC. Frequency of breast cancer attributable to *BRCA1* in a population-based series of American women. *JAMA.* 1998; 279: 915-21.
26. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 1997; 71(5): 800-9.
27. Simard J, Dumond M, Moisan AM, Gaborieaus V, Malouin H, Durocher F, Chiquette J, Plante M, Avard D, Bessete P, et al. Evaluation of *BRCA1* and *BRCA2* mutation prevalence, risk prediction models and a multistep testing

- approach in French-Canadian families with high risk of breast and ovarian cancer. *J Med Genet.* 2007; 44(2): 107-21.
28. Brody LC; Biesecker BB. Breast Cancer Susceptibility Genes *BRCA1* and *BRCA2*. *Medicine.* 1998; 77(3): 208-26.
29. Motulsky AG. Jewish Diseases and Origins. *Nat Genet.* 1995; 9: 99-101.
30. Muto MG; Cramer DW; Tangir J. Frequency of the *BRCA1* 185delAG Mutation Among Jewish Women With Ovarian Cancer and Matched Population Controls. *Cancer Res.* 1996; 56: 1250-52.
31. Brumer A. Caracterização demográfica e sócio-econômica da população judaica no Rio Grande do Sul. *Identidade em mudança. Federação Israelita do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.* 1994; p61.
32. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, *et al.* Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst.* 1989; 81: 1879-86.
33. Revital BB-S, Kruglikova A, Modan B, Gak E, Yechezkel GH, Theodor L, Novikov I, Baruch RG, Risel S, Papa MZ, Baruch GB, Friedman E. The 185delAG *BRCA1* mutation originated before of Jews in the Diaspora and is not limited to Ashkenazim. *Hum Mol Genet.* 1998; 7(5): 801-5.
34. Claus EB, Schildkraut J, Iversen ES, Berry D, Parmigiani G. Effect of *BRCA1* and *BRCA2* on the association between breast cancer risk and family history. *J of the Natl Cancer Inst.* 1998; 90(23): 1824-29.
35. Ganguly A, Leahy K, Marshall AM, Dhulipala R, Godmilow L, Ganguly T. Genetic Testing for Breast Cancer Susceptibility: Frequency of *BRCA1* and *BRCA2* Mutations. *Gen Test.* 1997; 1(2): 85-90.

36. Lee JS, Wacholder S, Struewing JP, McAdams M, Pee D, Brody LC, Tucker MA, Hartge P. Survival after breast cancer in Ashkenazi Jewish *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(3): 259-63.
37. Neuhausen SL, Godwin AK, Gershoni-Baruch R, Schubert E, Garber J, Stoppa-Lyonnet D, et al., et al. Haplotype and phenotype analysis of nine recurrent *BRCA2* mutations in 111 families: results of an international study. *Am J Hum Genet.* 1998; 62: 1381-8.
38. Garvin AM, Attenhofer HM, Scott RJ. *BRCA1* and *BRCA2* mutation analysis in 86 early onset breast/ovarian cancer patients. *J Med Genet.* 1997; 34(12): 990-5.
39. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Nat Genet.* 1996; 14: 185-7.
40. Tonin P, Serova O, Lenoir G, Lynch H, Durocher F, Simard J, Morgan K, Narod S. *BRCA1* mutations in Ashkenazi Jewish women. *Am J Hum Genet.* 1995; 57: 189.
41. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, et al. The risk of cancer associated with specific mutations of *BRCA1* and *BRCA2* among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med.* 1997; 336: 1401-8
42. Lahad EL, Catane R, Eisenberg S, Kaufman B, Hornreich G, Lisshinski E, Shohat M, Weber BL, Beller U, Lahad A, Halle D. Founder *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Ashkenazi Jews in Israel: frequency and differential penetrance in ovarian cancer and in breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet.* 1997; 60(5): 1059-67.

- 43-Cierniková S, Tomka M, Kovác M, Stevurkova V, Zajac V. Ashkenazi founder *BRCA1/BRCA2* mutations in Slovak hereditary breast ad/or ovarian cancer families. *Neoplasma*. 2006; 53(2): 97-102.
- 44-Struewing JP, Abeliovich D, Peretz T, Avishai N, Kaback MM, Collins FS, Brody LC. The carrier frequency of the *BRCA1* mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nat Genet*. 1995; 11(2): 113-4.
- 45-Bahar AY, Taylor PJ, Andrews L, Proos A, Burnett L, Tucker K, Frielander M, Burckley MF. The frequency of founder mutations in the *BRCA1*, *BRCA2* and *APC* genes in Australian Ashkenazi Jews: implication for the generality of U.S. population data. *Cancer*. 2001; 92(2): 440-4.
- 46-Rohlfes EM, Learning WG, Friedman KJ, Couch FJ, Weber BL, Silverman LM. Direct detection of mutations in the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1* by PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chemistry*. 1997; 43(1): 24-9.

