

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Instituto de Biociências
Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular

**Identificação e Caracterização de
Pacientes em Risco para Câncer de
Mama Hereditário no Sul do Brasil**

Tese de Doutorado

Edenir Inêz Palmero

Porto Alegre, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Identificação e Caracterização de Pacientes em Risco para Câncer de Mama Hereditário no Sul do Brasil

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Edenir Inêz Palmero

**Orientadora: Prof^a Dr^a Patricia Ashton-Prolla
Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Lavínia Schüler-Faccini**

Porto Alegre

Julho de 2007

O presente estudo foi conduzido sob a modalidade de Doutorado “Sandwich”, sendo assim, parte das investigações foram realizadas junto ao Laboratório de Medicina Genômica, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e parte foi conduzida no Laboratório de Carcinogênese Molecular, no IARC (*International Agency for Research on Cancer*).

Instituições Envolvidas:

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Associação Hospitalar Moinhos de Vento de Porto Alegre
Secretaria Municipal de Saúde
Prefeitura Municipal de Porto Alegre
Instituto da Mama do Rio Grande do Sul
International Agency for Research on Cancer

Instituições de Fomento:

Susan G Komen for the Cure (grant # POP0403033)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (processo número 203732/2005-7)

Fundo de Incentivo à Pesquisa –FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (processo # 04-170)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - PRODOC processo número 00202/03-7)

International Agency for Research on Cancer

Orientadores:

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Ashton-Prolla (Brasil)
Co-orientadora: Profa. Dra. Lavínia Schüler-Faccini (Brasil)
Co-orientador: Dr. Pierre Hainaut (França)

DEDICATÓRIA

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”*

(Mario Quintana)

Dentre muitas pessoas essenciais à essa trajetória, gostaria de, nesse momento, destacar duas, ou melhor, três delas... Dedico essa tese a você Matias, pelo companheirismo, amor, carinho e dedicação incansável que me proporcionas em absolutamente todos os momentos de nossa vida...A você meu pequeno Joaquim, que mesmo ainda no ventre já alegre e ilumina nossos caminhos... e, à minha orientadora Patricia, pelo maravilhoso exemplo de como ser mulher, mãe e profissional ao mesmo tempo e de como a todos dedicar a mesma sabedoria, carinho, compreensão e eficiência...

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço ao meu marido e companheiro Matias, pela eterna e incansável parceria, pelo incentivo, conselhos, pelo amor e carinho, por todos os momentos em que me levantou, que torceu por mim e junto comigo, e, principalmente pela família que estamos começando a formar.

Agradeço ao meu pequeno Joaquim, que mesmo antes do nascimento já trouxe um novo e maravilhoso sentido às nossas vidas.

Agradeço aos meus pais, Darcy e Celita, por tudo o que me ensinaram, por tudo que investiram em mim, pela confiança, pelo carinho e pelo maravilhoso exemplo de vida e de garra que me deram e que me permitiram trilhar esse caminho...

Agradeço às minhas irmãs, por sempre estarem do meu lado, pela grande amizade, pelo apoio e conselhos.

Ao meu amado sobrinho Alan, pela amizade, carinho, compreensão e companheirismo que nos une.

Aos meus pequenos e não menos amados sobrinhos Fillipe e Luisa pela alegria despreocupada que emitem, pela energia que transbordam, pelo amor que compartilhamos.

AGRADECIMENTOS GERAIS

Agradeço à minha orientadora, Dra. Patricia Ashton-Prolla, pela amizade, disponibilidade, competência, presteza e por me ter me ensinado tudo o que hoje sei sobre Aconselhamento Genético, sobre o trato com os pacientes, enfim, pelos ensinamentos, conselhos, dicas e opiniões. Pela incansável e inestimável ajuda durante toda a trajetória que percorremos juntas e principalmente pelo incansável esforço para que mesmo na minha ausência, as coisas dessem certo...Pelo exemplo de vida que és para mim... Pela mãezona que sempre fostes, pelo carinho que sempre me dedicastes... Simplesmente por tudo que passamos juntas nesses quase 7 anos de caminhada...Por mostrar que sempre vale a pena, que sempre podemos conseguir, bastando para isso querer e lutar.

À minha co-orientadora Dra. Lavínia Schüler-Faccini pelo infindável incentivo, pela primeira porta aberta, pelos conselhos e dicas sempre certeiras.

Ao Dr. Pierre Hainaut por ter me acolhido de braços abertos junto ao IARC, por tudo que me ensinou. Obrigada por acreditar em mim, no meu trabalho. Obrigada por seres além de um excelente e exemplar profissional, também um maravilhoso ser humano, pelo apoio dado em um momento do qual tanto necessitei.

Ao Dr Roberto Giugliani, profissional de exemplar competência e que possui a habilidade, de, em meio às suas infindáveis ocupações sempre arrumar um tempinho para auxiliar a todos que dele de alguma forma necessitam. Pela extrema competência com que administra e conduz o Serviço de Genética Médica do HCPA, tornando-o tão eficiente, produtivo e, ao mesmo tempo, acolhedor. Pela ajuda para que o meu doutorado sanduíche se realizasse, pelos conselhos que destes em um momento tão importante e decisório de minha vida profissional.

À Dra Maira Caleffi, pela extrema competência com que gere o projeto NMPOA, pela maravilhosa oportunidade de crescimento e aprendizado que tive trabalhando em conjunto com sua equipe, na coorte NMPOA.

À Dra Nadine de Oliveira Clausell pela excelente profissional que és, por ter nos “acolhido” junto ao Laboratório de Cardiologia enquanto ainda não tínhamos o nosso laboratório montado e equipado. À todos da equipe de

Cardiologia, em especial à Kátia, pela ajuda, dicas, pelo empréstimo dos termocicladores e à Ângela pela amizade, dicas quentes quanto a novos fundos ou grants para a pesquisa, pela parceria no dia a dia e no futebol.

Aos amigos e companheiros de laboratório: à Ingrid, minha comadre e eterna amiga, simplesmente por tudo, por ser uma pessoa tão boa e tão maravilhosa, pelo carinho, amizade, ajuda profissional, socorro à distância, pelo alto astral e por sempre ter uma palavra amiga; à Karen, pela amizade e extrema competência e eficiência que apresenta em absolutamente todas as coisas que faz, pelos bilhões de favores que me prestou, pela disponibilidade de ajudar que sempre manifesta; à Juliana, pela amizade, parceria, pelo exemplo de profissional competente e dedicada que vejo em ti, pela maravilhosa, competente e bem humorada companheira de laboratório que és; à Liliana, pela ajuda com os cromatogramas, pelo aprendizado conjunto que tivemos, pelas trocas de experiência e conhecimento que realizamos; à Ernestina, pela parceria, pelos vários géis que sempre se prontificava a deixar prontos, pelos churrascos, pela eterna parceria no futebol; à Patrícia K, pela extrema disponibilidade de me auxiliar, principalmente nos momentos finais do trabalho, em que estive ausente, pela ajuda com os inúmeros sequenciamentos; à Jamile, pelo auxílio prestado com as análises de *CHEK2*; à Patrícia ILR pela ajuda com os heredogramas, pelo amor e dedicação que coloca nas coisas que faz, pela extrema eficiência com que realiza seu trabalho; ao Carlitos, que mesmo em pouco tempo de convivência que tivemos sempre demonstrou voluntariedade em auxiliar e competência em seu trabalho.

Ao Matias, pela incansável ajuda com os PCRs, leitura e interpretação de dados, ajuda com as traduções, com gráficos, figuras e tabelas, pelas explicações e pelas longas e produtivas discussões que tivemos, pelo auxílio com a revisão das referências bem como na tese como um todo.

À Dra Suzi Alves Camey pela inestimável ajuda estatística, pelas dicas, trabalhos de finais de semana e dedicação extrema ao projeto.

À equipe do Laboratório Amplicon pelos inúmeros sequenciamentos realizados e PCRs repetidos.

À Dra Maria Luiza S Pereira pela ajuda na padronização da técnica MLPA, bem como ao Rodrigo e ao Hugo, pelo auxílio nas análises realizadas.

À enfermeira Luciane Kalakun, pela amizade, conselhos, pela forma peculiar e especial de encarar e tratar o paciente, que tanto contribuíram ao meu aprendizado referente ao aconselhamento genético.

A toda a equipe NMPOA, obrigada por tudo, pelo carinho, amizade, pelo ambiente acolhedor e aconchegante de trabalho. Pela equipe maravilhosa e competente que vocês formam. Obrigada pelo apoio e pela ajuda prestada em todos os momentos.

À Fernanda, Vanessa, Suzana, Erica, Ana Cecília, Diego, Karen, Luciane e a todos que integram ou que em algum momento integraram a nossa equipe, agradeço pela convivência e pelo aprendizado. À Dra Cristina Netto, muito obrigada pelo seu carinho, amizade, pela profissional competente e dedicada que és.

À enfermeira Giovana S. por ter me recebido de braços abertos junto ao NMPOA, pela competência com que realiza seu trabalho, pelo amor que põe nas coisas que faz, pela parceria nos inúmeros almoços no NMPOA e mutirões que participamos juntas.

À equipe do Instituto da Mama pelo exemplo de vida que vocês representam.

À Prefeitura Municipal de Porto Alegre, pela sua colaboração na realização do presente estudo.

A toda a equipe do Hospital Moinhos de Vento pelo papel fundamental na execução do projeto.

A todos os pacientes, obrigada pela voluntária participação. Sem sua colaboração nada teria sido realizado.

Aos médicos, enfermeiros, agentes de saúde e demais profissionais dos 18 PSFs participantes do projeto, pela sua colaboração e vital importância no andamento de todo o trabalho.

À Dra Maria Isabel W Achatz pela presteza, carinho e amizade, por ter dado o passo inicial que me permitiu realizar parte do trabalho junto ao IARC.

Ao Dr Carlos Alberto Moreira Filho e a bióloga Danielle Renzoni da Cunha pela inestimável ajuda com o DHPLC, pela sua disponibilidade, eficiência e competência.

Ao Dr Miguel A Moreira do INCA, pela ajuda com os seqüenciamentos e pelas frutíferas discussões realizadas.

A toda a equipe administrativa do Serviço de Genética Médica e do Centro de Pesquisas do HCPA, pela extrema eficiência e competência em seus trabalhos.

Ao PPGBM, por tudo o que aprendi nesses anos em que dele fiz parte.

Ao SGM pela calorosa acolhida, por ter feito parte de uma equipe tão competente e pelo ambiente extremamente agradável que oferecem.

À Amandine S, Ghyslaine MP, Magali O, Chiara G, Virginie M e a todas as pessoas do IARC que de alguma forma me auxiliaram no período em que lá estive. Pela amizade, conselhos, pelo carinho que tiveram por mim.

Ao Elmo e Helen, pelo apoio administrativo ao longo de toda a caminhada.

À equipe do futebol, pelos agradáveis e inesquecíveis momentos que partilhamos.

A todos os meus amigos, e a todas as pessoas que fazem ou fizeram parte de minha vida e que, de uma forma ou outra me auxiliaram e possibilitaram que esse longo caminho fosse trilhado.

ESTRUTURA DA TESE

O presente trabalho apresenta a seguinte organização:

- Capa/contra capa;
- Instituições Participantes da presente investigação,
- Relação das Instituições/Agências Financiadoras da investigação;
- Dedicatória;
- Agradecimentos especiais e agradecimentos gerais;
- Índice;
- Lista de Abreviaturas contidas na Introdução e Discussão da Tese;
- Lista de Figuras contidas na Introdução e Discussão da Tese;
- Introdução à tese contendo uma ampla revisão bibliográfica relacionada aos diversos aspectos abordados no presente estudo;
- Objetivos e justificativa;
- Após o item Objetivos e Justificativa, seguem-se três artigos científicos, os quais encontram-se organizados em capítulos. As referências bibliográficas, assim como as tabelas e figuras encontram-se padronizados de acordo com as normas dos periódicos científicos a que foram ou serão submetidos;
- Capítulo 1: Manuscrito em fase final de preparação que será submetido ao periódico *Breast Cancer Research and Treatment*, e intitulado: “Implementation of a genetic cancer risk assessment program within a breast cancer screening cohort in an underserved population”;
- Capítulo 2: Manuscrito em preparação e que será submetido ao periódico *Breast Cancer Research and Treatment*, e intitulado: “Screening for germline *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, and *CHEK2* mutations in families at-risk for hereditary breast cancer identified in a Brazilian population-based study”;
- Capítulo 3: Artigo científico submetido para publicação no periódico *Cancer Letters*, intitulado: “Detection of R337H, a germline *TP53* mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil”;

- Após os artigos científicos, segue-se o Item Discussão, o qual inclui aspectos abordados ao longo dos três capítulos (artigos científicos), integrando os dados relatados e correlacionando-os com dados da literatura;
- O Item Conclusões de forma resumida, as conclusões obtidas no decorrer de toda a investigação;
- O Item Considerações Gerais e Perspectivas apresenta alguns aspectos gerais relacionados à investigação, assim como perspectivas de continuidade do trabalho e outros projetos paralelos em planejamento ou em fase inicial de execução;
- O Item Referências Bibliográficas refere-se às referências citadas na Introdução e Discussão, e segue as normas do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS;
- Ao item referências seguem-se os anexos, os quais estão subdivididos em três categorias principais, relacionadas aos capítulos da Tese (artigos científicos). Os anexos contêm formulários, protocolos, seqüências e outros arquivos referentes à metodologia e resultados do trabalho.