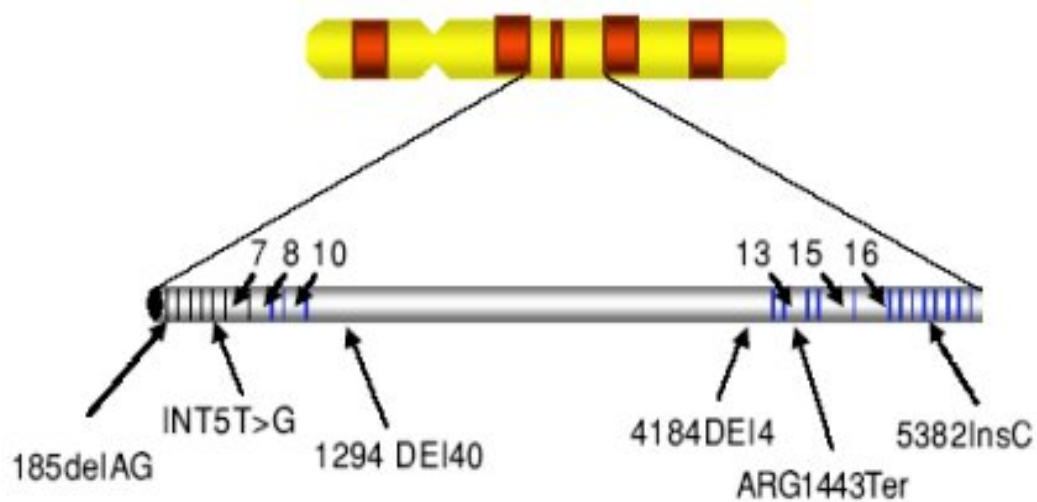


Figura 1. Mutações mais freqüentes encontradas no gene *BRCA1*, localizado no cromossomo 17. Centenas de mutações ao longo da seqüência já foram descritas, no entanto, as mutações mais freqüentes na população de judeus Ashkenazi são a 185delAG e 5382insC.

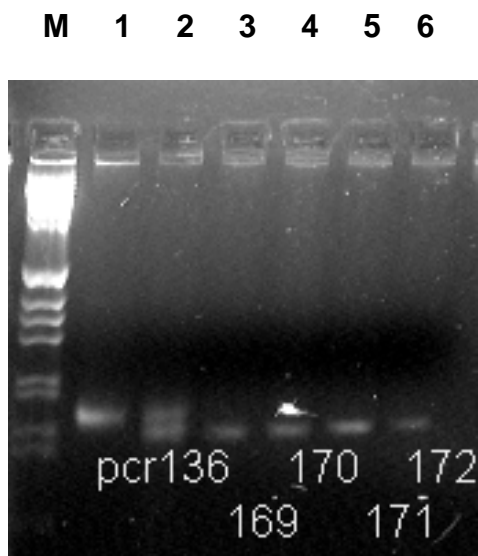


Figura 2. Resultado da digestão dos produtos de *PCR* 185delAG com a enzima de restrição *DdeI*, visualizados em gel de agarose 3%. A posição M indica o marcador de peso molecular de 50 pares de base (pb). As posições 3 a 6 demonstram o padrão alélico normal para a mutação (176pb). A posição 2 mostra o padrão alélico heterozigoto para a mutação 185delAG (176+150+26pb). Na posição 1 foi aplicado um *PCR* não-clivado (176pb).

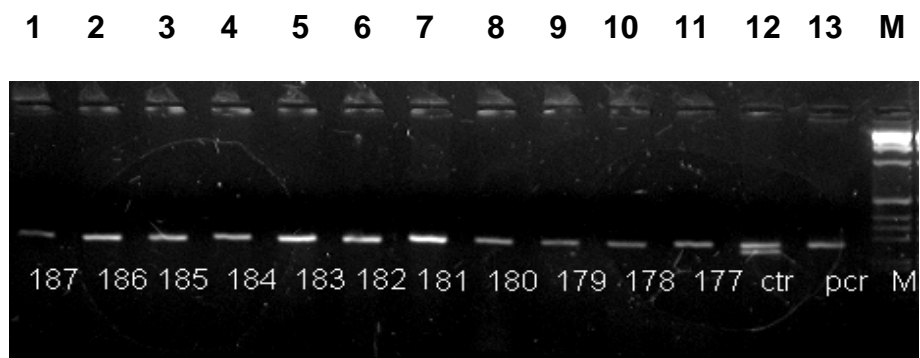


Figura 3. Resultado da digestão dos produtos de *PCR* 5382insC com a enzima de restrição *BstNI*, visualizados em gel de agarose 3%. A posição M indica o marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb). As posições 1 a 11 demonstram o padrão alélico normal para a mutação (273pb). A posição 12 mostra o padrão alélico heterozigoto para a mutação 5382insC (273+250+23pb). Na posição 13 foi aplicado um *PCR* não-clivado (273pb).

ARTICLE (English version)

Article to be submitted to *Genetics and Molecular Biology* journal

Incidence of 185delAG and 5382insC mutations in the *BRCA1* gene in Ashkenazi Jews women in Porto Alegre

Crisle Vignol Dillenburg, Luciana Grazziotin Rossato, Isabel Cristina Bandeira, Gustavo Lucena, Eleonora Souza Dias, Maira Caleffi, Sandra Leistner-Segal.