ÍNDICE

1 Lista de abreviaturas	XVII
2 Lista de figuras	XIX
3 Resumo	XX
4 Abstract	XXIII
5 Introdução	26
5.1 Histórico e Importância	27
5.1.1 Dados demográficos	27
5.1.2 Atendimento à saúde e serviços de genética no Brasil	31
5.1.3 Câncer no Brasil e Rio Grande do Sul	33
5.1.4 Câncer de mama no Brasil e Rio Grande do Sul	34
5.2 Câncer de mama hereditário	35
5.2.1 Características gerais	35
5.2.2 Síndromes de predisposição hereditária ao câncer de mama	37
5.2.2.1 Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Ovário (HBOC)	37
5.2.2.1.1 Histórico e Riscos Associados	37
5.2.2.1.2 Aspectos moleculares e funcionais	39
5.2.2.1.3 Dados nacionais sobre a síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC)	43
5.2.2.1.4 Diagnóstico molecular	44
5.2.2.2 Síndrome de Li-Fraumeni e Síndrome de Li-Fraumeni like (SLF/SLFL)	46
5.2.2.2.1 Histórico e Riscos Associados	46

5.2.2.2.2 Aspectos moleculares e funcionais	48
5.2.2.2.3 Dados nacionais sobre SLF/LFL	52
5.2.2.2.4 Diagnóstico molecular	52
5.2.2.3 Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Câncer Colo-retal (HBCC)	53
5.2.2.3.1 Histórico e Riscos Associados	53
5.2.2.3.2 Aspectos moleculares e funcionais	56
5.2.2.3.3 Dados nacionais sobre a síndrome	56
5.2.2.3.4 Diagnóstico molecular	56
5.2.3 Outras Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama	57
5.2.3.1 Síndrome de Cowden	57
5.2.3.2 Ataxia Telangiectasia	57
5.2.3.3 Síndrome de Peutz-Jeghers	58
5.2.3.4 Síndrome de Saethre-Chotzen	59
5.3 Diagnóstico Diferencial	60
5.4 Aconselhamento genético no câncer de mama hereditário	60
5.4.1 Definição de aconselhamento genético	60
5.4.2 Aconselhamento Genético no Câncer de Mama Hereditário	61
5.4.3 Quando encaminhar uma família para aconselhamento genético e avaliação do risco para câncer de mama hereditário?	61
5.4.4 Etapas do AG para Câncer de Mama Hereditário	62
5.4.5 Diagnóstico clínico de uma síndrome de predisposição	

hereditária ao câncer de mama	63
5.4.5.1 Heredograma	63
5.4.5.2 Critérios para uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer.	64
5.4.5.3 Modelos de probabilidade de mutação: para a síndrome HBOC.	64
5.4.5.4 Estimativa do risco de desenvolver câncer de mama ao longo da vida para mulheres assintomáticas com ou sem história familiar.	64
5.4.6 Escolha do teste genético	65
5.4.6.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	65
5.4.6.2 As limitações no diagnóstico laboratorial	66
5.4.6.3 A questão da sobreposição de fenótipos: quando é necessário testar para mais de uma síndrome.	67
5.4.6.4 Possíveis resultados do teste genético	68
6 Justificativa e objetivos	70
7 Artigos científicos (organizados em capítulos)	72
7.1 Capítulo 1: Palmero EI, Caleffi M, Schuler-Faccini L, Roth FL, Kalakun L, Skonieski G, Giugliani R, Camey S, Ashton-Prolla P Implementation of a genetic cancer risk assessment program within a breast cancer screening cohort in an underserved population. Breast Cancer Res Treat (a ser submetido)	73
7.2 Capítulo 2: Palmero EI, Schuler-Faccini L, Hainaut P, Camey S, Moreira-Filho CA, Cunha DR, Roth FL, Kalakun L, Ewald IP, Martel-Planche G, Santos PK, Ribeiro PLI, Cossio SL, Giugliani R, Caleffi M, Ashton-Prolla P Screening for germline <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> , <i>TP53</i> , and <i>CHEK2</i> mutations in families at-risk	

for hereditary breast cancer identified in a Brazilian population-based study. Breast Cancer Res Treat (a ser submetido)	107
7.3 Capítulo 3: Palmero EI, Schuler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MIW, Olivier M, Martel-Planche G, Marcel V, Aguiar E, Giacomazzi J, Ewald IP, Giugliani R, Ashton-Prolla P Detection of R337H, a germline <i>TP53</i> mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. Cancer Lett (submetido)	142
8 Discussão	155
8.1 Caracterização geral do estudo e da amostra	156
8.2 Investigações moleculares nas pacientes de alto risco para câncer de mama hereditário	166
8.3 Estudos adicionais: prevalência da mutação <i>TP53</i> R337H em mulheres assintomáticas participantes em programa de rastreamento mamográfico	181
8.4 Estudos adicionais: polimorfismos no gene <i>TP53</i>	183
9 Conclusões	186
10 Considerações gerais e perspectivas	192
11 Referencias bibliográficas	197
12 Anexos	224
12.1 Anexos referentes ao capítulo 1	225
12.1.1 Questionário de inclusão no estudo	226
12.1.2 Questionário de conhecimento	227
12.1.3 Questionário de percepção do risco	228
12.1.4 Critérios clínicos	229
12.1.5 Questionário de motivação para teste genético	231

12.1.6 Laudo para paciente alto risco I	233
12.1.7 Laudo para paciente alto risco II	235
12.1.8 Laudo para paciente risco moderado	237
12.1.9 Laudo para paciente baixo risco	239
12.1.10 Folder educativo	241
12.1.11 Termo de consentimento para avaliação de risco genético	242
12.1.12 TCLE para teste genético	243
12.2 Anexos referentes ao capítulo 2	248
12.2.1 Protocolo PCR <i>BRCA1/2</i>	249
12.2.2 Primers <i>BRCA1/2</i> e temperaturas DHPLC	250
12.2.3 Amplicons <i>BRCA1</i>	253
12.2.4 Amplicons <i>BRCA2</i>	258
12.2.5 Protocolo PCR longo <i>BRCA1</i>	265
12.2.6 Primers PCR longo <i>BRCA1</i>	266
12.2.7 Protocolo PCR <i>TP53</i> e temperaturas de DHPLC	267
12.2.8 Primers <i>TP53</i>	268
12.2.9 Protocolo amplificação <i>CHEK2</i>	269
12.2.10 Tabela com famílias, critérios e alterações detectadas	271
12.2.11 Heredogramas das 50 famílias analisadas	279
12.2.12 Artigo Científico relacionado ao tema	329
12.3 Anexos referentes ao capítulo 3	336
12.3.1 Artigo Científico relacionado ao tema	337
12.3.2 PCR e RFLP para exon 10 do gene <i>TP53</i>	344

1. LISTA DE ABREVIATURAS

AG	Aconselhamento Genético
AO	Atestado de Óbito
ARG	Avaliação do Risco Genético
ARGC	Avaliação do Risco Genético de Câncer
AT	Ataxia Telangiectasia
BIC	<i>Breast Cancer Information Core database</i>
BRC	Domínio presente no gene <i>BRCA2</i>
BRCT	<i>BRCA C Terminus</i>
CADC	Câncer Adrenocortical
CASH	<i>Cancer and Steroid Hormone Study</i>
CCR	Câncer Colo-retal
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
del	Deleção
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis</i>
DHPLC	<i>Denaturing High Performance Liquid Chromatography</i>
HBCC	<i>Hereditary Breast and Colon Cancer</i>
HBOC	<i>Hereditary Breast and Ovarian Cancer</i>
HPV	<i>Human Papiloma Virus</i>
Kb	Quilobase
Km	Kilômetro
IARC	<i>International Agency for the Research on Cancer</i>
Ins	Inserção
LFL	Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i>
OMIM	<i>On-line Mendelian Inheritance in Men</i>
LAP	Laudo Anátomo-Patológico
LM	Laudo médico
MLPA	<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
NMPOA	Núcleo Mama Porto Alegre
pb	Pares de base

PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PSF	Programa Saúde da Família
PTT	<i>Protein Truncation Test</i>
RCV	Risco Cumulativo Vital
RNA	Ácido Ribonucléico
RS	Rio Grande do Sul
SLF	Síndrome de Li-Fraumeni
SPJ	Síndrome de Peutz-Jeghers
SSCP	<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
SNC	Sistema Nervoso Central
SV40	<i>Simian virus 40</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UTR	<i>Untranslated region</i>
UV	Ultra-violeta

2. LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mapa de Porto Alegre, com destaque para as regiões das 18 unidades dos PSFs incluídas no presente estudo	29
Figura 2	Fotografias de algumas das regiões incluídas no presente estudo	30
Figura 3	Representação esquemática dos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> , dos seus exons codificantes, proteínas e domínios funcionais	41
Figura 4	Representação esquemática do gene <i>TP53</i> , dos seus exons codificantes, proteína e domínios funcionais	49

3. RESUMO

Palmero, EI. Identificação e Caracterização de Pacientes em Risco para Câncer Hereditário no Sul do Brasil. Porto Alegre; 2007.

No Brasil, o câncer de mama é considerado um problema significativo de saúde pública, devido a suas altas taxas de incidência e mortalidade. No Rio Grande do Sul, os índices de incidência e mortalidade situam-se entre os maiores do país. Embora exposição a fatores de risco ambientais e/ou predisposição genética possam explicar essa diferença em relação a outras regiões brasileiras, não existem estudos que investiguem esse dado a nível populacional. A presente investigação foi desenvolvida em paralelo com um estudo de rastreamento do câncer de mama, com o objetivo de investigar, em uma amostra de base populacional, a prevalência de fatores de risco genéticos para esse neoplasia. Um total de 9234 mulheres participantes de uma coorte em Porto Alegre foram analisadas. A inclusão na coorte (e no presente estudo) deu-se através do preenchimento de um questionário, o qual incluía, entre outros aspectos, indagações acerca da história familiar de câncer. Das 9234 mulheres entrevistadas, 1286 relataram história pessoal e/ou familiar de pelo uma das seguintes neoplasias: câncer de mama, câncer de ovário e câncer colo-retal. Das 1286 mulheres, 1247 com idade superior a 18 anos foram convidadas a participar de sessões de avaliação do risco genético para câncer (ARGC). Um total de 902 mulheres efetivamente participaram do processo de ARGC. No decorrer da consulta foram realizadas: construção do heredograma, estimativas do risco cumulativo vital (RCV) de desenvolver câncer de mama e da probabilidade de mutação germinativa nos genes *BRCA1/2*, associados a predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC). Além disso, os heredogramas foram analisados quanto à presença de critérios clínicos para inclusão em outras síndromes de predisposição hereditária ao câncer de mama, como Síndrome de Li-Fraumeni (SLF), Síndrome de Li-Fraumeni-like (LFL), Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Câncer Colo-retal (HBCC) e para a Síndrome de Cowden. Dentre as 902 pacientes avaliadas, 688 (76.3%) não preenchiavam critérios de inclusão nas síndromes de predisposição hereditária ao câncer consideradas, e foram classificadas, de acordo com seu RCV, como apresentando RCV baixo a moderado (até 20%; 633 mulheres, 92.0%), e moderado a alto (= 20; 55 mulheres, 8.0%) de desenvolver câncer ao longo da vida. Após a análise dos heredogramas, verificou-se que 214 pacientes

preenchiam critérios de inclusão para, no mínimo, uma das síndromes de predisposição ao câncer de mama consideradas. Das 214 pacientes oriundas de 183 famílias, 76 mulheres (65 famílias) apresentavam critérios para HBOC; 122 famílias foram classificadas como sendo LFL e 22 como apresentando critérios clínicos para HBCC. Algumas famílias apresentavam critérios de inclusão para mais de uma síndrome. Não havia, na presente amostra nenhuma família com critérios para SLF ou Síndrome de Cowden. Do total de 183 famílias com critérios clínicos, 50 (27.3%) optaram por prosseguir com a investigação e realização do teste genético. Das 50 famílias, 18 apresentavam inicialmente critérios para HBOC e, foram analisadas quanto à presença de alterações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* por DHPLC e seqüenciamento das variantes. A presença de rearranjos gênicos no gene *BRCA1* também foi investigada na amostra. As quarenta famílias com critérios para LFL foram investigadas por DHPLC e seqüenciamento quanto à presença de alterações germinativas no gene *TP53*. Análise quanto à presença da mutação *CHEK2* 1100delC foi realizada em 7 famílias (do total de 22 famílias com os critérios para HBCC). Alterações germinativas patogênicas foram detectadas em apenas duas das 50 famílias investigadas. A mutação R273C no exon 8 do gene *TP53* foi detectada em uma família LFL e a mutação *CHEK2* 1100delC foi encontrada em uma família HBCC. Em relação aos genes *BRCA1/2* nenhuma alteração deletéria previamente descrita foi detectada. No gene *BRCA1*, foram verificadas 2 variantes novas, 9 sem significado clínico e 1 variante de significado desconhecido. No gene *BRCA2*, foram detectadas 9 variantes novas, 8 variantes sem significado clínico e 5 previamente classificadas como tendo significado clínico desconhecido. Análises de segregação das variantes visando confirmar ou descartar sua patogenicidade estão em andamento. Não foram detectados rearranjos gênicos em *BRCA1*.

Dentre as principais limitações da presente investigação podemos destacar a baixa adesão da amostra à realização do teste genético, o que em parte pode ser explicado pelo desenho do estudo, já que mulheres que não estavam buscando ativamente informações sobre seu risco de câncer e sua história familiar foram recrutadas, não junto a clínicas especializadas de genética e câncer, mas junto aos postos de saúde de seus bairros. Outra importante limitação foi o baixo índice de comprovação dos tumores relatados nas famílias com laudos anátomo-patológicos, o que pode em parte explicar o baixo número de mutações detectadas, já que a única fonte de informações sobre os tumores, na maioria dos casos, foi a própria paciente. Investigações adicionais deverão ser oferecidas a todas as

famílias aqui analisadas, de forma a aumentar a probabilidade de identificar o fator causal da sua história familiar positiva de câncer. Além disso, estudos envolvendo grupos amostrais maiores deverão ser desenvolvidos na tentativa de verificar se a prevalência de mutações germinativas em genes de predisposição é, em nosso meio, tão reduzida quanto a verificada em nosso trabalho. Caso sim, uma revisão dos critérios de inclusão no teste genético deverá ser feita, na tentativa de identificar a contribuição de outros genes e/ou genes “novos” de alta penetrância envolvidos em uma predisposição hereditária aumentada ao câncer, bem como a contribuição de genes de maior prevalência, porém considerados de baixa penetrância, ou ainda uma análise quanto a contribuição de fatores de risco não-genéticos, na tentativa de explicar os índices aumentados de incidência e mortalidade por câncer de mama nessa região do país. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar a prevalência do fenótipo de câncer de mama hereditário e de alterações genéticas em genes de predisposição ao câncer de mama hereditário em uma amostra de base populacional. Também é o primeiro relato descritivo de alterações em genes de predisposição ao câncer de mama em mulheres do Rio Grande do Sul.

4. ABSTRACT

Palmero, EI. Identification and Characterization of Patients at-risk for Hereditary Breast Cancer in Southern Brazil. Porto Alegre; 2007.

In Brazil, breast cancer is a serious public health problem due to its high incidence and mortality rates. Rio Grande do Sul, Brazil's southernmost State, has one of the highest breast cancer incidence and mortality rates of the country. Although exposure to environmental risk factors and genetic predisposition may explain this latter observation, to date, no systematic investigation has been conducted in to examine this hypothesis at the population level. The present study was developed in parallel with a larger breast cancer screening project and intended to examine the contribution of genetic risk factors to the epidemiology of breast cancer in Southern Brazil. This question was addressed initially through identification and characterization of patients at-risk for hereditary breast cancer and their families in a population-based sample of women from Porto Alegre. A total of 9234 women above the age of 15 years participating in a large population-based cohort study (the Núcleo Mama Porto Alegre – NMAMA - Cohort) were analyzed. At inclusion in the cohort, all patients responded to a brief questionnaire about family history of breast, ovarian and colorectal cancer. Patients answering positively to at least one of these questions were referred to genetic cancer risk assessment (GCRA) by a clinical cancer geneticist in a secondary health care center, the Núcleo Mama Porto Alegre (NMPOA). Of the 9234 women enrolled in the cohort study, 1286 (13.9%) reported a positive family history. All 1247 women with a positive family history and above age 18 years were invited to participate in this study. Of these 1247, 902 women effectively participated in the GCRA sessions. During these evaluations detailed medical and family histories were obtained and registered in pedigrees and cancer risks estimates were done. The probability of a *BRCA1* or *BRCA2* mutations causing hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome was estimated using several models. All pedigrees were reviewed by clinical geneticists to assess presence of criteria for the diagnosis of Li-Fraumeni (LFS), Li-Fraumeni *like* (LFL), Hereditary Breast and Colon Cancer (HBOC) and Cowden Syndromes. Patients fulfilling criteria for a breast cancer predisposition syndrome were offered genetic testing. Of the 902 women submitted to GCRA, 688 (76.3%), did not fulfill

criteria for a breast cancer predisposition syndrome. Of these, 633 (92.0%) and 55 (8.0%) women were classified as average to slightly increased (estimated lifetime risk <20%) and moderate-increased risk (estimated lifetime risk =20%), respectively, according to their estimated lifetime risk for developing breast cancer. Of the 902, 214 (23.7%) women from 183 families, fulfilled criteria for one or more of the breast cancer predisposition syndromes considered in our study (HBOC, SLF/LFL and HBCC). None of the patients assessed reported a personal and/or family history suggestive of Li-Fraumeni or Cowden's Syndrome. When the 183 families were classified according to the different breast cancer predisposition phenotype, 65 had criteria for HBOC, 122 for LFL and 22 for HBCC. Some families fulfilled criteria for more than one syndrome. Of the 183 families, 50 (27.3%) underwent genetic testing. Eighteen HBOC families were screened for the presence of *BRCA1* and *BRCA2* germline mutations using a DHPLC strategy followed by sequencing of the variant fragments. For *BRCA1*, a screen for genetic rearrangements using long-range PCR was also performed. An unexpected high number of families fulfilled criteria for LFL syndrome (122 families, 13.5% of the entire sample). Forty of these underwent *TP53* germline mutation testing by DHPLC and sequencing. Of the 22 families that fulfilled criteria for HBCC, 7 were studied for the presence of the *CHEK2* 1100delC mutation. Germline mutations were found in only two of the families studied. The germline *TP53* mutation R273C (exon 8) was found in one LFL family and *CHEK2* 1100delC was found in one of the HBCC families. No previously described deleterious mutations in *BRCA1* and *BRCA2* were identified. In *BRCA1*, 2 new variants, 9 variants with no clinical significance and one alteration previously described and characterized as a variant of unknown significance (VUS) were encountered. In *BRCA2*, 9 new variants, 8 variants without associated clinical significance and 5 VUS were encountered. Segregation analyses of these novel variants and VUS is underway. Large *BRCA1* gene rearrangements were not identified in this sample.

Among the limitations of this study we can point to the relatively small number of families that accepted genetic testing, but we feel that this finding is not entirely unexpected. It could be in part explained by study design, were women from the community were recruited for GCRA, and many of them never considered such an evaluation or were never concerned with genetic risk. Furthermore, these women were identified in a primary health care setting and not in oncology or cancer genetics clinics.

Another concern is that only a proportion of cancers in probands and/or relatives was confirmed, and therefore, there may be misclassifications of cancer site, tumor type as well as age at tumor diagnosis. Additional investigations should be offered to all families studied here to increase the likelihood of identifying causative factors for their cancer phenotypes. In addition, further studies, on a larger sample should be conducted to verify if indeed the prevalence of germline mutations in common breast cancer predisposition genes is that low in this population. If it is, we may have to revise criteria for genetic testing in this population and thoroughly investigate the contribution of different and/or novel high penetrance genes or the influence of multiple, more prevalent genetic variants of lower penetrance or even to investigate the contribution of non-genetic factors for this higher incidence and mortality rates in our region. To our knowledge this is the first report of the prevalence of HBC phenotypes and germline mutations in corresponding breast cancer predisposition genes in a sample of at-risk individuals selected from a community-based cohort in Brazil and South America.

5. INTRODUÇÃO

5. INTRODUÇÃO

5.1 HISTÓRICO E IMPORTÂNCIA

5.1.1 Dados demográficos

A América Latina é formada por países de renda moderada a baixa mas com alguns indicadores de saúde pública semelhantes aos padrões observados em países desenvolvidos. A população latino-americana apresenta uma enorme diversidade étnica e cultural, determinada por sua história, e diferentes graus de miscigenação entre populações nativas e imigrantes. A maioria dos países apresenta uma renda *per capita* anual de média a baixa e, ao final do século 20, em torno de 46.0% da população ainda vivia em condições de extrema pobreza (<http://www.paho.org/english/dd/ais/coredata.htm>). O crescimento populacional continua ascendente, apesar da redução das taxas de fertilidade e de natalidade, devido ao declínio nos índices de mortalidade e aumento da expectativa de vida. Essa tendência pode ser uma das causas para o aumento na importância das doenças genéticas, em termos de frequência relativa, na maioria dos países latino-americanos.

O Brasil é o maior e mais populoso país do continente, sendo dividido em 26 estados, os quais são agrupados em cinco grandes regiões, com um total de 160 milhões de habitantes. A renda *per capita* anual média é, em torno de 9.200 reais. Aproximadamente metade do rendimento do país é distribuído entre os 10.0% da população com maior concentração de bens. A taxa de mortalidade infantil é de 42 em 1000 recém-nascidos vivos (podendo variar de 6 a 150 em algumas áreas) e 83.0% da população é alfabetizada (<http://www.datasus.gov.br>; <http://www.ibge.gov.br>).

O Rio Grande do Sul (RS) tem uma área de 281.734 km² e uma população de aproximadamente 10 milhões de habitantes. Em torno de 82.0% da população reside em áreas urbanas, 93.5% é alfabetizada e a renda *per capita* média é de 6.600 reais/ano. A expectativa de vida é, em média, 73.4 anos, e a taxa de mortalidade infantil situa-se em torno de 15 por 1000 recém-nascidos vivos. A população do RS é heterogênea e recebeu grande influência de imigrantes europeus, sendo que a descendência européia registrada nesse Estado é provavelmente uma das maiores do país. (Marrero *et al.*, 2005; <http://www.datasus.gov.br>; <http://www.ibge.gov.br>)

Porto Alegre (capital do RS) possui uma área de 496.1 km², distribuída entre a parte continental de 452.7 km² e um conjunto de ilhas, que correspondem a 43.4 km². Os indicadores de desenvolvimento humano e condições de vida da cidade de Porto Alegre, nas avaliações realizadas pelo Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento, em 1998 e 2003, situaram-se em patamar elevado entre as grandes metrópoles brasileiras. No período 1991-2000, a taxa de mortalidade infantil decresceu 14.5%, chegando a 18.1 em 2000. Durante a década de 1990, a expectativa de vida dos porto-alegrenses aumentou em 1.6 anos, alcançando 71.5 anos em 2000, sendo esta similar à dos países de alta renda. A taxa de alfabetização de pessoas com idade igual ou superior a 15 anos, que já era considerada uma das mais elevadas entre as capitais brasileiras, aumentou de 95.1% em 1991 para 96.5% em 2000, correspondendo à de Países considerados de alto desenvolvimento humano. Em relação aos serviços urbanos básicos, o percentual de domicílios urbanos que contam com água encanada cresceu de 95.7% em 1991 para 97.8% em 2000, ao passo que a coleta de lixo, que era um serviço disponibilizado a 97.0% dos domicílios, passou a abranger 99.3% das residências em 2000. No período mencionado (1991-2000), a renda *per capita* mensal média dos porto-alegrenses, que era de 525.2 reais, passou a 709.9 reais, apresentando um crescimento de 35.2%. No entanto, a pobreza absoluta, que atingia 11,0% das pessoas em 1991, aumentou 2.8%, enquanto que a indigência, que atingia 3.2% das pessoas em 1991, passou a 4.3% em 2000 (Porto Alegre, 2004; <http://www2.portoalegre.rs.gov.br/observatorio>).

No entanto, observar uma metrópole através de seus valores médios tende a obscurecer os diferenciais existentes nas condições de vida no seu interior e pode não apresentar com clareza a situação dos extremos e suas características. O presente trabalho incluiu mulheres atendidas em 18 unidades do Programa Saúde da Família (PSF) situadas nas regiões Centro-Sul, Sul, Extremo-Sul e do Arquipélago (ilhas) de Porto Alegre (Figura 1), que, em conjunto, concentram 55.7% da população de Porto Alegre e apresentam imensa variação em relação às médias de dados demográficos apresentados para a Capital. As Ilhas, por exemplo, apresentam o segundo maior coeficiente de mortalidade infantil da cidade (20.4/1000 nascidos vivos). Em relação ao nível de ensino médio, destaca-se a região Centro-Sul (também incluída no presente estudo), onde apenas 18.8% da população de 15 a 17 anos está regularmente matriculada na escola. No que se refere às condições habitacionais nessas regiões, encontram-se aí as piores situações quanto ao abastecimento

de água, saneamento básico e recolhimento de lixo. Destaca-se ainda a região que compreende, dentre outros, o bairro Restinga, que apresenta um Índice de Vulnerabilidade Social muito baixo, devido a uma combinação de situações adversas de insuficiência de renda, baixa escolaridade e precariedade habitacional, resultando em um dos piores indicadores sociais de Porto Alegre (Porto Alegre, 2004) (Figura 2).

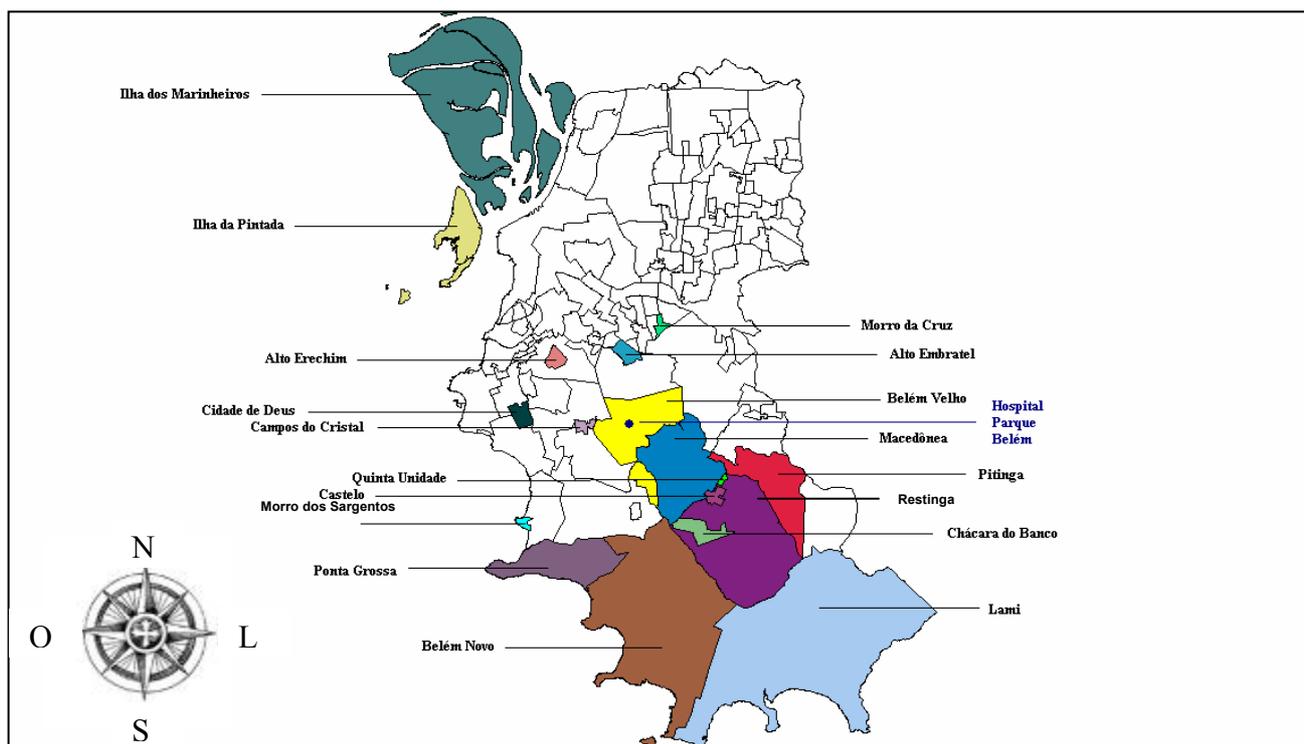


Figura 1. Mapa de Porto Alegre, com destaque para as regiões das 18 unidades do PSF incluídas no presente estudo.