1. Medical Sciences Post-Graduation Program at the Federal University of Rio Grande do Sul – Medical School
2. DNA/Breast and Ovary Tissue Bank at the HCPA - Research Center
3. Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre
4. Hospital Materno Infantil Presidente Vargas
5. Núcleo Mama Porto Alegre/HMV

Abbreviated Title: 185delAG and 5382insC mutations at *BRCA1* in Ashkenazi Jews

Author`s mailing address:

Sandra Leistner-Segal

Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA)

HCPA Medical Genetics Service

2350 Ramiro Barcelos Street

Code: 90035-903, Porto Alegre, Brazil

Telephone: 51-2101-8011

Fax: 51-2101-8010

E-mail: ssegal@hcpa.ufrgs.br

Abstract

In recent decades a significant increase in the incidence of breast cancer has occurred around the world (around 0.5% per year) and consequently, the mortality associated with cancer has also increased. The hereditary breast cancer accounts for 5 to 10% of all breast cancers. Mainly *BRCA1* and *BRCA2* genes are involved with the tumor. In these genes, hundreds of different mutations have been characterized, and in the population of Ashkenazi Jews, three mutations (185delAG and 5382insC in *BRCA1* gene, and 6174delT in the *BRCA2* gene) are prevalent and are present in about 1 to 2.5% of individuals. The purpose of this study is to determine the frequency of mutations 185delAG and 5382insC in the gene *BRCA1* among the population of Ashkenazi Jews women of Porto Alegre. We examined 209 women of Ashkenazi Jewish community of Porto Alegre, using the technique of *PCR-PSM*, followed by digestion with restriction enzymes. We found three patients with the 185delAG mutation and two with 5382insC mutation, with frequencies of 1.435% (95% CI: 0,366; 3,856) e 0,957% (95% CI: 0,161; 3,125), respectively.

Key words: *BRCA1*, 185delAG e 5382insC mutations, *PCR-PSM*, breast cancer, Ashkenazi Jews.

Introduction

Breast cancer is probably the most feared by women, due to its high frequency and, above all, by its psychological effects, which affects the perception of sexuality and their own personal images. It is relatively rare before 35 years of age but, above this age group, grows quickly and gradually. (1)

Currently, breast cancer is a serious public health problem in all countries due to the high incidence, high morbidity and mortality and high cost of treatment. (1) It is the second most common type of cancer in the world and, in Brazil, is considered the most common cancer (excluding non-melanoma skin cancer), and also the leading cause of cancer deaths among women. (1)

According to the INCA, 49.400 new cases for the years 2008 and 2009 are estimated. (2)

Breast cancer is considered to be a complex disease at genetic level (3,4,5,6) and is the result of a series of mutations in genes that regulate the development and repair of DNA. (7) The activation of cellular proto-oncogenes or the inactivation of tumor suppressor genes provides major genetic changes involved in the development of cancer. (8)

The tumor suppressor genes are necessary for the regulation of cellular proliferation and differentiation. The inactivation of these genes, which normally have anti-neoplastic action acting to inhibit malignant cells (9,10), and consequent loss of their control function favor the emergence and/or development of a tumor.

Inherited mutations in one of the copies of a suppressor gene are not sufficient to determine a change of behavior of the cell. However, when its second copy is

changed by a somatic mutation (not inherited), the cell can acquire a neoplastic behavior. (11)

Of the total cases of breast tumors diagnosed, 5 to 10% are estimated to be hereditary, e.g., predominantly caused by an inherited genetic change that which provides a risk of cancer significantly higher than the general population. (12,13)

Advances in techniques of molecular genetics resulted in the identification of genes that, when altered, significantly increase the risk of developing breast cancer, ovarian and other types of cancer. (14,15)

By methods of linkage consortium, a group headed by Marie-Claire King, in 1990, mapped a gene called *BRCA1* that when mutated, predisposes to breast and ovarian cancer. It is located on the long arm of chromosome 17, composed of 22 exons in 100kb of genomic DNA, encoding a protein of 1.863 amino acids (Figure 1). It appears to be responsible for about 45-50% of all cases of hereditary breast cancer and the chance of developing this type of tumor, in any stage of life, is 56 to 85%. (14,16,17,18,19,20)

In 1995, a second gene has been mapped, associated with hereditary breast cancer. This gene, called *BRCA2*, is located on the long arm of chromosome 13, comprising 10.4 kb, organized on 27 exons, encoding a protein of 3.418 amino acids. (21,22,23)

Lliterature reports show that, of all the cases of hereditary breast cancer, 80 to 90% are caused by specific mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. (24,25)

Mutations in these genes are particularly prevalent in Ashkenazi Jewish women (26) who are the descendants of Central and Eastern Europe.

One in forty Ashkenazi Jewish women carries a mutation in *BRCA1* or *BRCA2*. This high frequency is attributed to a founder effect, which occurred in this population about 600 years ago. (27, 28,29,30)

Three mutations are responsible for this high prevalence: 185delAG and 5382insC in *BRCA1* gene, and 6174delT in the *BRCA2* gene.

There are several methods for the identification of BRCA mutations. Usually, the choice of the method depends on the resources available in the laboratory, and the complete sequencing of genes as indicated.

However, studying a particular population, such as the Ashkenazi Jews, can enable and justify to design a specific test to screen for known mutations.

This study aims to assess the frequency of mutations 185delAG and 5382insC in the *BRCA1* gene in women of Ashkenazi Jewish origin, inform the city of Porto Alegre.

Materials and Methods

Studied Sample

The study was conducted using a database of pre-existing genomic DNA previously extracted from peripheral blood and stored at -20°C.

The sample consisted of 209 women of Ashkenazi Jewish origin from the city of Porto Alegre, independently of having or not breast cancer, all above 18 years old, aged between 19 and 77 years. This study was submitted to and approved by the Scientific and Ethical Committee of the Research and Post-Graduate Group at the HCPA (Project # 04-208). All procedures were performed after the Free and Informed Consent of patients.

Amplification of genetic material by polymerase chain reaction (PCR)

After obtaining DNA, amplification was performed using the PCR Site-directed Mutagenesis (PSM) technique as described by Rohlf, *et al.* (46) This technique creates enzyme restriction sites by adding or replacing a base in one of the primers. The alleles are then shown by electrophoresis of PCR digested products with the specific enzymes.

Exons 2 and 20 of the *BRCA1* gene were amplified for the detection of 185delAG and 5382insC mutations. To perform the PCR 5.0µl of 0.2 mM dNTP (Sigma), 5.0µl of buffer Pht (500mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8,4, 1% Triton X-100), 0.2µl of Taq DNA Pht (*Phoneutria Biotechnology and Services*), 2.0µl of MgCl₂, 1.0µl of

specific primers (20pmol) were used. Each PCR reaction consisted of a initial denaturation of 95°C for 5 minutes, followed by 35 cycles of 30 seconds of 95°C, annealing temperature of 59°C (for 185delAG) and 62°C (for 5382insC) for 30 seconds, 72°C to extend for 1 minute and extension end of 72°C for 10 minutes. The amplified fragments of 176 bp (for 185delAG) and 273 bp (for 5382insC) were checked in 1.5% agarose gel stained with ethidium bromide after eletroforesis.

Digestion with restriction enzymes

For the identification of mutations in exons 2 and 20 of the *BRCA1* gene, we used digestion of PCR products with the restriction enzymes *Ddel* (for 185delAG) and *BstNI* (for 5382insC) (*New England Biolabs*). The reactions of digestion contained: 10.0µl of the PCR product, 3.0µl of buffer, 1.0µl of restriction enzyme to complete the final volume of 30.0µl.

All components were incubated overnight at 37°C (for 185delAG) and 60°C for 2 hours (for 5382insC) for complete digestion. The reactions of digestion were observed trough 3% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide.

Both the 185delAG allele and the wild-type allele are normally cut by *Ddel* because the deleted Adenine-Guanine (AG) is either preceded or followed by another Adeninde-Guanine (AG), thus preserving the restriction site. However, when the Cytosine (C) at nucleotide 188 of the noncoding is changed to a Thymine (T) by the mismatched reverse primer, the cutting site is destroyed in the mutant allele. Therefore, PCR amplification, followed by restriction enzyme digestion, produces fragments of 150 and 26 bp from the wild-type allele and an uncut fragment of 176 bp

from the mutant allele (Figure 2). The 26 bp fragment migrates quickly and is not seen on the gel.

Using the same mismatched primer strategy for 5382insC, introducing an Adenine (A) into the sequence at nucleotide 5384 destroys a *BstNI* site in the wild-type allele. The restriction site is still present in the mutant allele even with the mismatched base because the mutant Cytosine (C) is inserted into a string of three Cytosines. Digestion of the mutant products results in 250 and 23 bp fragments. In the heterozygote sample both the digested fragment of 250 bp from the mutant allele and the full-size product of 273 bp from the wild-type allele can be visualized (Figure 3).

The data analysis and statistical calculations of the frequencies of mutations was performed using the Pepi program version 4.0.

Results and Discussion

This study aimed to establish the frequency of common mutations, 185delAG and 5382insC, in the *BRCA1*, in 209 Ashkenazi Jewish women from Porto Alegre.

Women were not selected by previous personal or familial history of cancer. The criteria for selection were age, above 18 years old, and Ashkenazi Jewish ancestry, which is one of the most relevant risk factors for breast cancer susceptibility. The interviews and samples were taken during the community festivals.

Other factors are present age, early menarch (below 12 years of age) previous benign pathology, age at first delivery above 30 years of age, and familiar history of breast cancer in first degree relatives (mother, sister or daughter), according to the Gail's model (32).

Obesity at menopause, nulliparity, late menopause (above 54 years of age), moderate or abusive use of alcohol, Hormonal Replacement Therapy and other relatives with cancer are also considered risk factors for the development of breast cancer.

The hereditary causes in the development of breast cancer are minority (5-10%).

There is great heterogeneity of mutation causing disease with the exception of the Ashkenazi Jewish population where a small number of mutations cause the disease in most cases. (25,26)

In the non-jewish population most mutations are private for one or few families. (36,37,38)

In a previous study involving *BRCA1* gene analysis (33) and comparing the haplotypes on the background of the 185delAG mutation, between the Ashkenazi

and Jews (Iraqians, Marroquines, Yemenitas and Iranianos), the results indicate that they all have the same or very similar allelic pattern, allowing to estimate that the founder effect of this mutation occurred before the Diaspora and suggesting a common ancestral to all Jews, not only the Ashkenazi.

Another study performed by Claus *et al.* (34) shows that the familiar history of development of breast cancer is a significant risk factor for Jewish women who do not carry a *BRCA1* or *BRCA2* mutation indicating the association of other genetic factors. Additional studies such as linkage analysis can be used to determine the existent inheritance of other breast cancer susceptibility and/or predisposition genes which are not yet identified.

Further studies headed by the University of Pennsylvania (35), analyzed 110 non-Jewish with positive familiar history for breast and/or ovarian cancer. Of these, 20% carried mutations at *BRCA1* and 7% at *BRCA2*. As controls, 52 Ashkenazi Jews were analyzed and 21% had one of the 2 common mutations (185delAG or 5382insC) at *BRCA1* and 8% were carriers of mutation 6174delT at the *BRCA2*. They concluded that the frequencies of mutations at BRCA in affected individuals were not significantly different in this ethnic group.