A) Meio de transporte utilizado para coleta do lixo



B) Moradia de uma família residente na região do Arquipélago



C) Morádias de famílias residentes nos Arquipélagos



D) Família reunida na atividade de separação do lixo

Figura 2. Fotografias de algumas das regiões incluídas no presente estudo

5.1.2 Atendimento à saúde e serviços de genética no Brasil

Nas últimas décadas, o Brasil vem passando por profundas mudanças sociais e econômicas. Estas incluem, entre outras, o declínio na taxa de natalidade e mortalidade; intensa industrialização, com o subsequente processo de urbanização que leva ao êxodo rural e a profundas alterações na estrutura familiar, inclusive aumento na renda devido à entrada da mulher no mercado de trabalho; melhorias nas condições sanitárias, levando a uma diminuição da mortalidade ocasionada por doenças infecciosas e aumento na expectativa de vida. O panorama criado por essas modificações deu origem a um novo contexto socioeconômico no Brasil, onde o câncer emergiu como um importante problema de saúde pública (Carvalho & Manco, 1992; Haddad & da Silva, 2000; Koifman & Koifman, 2003; Godinho & Koch, 2004).

Agrega-se à importância epidemiológica destas doenças o alto custo gerado pelo seu tratamento, principalmente quando o diagnóstico é feito em estágios avançados, custo esse que se reflete tanto no orçamento governamental quanto pessoal (para o paciente). Os custos do tratamento do câncer incluem gastos com testes diagnósticos, hospitais, médicos, medicamentos (nos quais está imbutido o preço da pesquisa clínica e pré-clínica, patentes, divulgação do produto no mercado), entre outros (Meropol & Schulman, 2007).

Sendo o câncer uma doença predominantemente da idade adulta e dada a transição epidemiológico-demográfica do país, a incidência das neoplasias tenderá a aumentar ainda mais (Meropol & Schulman, 2007). Considerando o contexto de profundas mudanças socioeconômicas e de perfil epidemiológico das doenças, e os altos custos para o tratamento do câncer, destaca-se a importância da criação de programas de rastreamento populacional e prevenção, que favoreçam a detecção em estágios iniciais, onde a chance de cura pode atingir 95.0% para alguns tumores (Smith *et al.*, 2006; Meropol & Schulman, 2007; Knudsen *et al.*, 2007).

Nesse contexto de otimização do atendimento à saúde em um novo panorama social e econômico, deve ser ressaltada a importância da educação da comunidade. É preciso educar a população a respeito dos benefícios da prevenção, e disseminar a idéia de que o câncer nem sempre é fatal se diagnosticado precocemente e, em muitos casos, ele pode ser totalmente curável. No entanto, como a detecção ainda se dá, frequentemente, em estágios avançados, fato associado a um mau prognóstico e alta mortalidade, cria-se a percepção de

que o câncer sempre é fatal e potencializa-se o medo do diagnóstico e da procura pela ajuda especializada. No caso do câncer de mama, o conhecimento de que muitas mulheres serão “sobreviventes” da doença a longo prazo, pode estimular a busca por prevenção e detecção precoce, resultando assim na diminuição da taxa de mortalidade e aumento no número dessas “sobreviventes” (Smith *et al.*, 2006). Além disso, como destacado por Godinho & Koch (2002; 2004), o sucesso de um programa de rastreamento depende não somente da disponibilidade de infra-estrutura, como também do engajamento do paciente e do médico. A falta de hábito de procurar atendimento preventivo e a rotulação de “desnecessários” aos exames de rastreamento solicitados são frutos da falha no processo de orientação da paciente por parte do profissional de saúde, que não tem valorizado ou explorado o lado educacional do ato médico.

A Constituição Brasileira garante o direito à assistência médica em qualquer local do país. Grande parte da população (em torno de 75.0%) depende quase inteiramente de cuidados à saúde providos pelo Governo. Cuidados primários, secundários e terciários à saúde pública são providos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) (www.datasus.gov.br). Seus princípios básicos, de acordo com a Constituição Federal, são: universalidade, equidade, gratuidade e integralidade no cuidado à saúde a todos os cidadãos brasileiros em nível primário, secundário e terciário. Um programa especial que tem como prioridade o atendimento à saúde comunitária e o resgate dos vínculos de compromisso e corresponsabilidade entre os serviços de saúde, profissionais da saúde e população, é o Programa Saúde da Família (PSF). Este programa foi criado na metade dos anos 90 e é baseado em equipes de cuidado à saúde, formadas por um médico, um enfermeiro, um auxiliar de enfermagem e quatro a seis agentes comunitários de saúde. Cada equipe atende em torno de 600 famílias (aproximadamente 3400 indivíduos) de uma certa área geográfica. Os PSFs têm se expandido rapidamente no país e atualmente cobrem 45.0% da população brasileira (Ramalho & Silva, 2000; Brasil, 2003; Harzheim *et al.*, 2006; <http://www.saude.gov.br/psf>).

Os Serviços de Genética no Brasil, assim como no restante da América Latina, vêm se desenvolvendo lentamente e com dificuldades. Segundo Penchaszadeh (2000), essas dificuldades se devem a diversos motivos, tais como: a) ainda existem diversos cuidados a serem tomados em relação a outras áreas da saúde (p. ex.: desnutrição, doenças infecciosas); b) doenças genéticas ainda não são consideradas prioridades; c) os serviços

genéticos são encarados como caros e voltados apenas para doenças raras; d) seu valor preditivo é erroneamente associado com interrupção de gestações afetadas, o que vai contra a legislação brasileira e setores tradicionais da sociedade; e e) a população não tem real consciência a respeito de riscos genéticos e possibilidades de prevenção. Apesar dessas dificuldades, Serviços de Genética vêm sendo desenvolvidos, estando principalmente localizados em hospitais universitários de cidades maiores, a maioria deles isolados de serviços de saúde de atenção primária. Com algumas exceções, serviços de saúde municipais, estaduais e mesmo nacionais não possuem políticas de prevenção e cuidados populacionais relativos a doenças genéticas.

Cerca de uma dezena de serviços de genética e câncer foram criados na última década no Brasil. Eles estão predominantemente localizados em hospitais universitários de capitais brasileiras. O teste genético para câncer de mama hereditário, em si, não está disponível localmente, e não recebe cobertura do SUS ou de planos de saúde privados. Existem dois hospitais públicos na região central do Brasil que desenvolvem projetos de pesquisa com o intuito de testar pacientes em risco provenientes de seus próprios serviços. No entanto, apenas parte das amostras de pacientes em risco, quando reconhecidos, são enviadas para alguns poucos laboratórios comerciais para realização do teste genético ou para laboratórios de pesquisa, principalmente através de projetos colaborativos com Instituições Internacionais (Palmero *et al.*, 2007a).

5.1.3 Câncer no Brasil e Rio Grande do Sul

O câncer é considerado um problema de saúde pública há muito tempo em países desenvolvidos. No entanto um aumento na incidência de câncer tem sido também observado em países de baixa renda, especialmente na América Latina (Gallo *et al.*, 2005).

O Brasil também registra incidências crescentes de câncer, com um perfil epidemiológico de tumores que mostra uma sobreposição entre neoplasias normalmente associadas à pobreza (estômago, útero, fígado e cavidade oral), e aquelas mais frequentes em países desenvolvidos (câncer de mama, próstata, pulmão e colon) (Koifman & Koifman, 2003; Gallo *et al.*, 2005). Os tipos de câncer frequentes nos países desenvolvidos estão associados principalmente a fatores da dieta, tabaco, falta de exercício físico e exposição a uma ampla gama de fatores de risco, decorrentes do processo de industrialização e

urbanização, como agentes físicos, químicos e biológicos, bem como de uma possível associação entre exposição a pesticidas e aumento de incidência de tumores hormônio-dependentes (como mama, ovário, próstata, tireóide, testículo) (Cocco, 2002). Em relação aos tumores associados à pobreza, destacam-se como possíveis fatores causais o consumo de álcool e cigarro (nos casos de câncer na cavidade oral, laringe e faringe) e infecção por HPV no caso do câncer de cérvix uterina (a incidência deste tumor nas regiões Norte e Nordeste é considerada uma das maiores do mundo) (Parkin *et al.*, 1997). Em relação ao câncer de estômago, destaca-se como principal agente causal a infecção por *Helicobacter pylori*, que causa lesões na mucosa, facilitando assim a absorção de nitrosaminas, um potente carcinógeno contido em diversos alimentos (Britto, 1997).

No entanto, ao analisarmos o padrão de ocorrência de tumores nas diferentes regiões brasileiras, devemos levar em consideração que algumas dessas regiões, como por exemplo o Nordeste, apresentam registros de incidência e mortalidade por câncer deficientes ou mesmo inexistentes, introduzindo assim o problema frequentemente encontrado de sub- ou superestimativa da incidência de câncer nas diferentes regiões (Gallo *et al.*, 2005).

5.1.4 Câncer de mama no Brasil e Rio Grande do Sul

Devido ao seu prognóstico relativamente bom (dados europeus apontam uma taxa de sobrevivência de 91.0% no primeiro ano pós-diagnóstico e de 65.0% nos 5 anos subsequentes), e a sua alta incidência, o câncer de mama é hoje o mais prevalente no mundo, sendo que existem em torno de 3.7 milhões de mulheres “sobreviventes” nos primeiros 5 anos após o diagnóstico. Este é um número muito significativo se comparado a outros tumores, como por exemplo, o câncer de pulmão, que registra 1.3 milhões de “sobreviventes” (homens e mulheres) após 5 anos do diagnóstico (Parkin *et al.*, 2001; Kamangar *et al.*, 2006).

No Brasil, o câncer de mama é a primeira causa de morte relacionada a câncer em mulheres de todas as idades. No RS, as estimativas para as taxas de incidência (2006) e mortalidade (2004) de câncer de mama foram de 88.8 e 17.9 por 100.000 indivíduos, respectivamente, enquanto que as estimativas para as taxas nacionais de incidência e mortalidade referentes aos mesmos períodos foram, respectivamente, 51.7 e 10.6 /100.000

indivíduos. No RS, o câncer de mama é a primeira causa de morte por câncer em mulheres de todas as idades, inclusive nas mulheres jovens (30-49 anos). Um fator que contribui para essa alta taxa de mortalidade é que no mínimo 30.0 a 40.0% de todos os casos são ainda diagnosticados em estágios mais tardios da doença (estágios III e IV). Em Porto Alegre (capital do RS), as estimativas para 2006 indicam um total de 1140 novos casos de câncer de mama, estando esse índice entre os maiores do país (Porto Alegre é a terceira capital brasileira com maior incidência de câncer de mama) (Silveira *et al.*, 2000; <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006>).

5.2 CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO

5.2.1 Características gerais

O câncer resulta de uma série de alterações genéticas que levam a uma progressiva desordem dos mecanismos normais de controle do ciclo celular (crescimento, diferenciação e morte celular). A resposta das células aos danos no seu material genético e sua habilidade de manter a estabilidade genética através da maquinaria de reparo é essencial na prevenção da iniciação e progressão tumoral (Bau *et al.*, 2006).

Do total de casos de câncer de mama diagnosticados a cada ano, estima-se que 5.0% a 10.0% sejam hereditários, ou seja, causados por uma alteração genética herdada que confere a seu portador um risco de câncer significativamente maior que o da população. Os rápidos avanços em técnicas de biologia molecular nas últimas décadas resultaram na identificação de genes que, quando alterados, aumentam significativamente o risco de desenvolver câncer de mama, câncer de ovário e outros tumores, dentre os quais destacam-se os genes supressores tumorais *BRCA1* e *BRCA2* (Miki *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1994). Outros genes de predisposição ao câncer de mama foram identificados, e são igualmente importantes no risco para a doença, embora correspondam a uma parcela menor dos casos hereditários. Dentre esses, estão *TP53* (Malkin, 1990), *CHEK2* (Bell *et al.*, 1999; Meijers-Heijboer *et al.*, 2003), *ATM* (Savitsky *et al.*, 1995), *PTEN* (Eng, 1997; Lynch *et al.*, 1997), *STK11* (Giardiello *et al.*, 1987; Hemminki *et al.*, 1998; Jenne *et al.*, 1998), e, mais recentemente o gene *TWIST1* (Sahlin, 2007).