Regarding life span after the identification of mutations at the BRCA susceptibility genes, the findings suggest that women with breast cancer who carry one of the three specific common mutations do not have a different prognosis (better or worse) from those who do not carry mutations. (36)

Regarding the molecular analysis in our sample, from 209 analyzed women (all over 18, with 83.3% of both parents, and 16.7% of mixed Jewish origin of Ashkenazi Jewish descent), we found three patients with the 185delAG mutation and

two patients with the 5382insC mutation, obtaining a frequency of 1,435% (95% IC: 0,366; 3,856) and 0,957% (95% IC: 0,161; 3,125), respectively.

Estimating that the frequencies on this population can vary up to 2,5% (39), we considered that our results are within the parameters already described in the literature according to Table 01.

Table 01 - Frequency of **185delAG** and **5382insC** mutations found in the Ashkenazi Jewish population worldwide:

Origin	Sample (n)	Author	Frequency (%)	
			185delAG	5382insC
Boston	31	Tonin, 1995 (40)	0,19	-
United States	858	Struewing, 1995 (44)	0,9	-
Texas	3.000	Roa, 1996 (39)	1,1	0,2
Washington DC	5318	Struewing, 1997 (41)	1,0	0,3
Israel	42	Lahad, 1997 (42)	0,19	0,19
New Jersey	92	Tobias, 2000 (42)	0,15	0,02
Australia	1200	Bahar, 2001 (45)	1,25	0,25
Slovakia	120	Cierniková, 2006 (43)	0,008	0,042
Porto Alegre	210	Dillenburg, 2008	1,429	0,952

The epidemiological information on women carrying mutations in our study can be seen in Tables 02 and 03.

Table 02 – Information of women carrier of 185delAG mutation:

Information	Pacient 1	Pacient 2	Pacient 3
Date and birth place	1946, in Israel	1936, in Brasil	1962, in Brasil
Ashkenazi descendants	Of father and mother	Of father and mother	Of father and mother
Abortions number	3	2	0
Children number	2	4	0
Childbirth age	20 and 25 years old	1 ^o child - 22 years old	0
Breast-feeding	Yes	Yes	0
Start and period of Oral Contraceptive use	Start - 21 years old	Period: 30 months	Start - 26 years old
Breast Personal Disease	Mammary Calcification	No	No
Positive Familiar Historical	No	Maternal aunt and cousin: breast cancer – 50 years old	Mother: colon cancer, 63 years old Grandmother: colon cancer, 55 years old; Maternal uncle: colon cancer, 51 years old
Smoker	No	No	No
Alcohol addiction	No	Accidental	No
Diet	Fruit and vegetable frequently	Fruit and vegetable frequently	Fruit and vegetable moderately
Obesity (IMC>30)	IMC: 29,6	IMC: 23,2	IMC: 16,3
Menarch age	12 years old	12 years old	10 years old
Menopause age	-	50 years old	-

Table 03 - Information on women carrying the 5382insC mutation:

Information	Patient 1	Patient 2
Date and birth place	1940, in Brasil	1966, in Brasil
Ashkenazi descendants	Of father and mother	Of father and mother
Abortions number	0	0
Children number	3	0
Childbirth age	First: 21 years old and the last: 29 years old	0
Breast-feeding	Yes	0
Start and period of Oral Contraceptive use	Start: 24 years old Period: 26 years	Start: 21 years old Period: 8 years and 6 months
Breast Personal Disease	No	Ovarian cancer: 24 years old
Positive Familiar Historical	Father: bladder cancer, 60 years old	Paternal grandmother: breast cancer, 42 years old
Smoker	No	No
Alcohol addiction	No	No
Diet	Fruit and vegetable frequently	Fruit and vegetable moderately
Obesity (IMC>30)	IMC: 25	IMC: 18,8
Menarch age	12 years old	14 years old
Menopause age	50 years old	-

Regarding information on women carrying the 185delAG mutation we observed that, Patient 1 presented as risk factors: the age above 50 years old (nowadays with 62 years), Ashkenazi Jewish ancestry from both parents and previous benign disease of the breast (mammary calcification).

Patient 2 presented Ashkenazi Jewish ancestry from both parents and positive familiar history such as maternal aunt and cousin with breast cancer at the age of 50. Other family members from this family could be offered genetic testing for this mutation.

Regarding Patient 3, we observed as risk factor: Ashkenazi Jewish ancestry from parents, nulliparity, early menarch (at 10 years of age), and a strong familiar history with affected mother, maternal grandmother and maternal uncle with colon cancer at the ages of 63, 55 e 51 years, respectively. Similar to Patient 2, the maternal lineage from this family could be tested for the mutation found.

For information regarding women with the 5382insC mutation, we observed that Patient 1 presented age above 50 years (actually with 68 years old), Ashkenazi Jewish ancestry from both parents, continuous use of ACO (for 26 years) and positive familiar history with bladder cancer in the father at the age of 60.

Patient 2 did not present age as a risk factor but we verified a personal and familiar history for cancer including the early diagnosis of ovarian at 24 years of age. This data confirms that carriers of mutations in susceptibility genes for breast cancer have an increased risk for the development of other types of neoplasias (mainly ovarian) at early ages. Besides, this woman had a paternal grandmother with the diagnosis of breast cancer at 40 years old, witch suggest the inheritance of this mutation.

We consider that predictive genetic testing is important, nevertheless, even in the Ashkenazi Jewish community, screening for BRCA common mutations are not justified only based on the Jewish background. One should consider other increased risk factors such as previous diagnosis of diseases of the breast and affected relatives (mainly first degree), which are known to increase the chance of carrying a mutation.

The analysis of these two mutations in the *BRCA1* gene (besides mutation 6174delT at the *BRCA2* gene), is indicated for this population only, because as we have seen from literature reports there is a distinct characteristic from other populations: the mutation is perpetuated as a consequence of a founder effect due to intra community traditions which allow the fixation of these mutations and their transmission to the future generations.

References

1. Estimativa 2008 – Incidência de câncer do Brasil. Brasília: Instituto Nacional do Câncer (INCA), Ministério da Saúde, 2005. <http://www.inca.gov.br>. Acesso em Fev. 2008.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J and Pisani P: Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55: 74-108.
3. Ghosh S and Collins FS. The Geneticist's Approach to Complex Disease *Annu Ver Med.* 1996; 47: 333-53.
4. Risch N and Merikangas K. The Future of Genetic Studies of Complex Human Disease *Science.* 1996; 273: 156-17.
5. Wooster R and Stratton MR. Breast Cancer Susceptibility. A Complex Disease Unravels. *Trends Genet.* 1995; 11: 3-5.
6. Bennett IC, Gattas M and The BT. The Genetic of Breast Cancer and Its Clinical Implications. *The Australian and New Zealand Journal of Surgery.* 1999; 69 (2): 95-105.
7. Hellman S: Darwin's clinical relevance. *Cancer.* 1997; 79 (12): 2275-2281.
8. Macleod K. Tumor Suppressor Genes. *Curr Opin Genet Dev.* 2000; 10: 81-93.
9. Brown PH, Lippman SM. Chemoprevention of Breast Cancer. *Breast Cancer Research & Treatment.* 2000; 62(1): 1-17.
10. Hoffmann W, Schalang PM. *BRCA1* and *BRCA2* breast cancer susceptibility genes, *J Cancer Res Clin Oncol.* 2000; 126(9): 487-96.
11. Simao TA, Ribeiro FS, Amorim LM, Albano RM, Andrada-Serpa MJ, Cardoso LE, *et al.* TP53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio de

- Janeiro, Brazil: association with risk factors and tumor characteristics. *Int J Cancer*. 2002; 101(1): 69-73.
12. Walsh T, Casadei S, Coats KH, *et al*. Spectrum of mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* and *TP53* in families at high risk of breast cancer. *Jama*. 2006; 295(12): 1379-88.
13. Hartikainen JM, Kataja V, Pirskanen M, Arffman A, Ristonmaa U, Vahteristo P, Ryyanen M, Heinonem S, Kosma VM, Mannermaa A. Screening for *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Eastern Finnish breast/ovarian cancer families. *Clin Genet*. 2007; 72(4): 311-20.
14. 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.
15. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, *et al*. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science*. 1994; 266(5182): 66-71.
16. Neuhausen S, Marshall C. Loss of heterozygosity in familial tumors from three *BRCA1*-linked kindreds. *Cancer Research*. 1994; 54: 6069-72.
17. Weber BL, Abel KJ, Brody LC, Flejter WL, Chandrasekharappa SC, Couch FJ, Merajver SD, Collins FS. Familial breast cancer. Approaching the isolation of a susceptibility gene. *Cancer*. 1994; 74: 1013-20.
18. Boyd M, Harris F, McFarlane R, Davidson HR, Black DM. A human *BRCA1* gene knockout (letter). *Nature*. 1995; 375(6532): 541-2.
19. Coughlin SS, Khoury MJ, Steinberg KK. *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations and risk of breast cancer. Public health perspectives. *Am J Prev Med*. 1999; 16(2): 91-8.

20. Gayther SA, Harrington P, Russel P, Kharkevich G, Garkavtseva RF, Ponder BA. Rapid detection of regionally clustered germ-line *BRCA1* mutations by multiplex heteroduplex analysis. UKCCCR Familial Ovarian Cancer Study Group. *Am J Hum Genet.* 1996; 58(3): 451-6.
21. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. *Science.* 1994; 265(5181): 2088-90.
22. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature.* 1995; 378(6559): 789-92.
23. Cohen MM. Statement of the American Society of Human Genetics on genetic testing of breast and ovarian cancer predisposition. *Am J Hum Genet.* 1994; 55: I-IV.
24. Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP and 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.
25. Newman B, Mu H, Butler LM, Milliken RC, Moorman PG, King MC. Frequency of breast cancer attributable to *BRCA1* in a population-based series of American women. *JAMA.* 1998; 279: 915-21.
26. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 1997; 71(5): 800-9.
27. Simard J, Dumond M, Moisan AM, Gaborieaus V, Malouin H, Durocher F, Chiquette J, Plante M, Avard D, Bessete P, et al. Evaluation of *BRCA1* and *BRCA2* mutation prevalence, risk prediction models and a multistep testing