A identificação de indivíduos em risco para câncer hereditário é importante por várias razões. Primeiro, porque indivíduos afetados apresentam risco cumulativo vital muito superior ao da população para vários tipos de câncer. Segundo, porque outros familiares de um indivíduo afetado podem estar em risco para o câncer hereditário. Terceiro, porque medidas de rastreamento intensivo e intervenções preventivas (cirurgias profiláticas e quimioprofilaxia) se mostram eficazes em reduzir significativamente o risco de câncer em portadores de mutação (Rebbeck, 1999; Hartmann *et al.*, 1999; Eisen *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2001; Meijers-Heijboer *et al.*, 2001; Shih & Chatterjee, 2002; Kauff *et al.*, 2002; Rebbeck *et al.*, 2002; Eisen *et al.*, 2005). A tecnologia atualmente nos permite diagnosticar uma mutação genética muito antes do aparecimento dos sintomas. No caso da predisposição hereditária ao câncer de mama, que é uma doença de início na vida adulta, o diagnóstico pré-sintomático de um indivíduo afetado tem um enorme potencial para redução do risco de câncer. Por outro lado, a identificação precisa de um indivíduo não portador de uma alteração genética em uma família de risco permite a tranquilização do indivíduo e elimina os gastos e complicações de rastreamento e intervenções preventivas desnecessárias (Grusenmeyer & Wong, 2007; Meropol & Schulman, 2007).

A história familiar de câncer em familiares de primeiro grau e a presença de alguns fatores específicos de risco, como câncer de mama bilateral, história familiar de câncer de mama e ovário e câncer de mama em indivíduo do sexo masculino, são indicadores importantes de risco para o câncer de mama hereditário (Easton, 2002; Page *et al.*, 2003). Na verdade, pouca atenção tem sido dada à identificação desses fatores de risco na comunidade e nos serviços de atenção primária à saúde. Os próprios profissionais da saúde, em sua maioria, não estão alertas para o problema, e muitas vezes desconhecem o que se pode oferecer à paciente em termos de diagnóstico e manejo. Mesmo quando pacientes de alto risco genético são identificados, eles (e suas famílias) não têm fácil acesso a uma investigação genética abrangente. Os dois únicos serviços públicos de aconselhamento genético do câncer de mama no Rio Grande do Sul estão em Porto Alegre, inseridos em hospitais terciários (Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Hospital Santa Rita), e atendem primariamente à população de pacientes dessas instituições que já foram diagnosticadas com câncer de mama. Apesar de existir nesse contexto um potencial grande para prevenção do câncer em familiares ainda assintomáticos de uma paciente de alto risco hereditário, o aconselhamento genético nesses serviços segue o modelo tradicional retrospectivo. Nesses

serviços, o aconselhamento genético do câncer se caracteriza por uma atividade intramural isolada da comunidade como um todo, que envolve recrutamento passivo em uma estrutura terciária de alta complexidade e custo e que tem uma cobertura populacional restrita (Palmero *et al.*, 2007a).

Embora exista uma grande preocupação com a alta prevalência do câncer de mama no Rio Grande do Sul, e freqüentemente seja feita uma alusão à influência de “algum fator genético” para risco de câncer de mama na nossa população, ao nosso conhecimento, nenhuma investigação sistemática populacional de risco genético foi realizada até hoje. Nesse contexto, o trabalho aqui apresentado se propõe a estudar a prevalência de fatores de risco para o câncer de mama hereditário em uma amostra da população de Porto Alegre, bem como disponibilizar o aconselhamento genético e o teste genético confirmatório a todos os indivíduos de alto risco que assim desejarem. Para os indivíduos, a sua identificação e caracterização molecular (e a de seus familiares) permitirão estabelecimento mais objetivo do risco de desenvolver câncer de mama e outros tumores. Essa informação poderá facilitar decisões pessoais e médicas a respeito da melhor intervenção no sentido de diagnóstico precoce e/ou prevenção do câncer. Para a comunidade, a ampla caracterização demográfica e genética de uma população proporciona uma oportunidade ímpar para melhorar o nosso entendimento sobre o diagnóstico e epidemiologia do câncer de mama hereditário em nosso meio. Além disso, o modelo aqui apresentado poderá ser utilizado futuramente para criar uma rotina de identificação de indivíduos em risco para doenças genéticas, como o câncer de mama hereditário, a nível populacional.

5.2.2 Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama

5.2.2.1 Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Ovário (HBOC)

5.2.2.1.1 Histórico e Riscos Associados

Relatos iniciais de uma predisposição hereditária ao câncer de mama, devido a vários casos da neoplasia em uma família, datam de 1866 quando Broca descreveu uma família na qual 10 mulheres haviam sido diagnosticadas com câncer de mama em quatro

gerações (Broca, 1866). Cady (1970) descreveu uma família na qual três irmãs apresentavam diagnóstico de câncer de mama bilateral. Anderson (1976) propôs que mulheres com história familiar de primeiro grau de câncer de mama (irmã e mãe) possuíam um Risco Cumulativo Vital (RCV) de desenvolver câncer de mama 47 a 51 vezes maior que o risco da população em geral. O mesmo autor relatou que nessas mulheres, o câncer geralmente se desenvolvia antes da menopausa, era bilateral e parecia estar associado à função ovariana. Centenas de estudos posteriores confirmaram os achados iniciais de uma predisposição aumentada ao câncer de mama com base em achados da história familiar (Petrakis, 1977; Ottman *et al.*, 1983; Kozak *et al.*, 1986; Hauser *et al.*, 1992; Eisinger *et al.*, 1998).

O primeiro gene relacionado à síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC OMIM #114480), *BRCA1* (OMIM #113705), foi identificado em 1994 por Miki *et al.*. Esse gene foi mapeado no cromossomo 17q12-23 e sua descoberta foi decorrente de estudos de ligação em membros de famílias com múltiplos casos de câncer de mama e ovário. O segundo gene associado à predisposição hereditária ao câncer de mama, ovário e outros tumores é o gene *BRCA2* (OMIM #600185), localizado no cromossomo 13q12-13 e que, a exemplo de *BRCA1*, também é considerado um gene supressor tumoral (Wooster *et al.*, 1994).

Estima-se que cerca de 5,0% a 10,0% de todos os casos de câncer de mama e ovário são causados por mutações germinativas em genes autossômicos dominantes de alta penetrância, e, destas, cerca de 60,0% a 80,0% são mutações em *BRCA1* e *BRCA2* (Miki *et al.*, 1994; Wooster *et al.*, 1994; Easton *et al.*, 1995; Nathanson *et al.*, 2001; Antoniou *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2003).

Acredita-se que o gene *BRCA1* seja responsável por cerca de 45.0% a 50.0% de todos os casos de câncer de mama hereditário. Portadoras de mutação germinativa nesse gene têm um RCV de desenvolver câncer de mama de 40.0% a 65.0% até os 80 anos de idade (Cass *et al.*, 2003; Risch *et al.*, 2006). Além disso, o RCV para câncer de ovário nessas pacientes também é significativamente maior, e pode chegar até 40.0% aos 80 anos de idade (Cass *et al.*, 2003; Antoniou *et al.*, 2006). Outros tumores que parecem ser mais freqüentes em portadores(as) de mutações em *BRCA1* incluem o câncer de trompa de falópio, o câncer de próstata e tumor de Wilms (Offit, 1998; Thompson & Easton, 2002; Hodgson *et al.*, 2007). Além disso, diversos estudos relatam um risco aumentado para

câncer de mama associado a mutações germinativas em *BRCA1* em homens (Struewing *et al.*, 1995; Couch *et al.*, 1996; Liede *et al.*, 2004), embora represente uma associação menos freqüente do que a relatada para câncer de mama masculino e mutações germinativas no gene *BRCA2*.

O gene *BRCA2*, quando alterado, aumenta o risco de desenvolvimento de múltiplos tumores. *BRCA2* é responsável por cerca de 30.0% a 40.0% de todos os casos de câncer de mama hereditários. O RCV para câncer de mama em mulheres portadoras de mutações germinativas nesse gene é similar ao risco de portadoras de mutações germinativas em *BRCA1* (40.0% a 65.0% até os 80 anos de idade) (Belogianni *et al.*, 2004; Antoniou *et al.*, 2006; Risch *et al.*, 2006), enquanto que o risco para câncer de ovário é de 15.0% a 30.0% (Cass *et al.*, 2003). Embora menor que o RCV para câncer de ovário associado a mutações germinativas em *BRCA1*, este risco ainda é 10 vezes maior que o da população em geral (The Breast Cancer Linkage Consortium, 1999). Homens com mutações germinativas em *BRCA2* têm um RCV significativamente maior que o da população de desenvolver câncer de mama, cerca de 6.0% até os 70 anos de idade, o que representa um aumento de 80-100 vezes o risco para a população em geral (Karhu *et al.*, 2006).

Além de câncer de mama e ovário, há um aumento do RCV para diversos outros tumores em portadores de mutação germinativa de *BRCA2*: tumores de vias biliares, bexiga, esôfago, pâncreas, próstata, estômago, sistema hematopoiético, cavidade oral e faringe, e melanoma (Offit, 1998; The Breast Cancer Linkage Consortium, 1999; Thompson & Easton, 2002).

5.2.2.1.2 Aspectos moleculares e funcionais

O gene *BRCA1* é composto de 22 exons codificantes, distribuídos em cerca de 100 kb de DNA genômico e codifica uma proteína de 1863 aminoácidos (Bertwistle & Ashworth, 1999) (Figura 3). Em relação à sua estrutura, a proteína *brca1* apresenta, na região amino-terminal, um motivo *dedo-de-zinco* (“Zinc-finger” ou “RING-finger: Really Interesting New Gene”), caracterizado pela presença de uma seqüência de aminoácidos que contém três cisteínas, uma histidina e quatro cisteínas em proximidade - C3HC4 – e que apresenta importante função na interação de *brca1* com diversas proteínas (Boddy *et al.*, 1994; Wu *et al.*, 1996), além de uma considerável variabilidade no processamento

decorrente da heterogeneidade das junções intron-exon da região 5' do gene (Fortin *et al.*, 2005). Além do motivo “dedo de zinco” na região N-terminal, encontram-se, ao longo do exon 11, dois domínios de localização nuclear. Além disso, a proteína brca1 apresenta uma região de interação com rad51 e, na região carboxi-terminal da proteína, uma concentração de aminoácidos de carga negativa, que formam dois domínios BRCT (“BRCA C Terminus”), envolvidos na manutenção da estabilidade da proteína brca1 (Koonin *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1996), bem como na sua interação com outras proteínas (Deng & Brodie, 2000; Wang *et al.*, 2000; Cantor *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001). Os domínios BRCT são encontrados em diversas proteínas envolvidas no reparo de danos ao DNA e na regulação do ciclo celular (Venkitaraman, 2001) (Figura 3).

Uma das técnicas para estudar a função de um gene é a criação de animais transgênicos deficientes (ou com hiperexpressão) para o gene em questão. Estudos em camundongos deficientes no gene *BRCA1* têm sido de grande importância para elucidar vários aspectos das suas funções, e o que se observa é que camundongos *BRCA^{-/-}* morrem entre os dias 6.5 e 8.5 pós-implantação por falta de proliferação no blastócito murino (Gowen *et al.*, 1996; Hakem *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996). No entanto, a criação de camundongos *BRCA^{-/-} TP53^{-/-}* retarda, mas não evita, a letalidade embrionária, o que sugeriu que *BRCA* e *TP53* pudessem estar em uma mesma rota funcional (Hakem *et al.*, 1997; Copson *et al.*, 2006). Camundongos heterozigotos para o gene defeituoso (*BRCA^{+/-}*) têm fertilidade e sobrevivência normais e não são predispostos a tumores (Hakem *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1996). Já em humanos, a herança de um único alelo defeituoso é suficiente para aumentar a predisposição ao câncer (Venkitaraman, 2001).

O gene supressor tumoral *BRCA2* apresenta 26 exons codificantes e origina uma proteína com 3418 aminoácidos (brca2) (Figura 3). Apresenta como característica marcante a presença de oito repetições de 30-80 aminoácidos (domínio BRC) ao longo do exon 11 (Figura 4). Essas repetições estão envolvidas na interação com a proteína rad51, que atua nos processos de reparo e recombinação. A proteína apresenta, além desses oito domínios, uma região de ativação transcricional e uma região adicional de interação com rad51 (Bertwistle & Ashworth, 1999). A proteína brca2, juntamente com rad51, está envolvida na manutenção da estabilidade genômica através do seu papel fundamental nos processos de reparo de quebra das duas fitas de DNA por recombinação homóloga (Arnold *et al.*, 2006). Estudos realizados com camundongos transgênicos, deficientes para *BRCA2*,

revelam que uma perda total do gene acarreta letalidade na maioria dos animais (Ludwig *et al.*, 1997). No entanto, a inativação bialélica em algumas regiões de *BRCA2* pode levar a um fenótipo de anemia, hoje considerado um subtipo da Anemia de Fanconi, doença caracterizada por extrema sensibilidade a agentes causadores de danos cromossômicos, os quais originam quebras cromossômicas e favorecem o desenvolvimento do câncer (Howlett *et al.*, 2002; Arnold *et al.*, 2006).