- approach in French-Canadian families with high risk of breast and ovarian cancer. *J Med Genet.* 2007; 44(2): 107-21.
28. Brody LC; Biesecker BB. Breast Cancer Susceptibility Genes *BRCA1* and *BRCA2*. *Medicine.* 1998; 77(3): 208-26.
29. Motulsky AG. Jewish Diseases and Origins. *Nat Genet.* 1995; 9:99-101.
30. Muto MG; Cramer DW; Tangir J. Frequency of the *BRCA1* 185delAG Mutation among Jewish Women with Ovarian Cancer and Matched Population Controls. *Cancer Res.* 1996; 56:1250-52.
31. Brumer A. Caracterização demográfica e sócio-econômica da população judaica no Rio Grande do Sul. *Identidade em mudança. Federação Israelita do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.* 1994; p61.
32. Gail MH, Brinton LA, Byar DP, *et al.* Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst.* 1989; 81: 1879-86.
33. Revital BB-S, Kruglikova A, Modan B, Gak E, Yechezkel GH, Theodor L, Novikov I, Baruch RG, Risel S, Papa MZ, Baruch GB, Friedman E. The 185delAG *BRCA1* mutation originated before of Jews in the Diaspora and is not limited to Ashkenazim. *Hum Mol Genet.* 1998; 7(5): 801-5.
34. Claus EB, Schildkraut J, Iversen ES, Berry D, Parmigiani G. Effect of *BRCA1* and *BRCA2* on the association between breast cancer risk and family history. *J of the Natl Cancer Inst.* 1998; 90(23): 1824-29.
35. Ganguly A, Leahy K, Marshall AM, Dhulipala R, Godmilow L, Ganguly T. Genetic Testing for Breast Cancer Susceptibility: Frequency of *BRCA1* and *BRCA2* Mutations. *Gen Test.* 1997; 1(2): 85-90.

36. Lee JS, Wacholder S, Struewing JP, McAdams M, Pee D, Brody LC, Tucker MA, Hartge P. Survival after breast cancer in Ashkenazi Jewish *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91(3): 259-63.
37. Neuhausen SL, Godwin AK, Gershoni-Baruch R, Schubert E, Garber J, Stoppa-Lyonnet D, et al., et al. Haplotype and phenotype analysis of nine recurrent *BRCA2* mutations in 111 families: results of an international study. *Am J Hum Genet.* 1998; 62: 1381-8.
38. Garvin AM, Attenhofer HM, Scott RJ. *BRCA1* and *BRCA2* mutation analysis in 86 early onset breast/ovarian cancer patients. *J Med Genet.* 1997; 34(12): 990-5.
39. Roa BB, Boyd AA, Volcik K, Richards CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Nat Genet.* 1996; 14: 185-7.
40. Tonin P, Serova O, Lenoir G, Lynch H, Durocher F, Simard J, Morgan K, Narod S. *BRCA1* mutations in Ashkenazi Jewish women. *Am J Hum Genet.* 1995; 57: 189.
41. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, et al. The risk of cancer associated with specific mutations of *BRCA1* and *BRCA2* among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med.* 1997; 336: 1401-8.
42. Lahad EL, Catane R, Eisenberg S, Kaufman B, Hornreich G, Lisshinski E, Shohat M, Weber BL, Beller U, Lahad A, Halle D. Founder *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Ashkenazi Jews in Israel: frequency and differential penetrance in ovarian cancer and in breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet.* 1997; 60(5): 1059-67.

43. Cierniková S, Tomka M, Kovác M, Stevurkova V, Zajac V. Ashkenazi founder *BRCA1/BRCA2* mutations in Slovak hereditary breast ad/or ovarian cancer families. *Neoplasma*. 2006; 53(2): 97-102.
44. Struewing JP, Abeliovich D, Peretz T, Avishai N, Kaback MM, Collins FS, Brody LC. The carrier frequency of the *BRCA1* mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. *Nat Genet*. 1995; 11(2): 113-4.
45. Bahar AY, Taylor PJ, Andrews L, Proos A, Burnett L, Tucker K, Frielander M, Burckley MF. The frequency of founder mutations in the *BRCA1*, *BRCA2* and *APC* genes in Australian Ashkenazi Jews: implication for the generality of U.S. population data. *Cancer*. 2001; 92(2): 440-4.
46. Rohlfs EM, Learning WG, Friedman KJ, Couch FJ, Weber BL, Silverman LM. Direct detection of mutations in the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1* by PCR-mediated site-directed mutagenesis. *Clin Chemistry*. 1997; 43(1): 24-9.

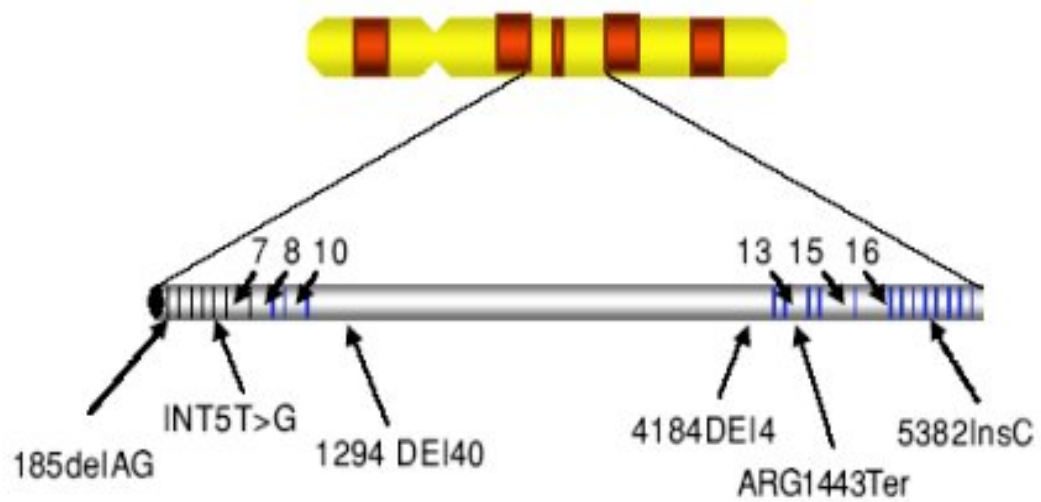


Figure 1. Mutations frequently found in *BRCA1* gene, located in chromosome 17. Hundreds of mutations along the sequence have already been described; however, the most frequent in Ashkenazi Jews are 185delAG and 5382insC.