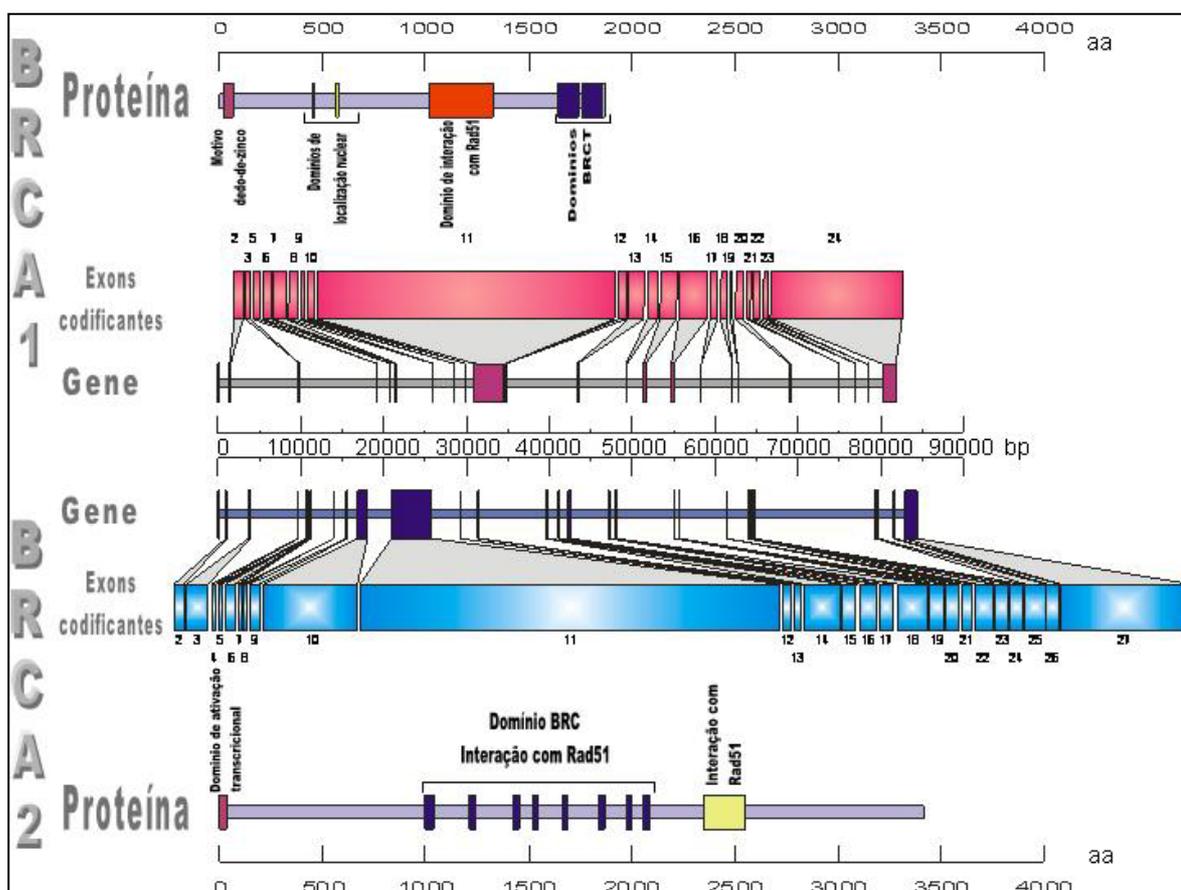


Figura 3. Representação esquemática dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, dos seus exons codificantes, proteínas e domínios funcionais

Nota: A representação gráfica do gene *BRCA1* foi baseada no Gen Bank (Entry U 14680); a representação gráfica do gene *BRCA2* foi baseada no Gen Bank (Entry NM 000059). As informações sobre os domínios funcionais de *BRCA1* foram retiradas de <http://www.ebi.uniprot.org> (número de acesso PRO_0000055830); as informações sobre os domínios funcionais de *BRCA2* foram retiradas de <http://www.ebi.uniprot.org> (número de acesso PRO_0000064984)

A função de ambos os genes (*BRCA1* e *BRCA2*) está relacionada a aspectos centrais ao metabolismo celular, tais como reparo de danos ao DNA, regulação da expressão gênica e controle do ciclo celular (Tutt & Ashworth, 2002; Quaresima *et al.*, 2006). Variações patológicas nesses genes podem acarretar alterações na função das proteínas, na transcrição e também no reparo a danos no DNA, levando ao conseqüente acúmulo de mutações e posteriormente à instabilidade cromossômica, a qual pode ser diretamente responsável pelo surgimento do câncer. Dessa forma, mutações em *BRCA1/2* conferem um alto risco de câncer, mas não ocasionam diretamente o seu surgimento, atuando como genes “cuidadores do genoma” (“*caretakers*”), preservando a estabilidade cromossômica e, quando inativados, possibilitam o acúmulo de mutações em múltiplos genes. A natureza das alterações subseqüentes à inativação de *BRCA1/2* é que definirá o destino celular, seja correção do defeito, proliferação celular descontrolada ou apoptose (Cipollini *et al.*, 2004; Rosen *et al.*, 2005).

Embora não haja grande homologia de seqüência entre *BRCA1* e *BRCA2*, esses genes compartilham diversas similaridades. Dentre elas, destaca-se o fato de que mutações germinativas em ambos os genes predisõem a câncer de mama e de ovário; ambos codificam proteínas extensas, possuem um primeiro exon não-codificante e um exon central (exon 11) maior que os demais (o exon 11 de *BRCA1* compreende mais de 60.0% da região codificadora (Bertwistle & Ashworth, 1999)). Além disso, ambos são pouco conservados ao longo da escala evolutiva (a proteína *brca1* humana apresenta apenas 55.8% de identidade de seqüência com a proteína do camundongo e 74.6% com a do cão), ambos atuam como ativadores transcricionais; ambos se ligam (direta ou indiretamente) à *rad51* e possuem um padrão similar de regulação do ciclo celular (Lakhani *et al.*, 1998; Abkevich *et al.*, 2004).

Em relação à especificidade tecidual de *BRCA1/2*, cujos efeitos ocorrem principalmente em órgãos hormônio-responsivos como mama, ovário, útero e próstata, acredita-se que esta esteja relacionada à sua função na co-regulação da transcrição de certos genes em órgãos-alvo específicos: diversas evidências indicam que *BRCA1* se liga a fatores de transcrição seqüência-específicos e, dessa forma, estimula ou inibe a transcrição. Com base nesses achados, supõe-se que *brca1* interaja diretamente com os receptores de hormônios esteróides (ER), inbindo-os e, ao mesmo tempo, estimulando os receptores de andrógenos (AR). Assim, se alguma alteração deletéria (inativadora) ocorrer em *BRCA1/2*,

sua deficiência promove, por exemplo, um excessivo crescimento dos tecidos epiteliais da mama, devido à falta de regulação negativa dos receptores estrogênicos (Rosen *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2006; Rosen *et al.*, 2006).

5.2.2.1.3 Dados nacionais sobre a síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC)

Dados sobre agregados familiares de câncer de mama ou portadores de mutação em *BRCA1* e *BRCA2* em nosso meio ainda são escassos. Gomes *et al.* (2007), investigando 402 mulheres com história pessoal de câncer de mama provenientes do Rio de Janeiro, identificaram nove mutações, sendo seis em *BRCA1* e três no gene *BRCA2* (as 402 mulheres foram investigadas quanto à presença das três mutações freqüentes na população Judaica Ashkenazi - 185delAG, 5382insC em *BRCA1* e 6174delT em *BRCA2* – e em relação a variações presentes no exon 11 de *BRCA1* e 10 e 11 do gene *BRCA2*. Além disso, 12 pacientes foram analisadas quanto à presença de mutações em todos os exons codificantes de *BRCA1/2*). A mutação 5382insC, no gene *BRCA1*, foi detectada cinco vezes e representou 56% das mutações verificadas. É importante salientar que esta era uma amostra de pacientes com câncer de mama não-selecionadas quanto a história familiar e que uma mutação deletéria em gene *BRCA* foi detectada em 2.3% da amostra como um todo.

Dufloth *et al.* (2005) analisaram 31 pacientes brasileiras com história pessoal prévia de câncer de mama e história familiar sugestiva de HBOC, onde investigaram os exons 2, 3, 5, 11 e 20 de *BRCA1*, e os exons 10 e 11 do gene *BRCA2*. Os autores encontraram uma prevalência de 13.0% de mutação em ambos os genes (4/31).

Lourenço *et al.* (2004) analisaram 47 pacientes brasileiros com câncer de mama e/ou ovário quanto à presença de mutações germinativas no gene *BRCA1* e encontraram uma freqüência de 15,0%, similar à freqüência relatada por outros estudos que utilizaram a mesma metodologia e critérios de inclusão, recrutando mulheres com história familiar sugestiva de HBOC (Durocher *et al.*, 1996; Frank *et al.*, 1998).

Simon *et al.* (2003) analisaram 64 pacientes provenientes de São Paulo (predominantemente de origem judaica Ashkenazi e com história familiar altamente sugestiva de HBOC) e detectaram 37 indivíduos com mutações em *BRCA1/2*. Os autores

relataram a presença das três mutações comuns em judeus (185delAG, 5382insC em *BRCA1* e 6174delT em *BRCA2*) em pacientes com e sem origem Judaica Ashkenazi.

5.2.2.1.4 Diagnóstico molecular

Do ponto de vista técnico, a pesquisa de mutações germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* (teste genético) é um processo de alta complexidade, laborioso e caro. Essa dificuldade resulta do tamanho desses genes e da extensa heterogeneidade molecular observada na doença (até o presente momento mais de 3400 alterações já foram descritas para ambos os genes e encontram-se depositadas no *Breast Cancer Information Core*, disponível em <http://research.nhgri.nih.gov/bic>). Recentemente, além de mutações pontuais, grandes rearranjos gênicos em *BRCA1* e *BRCA2* vêm sendo identificados e associados ao mesmo fenótipo clássico de predisposição ao câncer de mama e ovário. Esses rearranjos são encontrados principalmente em *BRCA1*, variam de 0.5 a 23.8 kb, estão espalhados por todo o gene e acredita-se que sejam causados por eventos de recombinação envolvendo seqüências *Alu*, as quais cobrem aproximadamente 41.5% das regiões intrônicas do gene (Petrij-Bosch *et al.*, 1997; Puget *et al.*, 1997; Swensen *et al.*, 1997; Puget *et al.*, 1999a, 1999b; Payne *et al.*, 2000; Gad *et al.*, 2001; Montagna *et al.*, 2003; Preisler-Adams *et al.*, 2006). Além da existência das seqüência *Alu*, a presença de pseudogenes não-funcionais é apresentada como provável causa de recombinação desigual em *BRCA1* (Preisler-Adams *et al.*, 2006). A freqüência desses rearranjos parece ser população-dependente, podendo variar de 2.0% em mulheres norte-americanas a 36.0% em pacientes alemãs (Petrij-Bosch *et al.*, 1997; Hendrickson *et al.*, 2005). Poucos rearranjos têm sido descritos em *BRCA2*, o que pode ser explicado pelo fato de que as seqüências intrônicas desse gene contêm menor número de repetições *Alu* que *BRCA1* (Peelen *et al.*, 2000; Preisler-Adams *et al.*, 2006). Sendo assim, além do seqüenciamento de toda a região codificadora desses genes, a identificação de mutações germinativas também deve incluir a pesquisa de rearranjos por métodos laboratoriais alternativos, para evitar um grande número de falso-negativos durante a investigação molecular de famílias com a síndrome de predisposição ao câncer de mama e ovário hereditários (Frank *et al.*, 1998; Montagna *et al.*, 2003).

Atualmente, duas estratégias principais são utilizadas para identificação de mutações germinativas em seqüência codificadora dos genes *BRCA*: a) seqüenciamento de

todos os exons codificantes de ambos genes e análise comparativa da seqüência obtida com a seqüência de referência (p.ex. GenBank), ou b) rastreamento de mutações utilizando uma de diversas técnicas: *Denaturing High Performance Liquid Chromatography* – DHPLC (Oefner & Underhill, 1995; 1998; 1999; Underhill *et al.*, 1997), *Single Strand Conformation Polymorphism* – SSCP (Markoff *et al.*, 1997), *Protein Truncation Test* – PTT (Hogervorst *et al.*, 1995) ou *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* – DGGE (Fodde & Losekoot, 1994) e apenas os exons que apresentarem um padrão variante são submetidos a seqüenciamento para definição da alteração responsável pelo padrão variante encontrado. O que se preconiza atualmente é que, após a procura por mutações pontuais, e diante de um resultado negativo, recorra-se à análise de rearranjos gênicos utilizando técnicas como *Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification* – MLPA (Schouten *et al.*, 2002; Hogervorst *et al.*, 2003), *Long-Range Polymerase Chain Reaction* – PCR longo (Payne *et al.*, 2000), *Southern Bloth* (Southern, 1974), entre outras. A estratégia de combinação de uma técnica de identificação de mutações pontuais com uma técnica de rastreamento de rearranjos tem maior eficiência na detecção de mutações.

Mesmo utilizando estratégias complementares de identificação dos diferentes tipos de mutações em genes *BRCA*, um resultado negativo deve ser interpretado com cautela. Além disso, na presença de história familiar sugestiva de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário, outros fatores devem ser levados em consideração, tais como processamento (*splicing*) alternativo de um dos genes (com isoformas contendo, por exemplo, inserções de partes de íntrons) e presença de metilação no promotor levando ao silenciamento gênico. (Wilcox *et al.*, 2005; Bonatti *et al.*, 2006) Essas alterações não seriam detectadas pelos métodos tradicionais de estudo de mutações; processamento alternativo, por exemplo, somente seria detectado pela análise de RNA ou pela análise do produto protéico pela técnica de PTT, que é menos utilizada atualmente.

Assim como um resultado negativo do teste genético deve ser interpretado com cautela, o mesmo se aplica à variantes de significado desconhecido. Dados obtidos a partir do BIC mostram que aproximadamente metade das variantes detectadas em *BRCA1/2* (excluindo os polimorfismos comuns) corresponde a mutações deletérias, enquanto que as demais referem-se à variantes cuja patogenicidade é desconhecida. Estudos visando à classificação dessas variantes são de extrema importância, já que o conhecimento a respeito das implicações funcionais que essa variante pode acarretar ou não, no surgimento

do câncer, terá profundas implicações no diagnóstico clínico e no manejo dos indivíduos testados. À medida que mais estudos vão sendo realizados, a tendência é que ocorra uma diminuição no número dessas variantes, devido ao crescente conhecimento de suas funções, passando a ser classificadas como polimorfismos ou mutações deletérias (Goldgar *et al.*, 2004; Chenevix-Trench *et al.*, 2006; Phelan *et al.*, 2007). Dentre as diferentes estratégias de análise dessas variantes de significado desconhecido, destacam-se: estudos de associação nas famílias em questão, no intuito de verificar a frequência da variante nos indivíduos afetados e não-afetados por câncer; ocorrência simultânea da variante com outra mutação já descrita como sendo deletéria; análises *in silico* visando analisar a natureza e a posição da substituição, bem como o grau de conservação do aminoácido entre espécies; além de estudos funcionais (Goldgar *et al.*, 2004; Chenevix-Trench *et al.*, 2006).