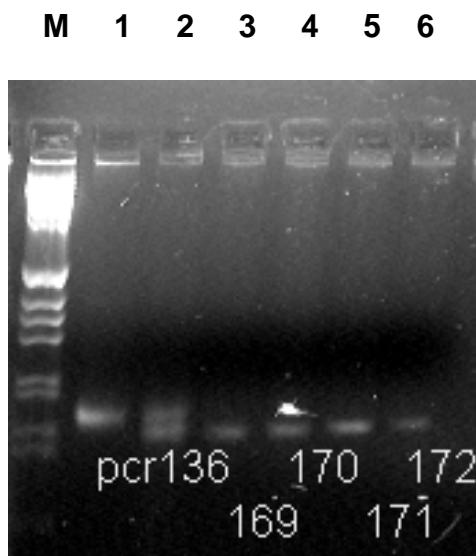


Figure 2. Results of digested *PCR* products for 185delAG with *DdeI* restriction enzyme through 3% agarose gel electrophoresis. Position M is 50 bp molecular weight marker. Positions 3 to 6 show the normal allelic pattern for the mutation (176 bp). Position 2 shows the heterozygous pattern (176+150+26 bp). Position 1 shows an undigested *PCR* product(176bp).

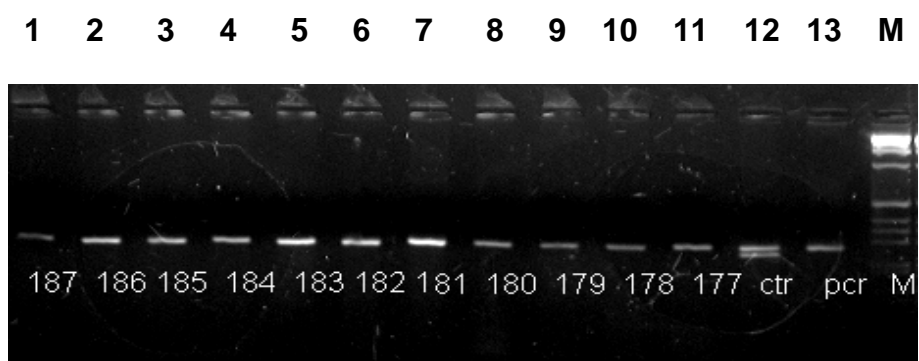


Figure 3. Results of digested *PCR* products for 5382insC with *BstNI* restriction enzyme through 3% agarose gel electrophoresis. Position M is a 100 bp molecular weight marker. Positions 1 to 11 show the normal allelic pattern for the mutation (273 bp). Position 12 shows the heterozygous pattern (273+250+23 bp). Position 13 shows an undigested *PCR* product (273 bp).

CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O objetivo do nosso estudo, primeiramente, era padronizar as técnicas de Biologia Molecular visando a identificação das três mutações específicas e freqüentes, 185delAG e 5382insC no gene *BRCA1* e 6174delT no gene *BRCA2* na população de mulheres judias Ashkenazi de Porto Alegre.

No entanto, a padronização destas técnicas no laboratório, é uma prática exaustiva e dispendiosa, que passa por uma fase de testes, até a obtenção das condições ideais de análise.

Todas as amostras foram submetidas ao *PCR* da mutação 6174delT no gene *BRCA2* seguidas pela digestão dos produtos de *PCR* com a enzima de restrição *PmlI* (*New England Biolabs*). A princípio obtivemos resultados considerados negativos, ou seja, nenhuma mutação foi identificada em comparação ao padrão esperado para determinação da mutação. Infelizmente não dispúnhamos de um controle positivo para a mutação, a fim de confirmar os resultados e o sucesso da técnica.

Dessa forma, começamos a obter um número elevado de uma condição similar à ocorrência de heterozigose para a mutação 6174delT. Para confirmar estes resultados e dar prosseguimento às análises, encaminhamos algumas destas amostras para realizar o seqüenciamento automático. Estes resultados restaram diferentes do obtido através da nossa técnica, ou seja, os resultados tornaram-se inválidos.

Diversas modificações foram realizadas para tentar adequar a técnica, mas até o presente momento, não obtivemos êxito.

A utilização de um controle positivo para a mutação 6174delT no gene *BRCA2* seria um procedimento imprescindível para confirmar os resultados obtidos na análise. No entanto, ainda não dispomos deste controle.

Novas modificações na rotina laboratorial dos testes já estão sendo executadas, no sentido de padronizar a técnica para a detecção desta mutação, nesta população, e os resultados serão apresentados em um próximo trabalho.

A descendência judaica Ashkenazi não é condição única para realização de triagem populacional para estudo genético das três mutações específicas. No entanto, a descendência somada a outros fatores, principalmente histórico familiar e pessoal, se recomenda a investigação genética destas mutações.

A descoberta de uma mutação não é condição pré-existente da doença, porém como a chance de adquirir a doença é significativamente maior que a da população em geral, justifica-se o rastreamento genético. Dessa maneira deve-se propor uma educação sobre o risco do câncer de mama nas famílias afetadas esclarecendo os benefícios dos testes genéticos e informando às pacientes acometidas sobre a intensificação da vigilância, cirurgias profiláticas, tratamentos de quimioprevenção, eliminação dos fatores de risco e detecção precoce da doença, para assim ampliar suas chances de cura.

ANEXO I – Carta às Pacientes