Sendo assim, o teste genético não deve ser utilizado para rastreamento de quaisquer pacientes com câncer de mama, mas sim, como uma ferramenta para confirmação objetiva de uma suspeita diagnóstica que surge a partir da história médica e familiar do indivíduo. O resultado do teste genético, seja ele positivo, negativo ou inconclusivo, deve ser interpretado com extrema cautela e considerado no âmbito da história familiar em questão (Armstrong *et al.*, 2002; Sevilla *et al.*, 2002).

5.2.2.2 Síndrome de Li-Fraumeni e Síndrome de Li-Fraumeni *like* (SLF/SLFL)

5.2.2.2.1 Histórico e Riscos Associados

A Síndrome de Li-Fraumeni (SLF; OMIM #151623) foi descrita em 1969, quando, através da revisão de laudos médicos, os pesquisadores Li e Fraumeni depararam-se com laudos histopatológicos de quatro famílias de crianças com rabdomiossarcomas e verificaram que um número significativo de seus familiares apresentavam diversos tipos de câncer em idade precoce (Li & Fraumeni, 1969). Uma série de estudos epidemiológicos posteriores confirmou a existência da SLF, definindo um padrão de predisposição hereditária ao câncer similar ao descrito originalmente por Li e Fraumeni em famílias de diversos países (Li & Fraumeni, 1982; Birch *et al.*, 1984; Birch & Blair, 1988; Li *et al.*, 1988; Birch *et al.*, 1990; Achatz & Hainaut, 2005).

A síndrome de Li-Fraumeni (SLF) é uma síndrome autossômica dominante de predisposição hereditária a vários tipos de câncer, especialmente sarcomas, câncer de mama, tumores do sistema nervoso central (SNC), leucemias e tumores adrenocorticais diagnosticados em idade jovem. Sua real incidência não é conhecida, mas ela tem sido descrita como rara, diagnosticada em 373 famílias em todo o mundo e sendo responsável por menos de 1.0% dos casos de câncer de mama hereditário (<http://www.p53.iarc.fr/Germline.html>). Famílias apresentando quadros clínicos similares aos da síndrome de Li-Fraumeni clássica (descrita por Li & Fraumeni em 1969) são classificadas como Li-Fraumeni-Like (LFL), síndrome para a qual várias definições clínicas já foram propostas e que pode ser classificada por critérios bem estabelecidos, os critérios de Birch, Eeles e de Chompret (Birch *et al.*, 1994; Eeles, 1995; Chompret *et al.*, 2001). Além dos tumores inicialmente descritos, relatos sugerem uma elevada incidência de melanomas, câncer de estômago, cólon, pâncreas, ovário, endométrio, esôfago e de células germinativas gonadais, diagnosticados em idades precoces (Li *et al.*, 1988; Hartley *et al.*, 1989; Varley *et al.*, 1997a).

A SLF é uma síndrome com alta penetrância, na qual os afetados têm um risco de cerca de 50,0% de desenvolver algum tipo de câncer até os 40 anos de idade comparado a 1% na população em geral, e até os 60 anos de idade este risco chega a 90.0% (Birch *et al.*, 2001). A incidência da síndrome é maior em mulheres, provavelmente devido à alta frequência do câncer de mama (Borresen-Dale, 2003).

Em 1990, as síndromes SLF/LFL foram associadas a mutações germinativas no gene *TP53* (OMIM #191170) (Malkin *et al.*, 1990) que está localizado no cromossomo 17p13.1. O gene *TP53* apresenta 11 exons, distribuídos em 20kb de DNA genômico, produzindo uma proteína de 383 aminoácidos e, assim como *BRCA1/2*, o primeiro exon do gene é não-codificante (Hainaut, 1995) (Figura 4).

As mutações germinativas encontradas no supressor tumoral *TP53* levam ao desenvolvimento de câncer hereditário, representando um exemplo do primeiro evento do modelo de Knudson (1971). Mutações germinativas no gene *TP53* são encontradas em aproximadamente 71,0% das famílias com SLF clássica e em 8.0% e 22.0% das famílias com LFL, quando classificadas de acordo com os critérios de Eeles e Birch, respectivamente (Varley *et al.*, 1997b). Mais de 370 mutações germinativas já foram descritas nesse gene e encontram-se compiladas no banco de dados do IARC (International

Agency for Research on Cancer), podendo ser acessadas em <http://www-p53.iarc.fr/Germline.html>.

5.2.2.2.2 Aspectos moleculares e funcionais

O gene *TP53* está dividido em cinco domínios estruturais e funcionais principais: a) um domínio de transativação N-terminal (aminoácidos 1 a 62); b) um domínio regulatório, rico em prolinas (aminoácidos 63 a 97); c) um domínio central, de ligação seqüência-específica ao DNA (aminoácidos 102 a 292); d) um domínio de oligomerização, fundamental na configuração espacial da proteína p53 e responsável pela multimerização da proteína, que se unirá em tetrâmeros (aminoácidos 323 a 356); e) um domínio C-terminal envolvido na regulação da ligação ao DNA (aminoácidos 363 a 393) (Seemann *et al.*, 2004) (Figura 4).

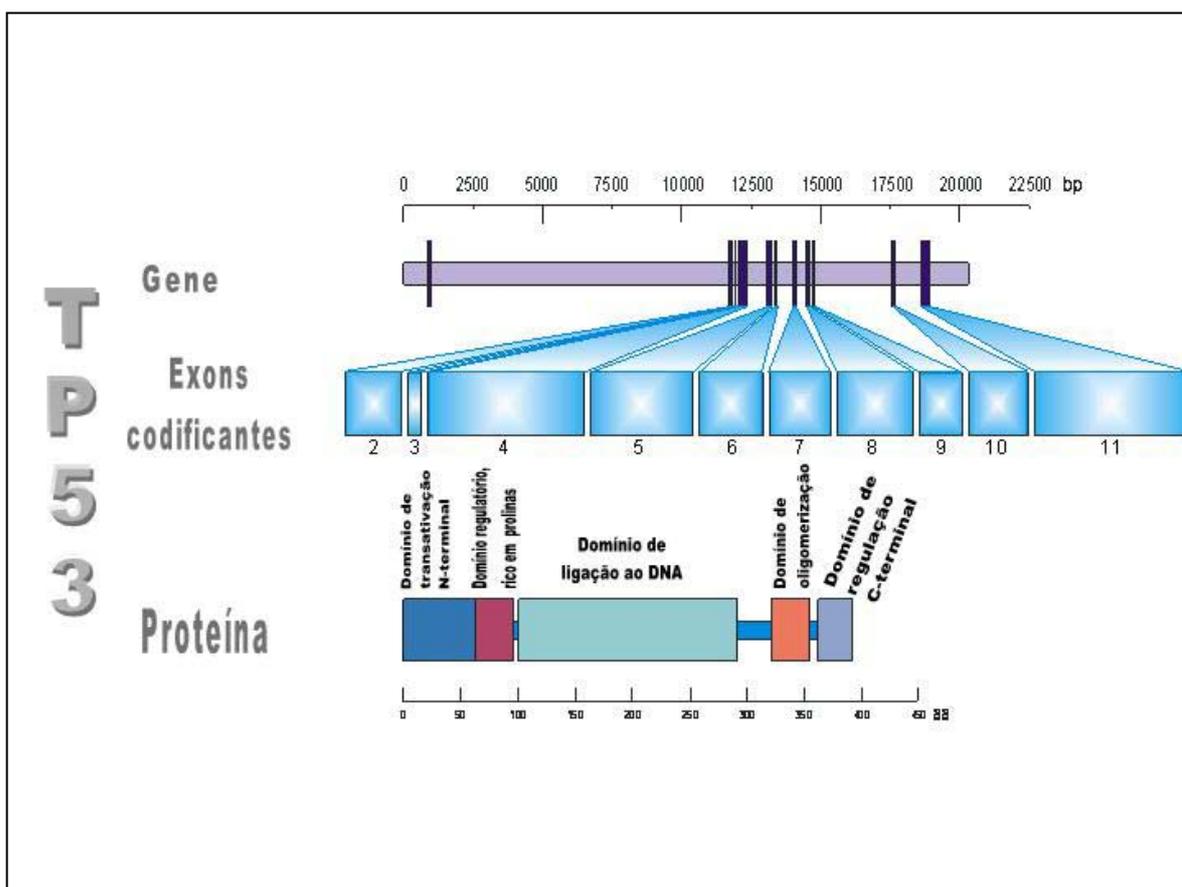


Figura 4. Representação esquemática do gene *TP53*, dos seus exons codificantes, proteína e domínios funcionais

Nota: A representação gráfica do gene *TP53* foi baseada no Gen Bank (Entry X 54156). As informações sobre os domínios funcionais de *TP53* foram retiradas Seeman *et al.*, 2004.

Do total de mutações até agora relatadas (mais de 18.000, sendo 97.0% somáticas e 3.0% germinativas), em torno de 75.0% são classificadas como mutações de ponto de sentido trocado, e estão localizadas no domínio de ligação ao DNA, sendo que 30.0% das mutações estão distribuídas em 5 “*hotspots*” principais (Seemann *et al.*, 2004). A presença de “*hotspots*” deve-se a duas razões principais: a) os codons que formam os “*hotspots*” apresentam grandes quantidades de dinucleotídeos CpG, onde as citosinas são freqüentemente metiladas, e sua deaminação espontânea leva a transições citosina → timina, e b) esses resíduos desempenham importantes funções na superfície de contato entre a proteína e o DNA-alvo; sendo assim, mutações nessa região levam à produção de uma proteína com afinidade reduzida pelo DNA, perdendo ou diminuindo assim sua capacidade de suprimir a proliferação celular. Dessa forma, esses “*hotspots*” são

resultantes da ação conjunta de mutagênese nessa região e de seleção, a qual confere às células deficientes em *TP53* uma vantagem proliferativa durante a proliferação tumoral (Szymanska & Hainaut, 2003).

O gene *TP53* é um dos mais comumente mutados em neoplasias, e estima-se que mutações somáticas nesse gene ocorram em mais de 50.0% dos tumores (Gasco *et al.*, 2003). Essa importância se deve às variadas funções que o gene desempenha na célula. Em circunstâncias normais, o gene *TP53* é constitutivamente ativado durante a transição das fases G1 para S no ciclo celular, participando assim no ponto de controle (“*timing*”) para entrada na fase S. Apesar de ser rapidamente degradada (em torno de 20 minutos após sua produção), a proteína p53 tem importância fundamental na manutenção da integridade celular. Em células expostas a agentes genotóxicos que ocasionam danos ao DNA, tais como quebras bifilamentares ou oxidação do DNA, ou ainda em situações de hipóxia, ocorre grande acúmulo da proteína p53 no núcleo da célula; a proteína é hiperexpressa e recrutada para prevenir, através de ativação ou repressão de uma cascata de genes, a proliferação de células cujo DNA esteja danificado. Assim, a perda de função de *TP53* predispõe as células a um rápido acúmulo de danos genéticos (Hainaut, 1995; Szymanska & Hainaut, 2003). O papel fundamental do gene *TP53* na regulação do ciclo celular, na apoptose e no reparo do DNA, consagrou-o com a denominação de “guardião do genoma” (Lane, 1992).

A proteína p53 foi originalmente identificada em tumores produzidos pelo vírus SV40 (Chang *et al.*, 1979; Kress *et al.*, 1979; Lane & Crawford, 1979; Linzer & Levine, 1979). De forma independente, a proteína p53 foi identificada pela sua expressão aumentada em tumores induzidos quimicamente (Deleo *et al.*, 1979). Durante os anos 80, diversos estudos demonstraram a importância de p53 como sendo essencial na regulação do ciclo celular (Mora *et al.*, 1980; Milner & Milner, 1981; Mercer *et al.*, 1982; Milner, 1984; Reich & Levine, 1984; Kaczmarek *et al.*, 1986; Shohat *et al.*, 1987; Reznikov *et al.*, 1989). Em 1984, observou-se que células expostas a radiação ultravioleta (UV) apresentavam acúmulo de p53 (Maltzman & Czyzyk, 1984). Além disso, demonstrou-se a perda de *TP53* ou a presença de mutações que inativam o gene em praticamente metade dos tipos tumorais analisados, oriundos de uma ampla gama de tecidos (Baker *et al.*, 1989; Nigro *et al.*, 1989; Baker *et al.*, 1990; Marshall, 1991; Caron de Fromentel & Soussi, 1992; Hollstein *et al.*, 1994). Verificou-se ainda que a proteína p53 mutada pode atuar de forma

competitiva com a proteína “normal”, inibindo sua função, ao que se chamou de efeito dominante negativo (esses mutantes possuem uma alteração de conformação, produzindo dessa forma tetrâmeros com formas alteradas) (Kraiss *et al.*, 1988; Clore *et al.*, 1994; 1995). Além disso, p53 apresenta, em muitos casos, um ganho de função que contribui para seu potencial tumorigênico (Dittmer *et al.*, 1993)

Diversos relatos recentes associam o gene *TP53* a uma variedade de processos celulares, incluindo controle do ciclo celular, reparo de danos no DNA, estabilidade genômica, apoptose, diferenciação celular, angiogênese e senescência. O desempenho dessas funções, bem como sua inibição, dependem da interação de p53 com outras oncoproteínas, principalmente mdm2, as quais se ligam ao domínio de transativação da proteína, ativando ou “seqüestrando” p53 e promovendo a sua degradação no citoplasma (May & May, 1999; Meek, 1999).

O fenótipo de predisposição a tumores foi caracterizado também em animais portadores de mutações germinativas de *TP53*. Camundongos transgênicos apresentando mutações deletérias em homozigose que inativam *TP53* desenvolvem-se normalmente, porém apresentam uma incidência aumentada de tumores, principalmente de tecido linfático (Harvey *et al.*, 1995).

Ainda em relação a mutações germinativas em *TP53*, diversos estudos relatam uma possível correlação entre genótipo e fenótipo. Horio *et al.* (1994) relataram a presença de uma mutação germinativa no códon 213 de uma das 148 pacientes analisadas no estudo e verificaram uma possível associação entre a presença dessa variante e risco aumentado de desenvolvimento de câncer de estômago. Em 2000, Lehman *et al.*, analisando 42 pacientes com história familiar de câncer de mama e negativos para mutações em *BRCA1/2*, verificaram em três dessas 42 famílias a presença de uma variação intrônica (13964GC), sugerindo ser essa uma alteração de baixa penetrância associada a SLF.

Em 2001, Ribeiro *et al.* identificaram uma mutação no exon 10 (domínio de oligomerização) do gene *TP53* (R337H) em 35 de 36 crianças brasileiras de Curitiba, Paraná com tumores adrenocorticais, porém sem história familiar sugestiva de SLF/LFL. Os achados levaram os pesquisadores a concluir que essa tratava-se de uma mutação tumor-específica, associada somente ao desenvolvimento de tumores adrenocorticais. Estudo posterior realizado por Latronico *et al.* (2001), identificou a mutação R337H em 77.7% de 18 crianças e 13.5% de 37 adultos brasileiros com carcinoma adrenocortical. A

mesma alteração foi encontrada em outros familiares dos casos-índice, os quais não apresentavam história pessoal de câncer, sugerindo ser essa uma mutação de baixa penetrância.

Estudo realizado por Achatz *et al.* (2007), em 45 famílias com critérios clínicos para SLF/LFL, detectou a presença de mutações germinativas em 13 das 45 famílias, sendo que em 6 dessas, a variação encontrada foi a mesma já relatada no estudo de Ribeiro *et al.* (2001), R337H. Porém, contradizendo os achados de Ribeiro *et al.*, a mutação R337H estava associada à presença de história familiar sugestiva de SLF/LFL e com a ocorrência de múltiplos tipos tumorais e não somente carcinoma adrenocortical.

5.2.2.2.3 Dados nacionais sobre SLF/LFL

A exemplo do mencionado em relação a *BRCAl/2*, também para *TP53* não existem muitos relatos na literatura referentes a dados nacionais. Dentre os existentes, a grande maioria refere-se à análise de mutações somáticas em *TP53* em indivíduos com história pessoal de câncer de mama (Simão *et al.*, 2002; Lacerda *et al.*, 2005; Damin *et al.*, 2006). Ao nosso conhecimento, o único relato, da frequência de mutações germinativas em famílias com critérios clínicos para SLF/LFL até o momento, refere-se ao estudo realizado por Achatz *et al.* (2007), cujos resultados já foram mencionados anteriormente.

5.2.2.2.4 Diagnóstico molecular

Quanto à análise molecular, o padrão áureo para a identificação de mutações germinativas em *TP53* é o seqüenciamento direto de todos os exons codificantes (2 a 11) e seqüências intrônicas flanqueadoras. Embora 95.0% das mutações possam ser detectadas pelo seqüenciamento direto dos éxons 4 a 9, é recomendável procurar alterações em todos os éxons codificantes (Bougeard *et al.*, 2003). Estudos realizados por Skilling *et al.* (1996) e Casey *et al.* (1996) relataram uma frequência de 15.0% e 18.0%, respectivamente, de alterações na região anterior ao exon 4 e posterior ao exon 9 do gene *TP53*.

5.2.2.3 Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Câncer Colo-retal (HBCC)

5.2.2.3.1 Histórico e Riscos Associados

A síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e câncer colo-retal foi descrita por Meijers-Heijboer *et al.* (2003), que relataram uma deleção de base única no gene *CHEK2* 1100delC - em diversas famílias com múltiplos casos desses dois tumores. Essas famílias não apresentavam mutações germinativas nos genes *APC*, *MLH1*, *MSH2* ou *MSH6*, sugerindo então a existência de uma síndrome independente de predisposição que leva ao desenvolvimento de tumores mamários e colo-retais (HBCC – *Hereditary Breast and Colon Cancer*). De um total de 188 famílias com história de câncer de mama analisadas por Meijers-Heijboer *et al.*, 30 preenchiam os critérios clínicos propostos pelos pesquisadores, de inclusão na síndrome e 4 dessas 30 famílias (13.3%) apresentavam a mutação *CHEK2* 1100delC na linhagem germinativa. Em um segundo grupo amostral estudado, Meijers-Heijboer *et al.* analisaram 247 famílias com câncer de mama, sendo que 25 preenchiam os critérios clínicos para HBCC. Dessas 25, 6 (24.0%) portavam a mutação *CHEK2* 1100delC, comparado com 7 de 222 (3.2%) famílias com câncer de mama mas sem critérios clínicos para HBCC, confirmando dessa forma uma forte associação entre a presença da mutação *CHEK2* 1100delC e história familiar de câncer de mama e câncer colo-retal.

A variante *CHEK2* 1100delC é caracterizada pela deleção de uma citosina na posição 1100 (exon 10), resultando na introdução de um códon de parada após o aminoácido 380 e conseqüente perda da atividade quinase da proteína, sendo então um candidato plausível para predisposição ao câncer (Weischer *et al.*, 2007). Essa variante foi inicialmente relatada por Bell *et al.* (1999), que detectaram a presença de mutações germinativas no gene *CHEK2* em famílias com o fenótipo SLF e LFL e sem mutações germinativas no gene *TP53*. Vahteristo *et al.* (2001) também verificaram a ocorrência de mutações germinativas no gene *CHEK2* em duas de 44 famílias finlandesas com SLF e LFL que não apresentavam mutações germinativas no gene *TP53*. Siddiqui *et al.* (2005) avaliaram a incidência de mutações germinativas no gene *TP53* e da alteração *CHEK2*

1100delC em 23 famílias com fenótipo SLF e LFL. Mutações germinativas no gene *TP53* e a alteração *CHEK2* 1100delC foram detectadas em sete e uma família, respectivamente.

Em estudo realizado por Schmidt *et al.* (2007), 1479 mulheres com diagnóstico de câncer de mama em idade inferior aos 50 anos e que haviam recebido seguimento clínico por um período mínimo de 10 anos, foram analisadas quanto à presença da variante *CHEK2* 1100delC. A frequência com que a mutação foi detectada situou-se em 3.7%. Além disso, observou-se, nas mulheres com a mutação, um aumento de duas vezes no risco de desenvolvimento de um segundo câncer de mama primário.

Para avaliar o efeito de *CHEK2* 1100delC no risco de câncer colo-retal (CCR), de Jong *et al.* (2005) avaliaram 629 casos (105 diagnosticados com CCR antes dos 50 anos de idade) e 230 controles não-afetados. Os pacientes com CCR não apresentaram frequência aumentada de *CHEK2* 1100delC em relação aos controles. No entanto, os autores verificaram uma tendência de aumento na frequência de *CHEK2* 1100delC em indivíduos com risco genético de CCR moderado a alto (história familiar positiva ou idade precoce ao diagnóstico).

Com o intuito de investigar o espectro tumoral associado à mutação *CHEK2* 1100delC, Cybulski *et al.* (2004) genotiparam 4008 indivíduos poloneses com diagnóstico prévio de câncer (conforme os autores, os casos apresentavam pelo menos um dos 7 tipos de câncer mais prevalentes na Polônia) e 4000 controles não-afetados e encontraram um aumento na associação entre a presença da mutação e maior risco para câncer de tireóide, mama e próstata.

Vahteristo *et al.* (2002) analisaram 507 indivíduos com história familiar positiva de câncer de mama e sem mutações em *BRCA1/2*. Desses, 28 (5.5%) portavam o alelo 1100delC (risco relativo de 4.18). A observação de portadores não-afetados, bem como uma forte associação entre a presença desse polimorfismo e história familiar moderada de câncer, sugeriu novamente que *CHEK2* 1100delC seja um alelo de baixa penetrância que confere predisposição moderada ao câncer de mama. Quando portadores de mutações em *BRCA1/2* foram analisados quanto à presença dessa alteração, não houve diferenças em relação aos controles.

A ocorrência da alteração *CHEK2* 1100delC apenas em famílias negativas para mutações em *BRCA1/2* provavelmente reflete as interações funcionais existentes entre esses genes. *CHEK2* é regulado por *ATM* (assim como *BRCA1*) e ele próprio fosforila e

regula a atividade de *BRCA1*. Assim, acredita-se que ambos genes são integrantes da mesma rota biológica e, se essa rota está de alguma forma alterada por algum evento que inativou *BRCA1*, a supressão da atividade de *CHEK2* não causaria risco adicional de desenvolvimento de câncer. A baixa frequência de *CHEK2* 1100delC em famílias com mutações em *BRCA2* sugere que uma interação funcional similar deva existir entre *BRCA2* e *CHEK2* (The CHEK2 Breast Cancer Consortium, 2002).

Estudo realizado por Osório *et al.* (2004) contraria os achados de pesquisadores que afirmam haver uma associação entre *CHEK2* 1100delC e risco aumentado para câncer de mama. Os pesquisadores analisaram 400 mulheres espanholas com história pessoal e familiar prévia de câncer de mama, além de 56 pacientes com câncer de mama esporádico e 400 indivíduos controles (sem história pessoal de câncer), e não encontraram associação entre história familiar de câncer e presença da variação *CHEK2* 1100delC. O mesmo achado foi relatado por Huang *et al.* (2004) após analisar um grupo de 161 mulheres norte-americanas com múltiplos tumores primários incluindo câncer de mama.

Os resultados conflitantes quanto à associação de *CHEK2* 1100delC com risco aumentado para câncer de mama e para câncer colo-retal dos diferentes estudos devem-se, provavelmente, à diferenças étnicas entre populações analisadas nos diferentes estudos. Outra possível explicação reside na forma de seleção da amostra. Em estudos onde a amostra foi selecionada a partir de famílias de alto risco para câncer, poderia haver um outro gene de predisposição segregando juntamente com *CHEK2* 1100delC, e esse outro alelo poderia ser raro (ou população-específico) o suficiente para resultar em aumento do risco para câncer somente em determinados grupos amostrais (Neuhausen *et al.*, 2004; Weischer *et al.*, 2007). Além disso, conforme Cybulski *et al.* (2004), *CHEK2* vem sendo classificado numa categoria de genes que confere um risco moderado de câncer, observando-se que mutações nesses genes são de frequência intermediária e com penetrância moderada. Assim, torna-se difícil estudar esse gene, sem recrutar grupos amostrais muito grandes para identificar algum resultado significativo; soma-se à essa dificuldade a heterogeneidade de prevalência da mutação e possibilidade de variabilidade na expressão e/ou penetrância em diferentes populações.

Atualmente, acredita-se que mutações no gene *CHEK2* estejam associadas ao fenótipo de predisposição hereditária ao câncer de mama, sugerindo que esse gene possa

exercer ação supressora de tumor (Ingvarsson *et al.*, 2002; Sodha *et al.*, 2002; Vahteristo *et al.*, 2002; Varley, 2003b).

5.2.2.3.2 Aspectos moleculares e funcionais

O gene *CHEK2* ou *CHK2* (Cell-cycle checkpoint kinase-2) (OMIM #604373) é considerado um gene supressor tumoral e está localizado no cromossomo 22q12.1, codificando uma proteína quinase envolvida no controle dos pontos de checagem do ciclo celular. A proteína *chk2* é ortóloga à *cds1* de *Schizosaccharomyces pombe* e à *rad53* de *Saccharomyces cerevisiae*. e é ativada através de fosforilação por *ATM* em resposta à danos no DNA. Uma vez ativada, ela atua no controle do ciclo celular e no reparo de danos no DNA através de sua habilidade de fosforilar proteínas importantes, como *p53*, *cdc25C*, *cdc25A* e *brca1*, que promovem a parada do ciclo celular e a ativação dos mecanismos de reparo (Schutte *et al.*, 2003; Bernstein *et al.*, 2006).

Camundongos mutantes para a variante *CHEK2* 1100delC foram criados e a análise de seus fibroblastos revelou um perfil anômalo na progressão do ciclo celular, com uma proporção maior de células nas fases S e G2, se comparados aos camundongos “selvagens” (não-transgênicos). As células mutantes apresentam ainda sinais de instabilidade cromossômica, o que pôde ser verificado através da poliploidia e do aumento no número de quebras na molécula de DNA das células analisadas (Bahassi *et al.*, 2007).

5.2.2.3.3 Dados nacionais sobre a síndrome

Não existem, ao nosso conhecimento, dados sobre a frequência de HBCC, e da mutação comum em *CHEK2*, 1100delC, na população brasileira.

5.2.2.3.4 Diagnóstico molecular

Em relação à análise molecular, as principais metodologias que vêm sendo empregadas na investigação dessa mutação são PCR longo e, em muitos casos DHPLC, ambos seguidos de seqüenciamento direto (Bernstein *et al.*, 2006; Weischer *et al.*, 2007). Um detalhe importante a ser considerado na análise desse gene é a localização dos

oligonucleotídeos utilizados para a sua amplificação, já que o gene *CHEK2* está presente em múltiplas cópias no genoma humano (pseudogenes) (Vahteristo *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2006). Os oligonucleotídeos de amplificação devem, portanto, estar localizados em regiões específicas do gene, evitando seqüências que apresentem alguma similaridade com as encontradas nos pseudogenes.

5.2.3 Outras Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama

5.2.3.1 Síndrome de Cowden

A Síndrome de Cowden (OMIM #158350) caracteriza-se por um excesso de tumores mamários, gastrointestinais e endometriais, além de neoplasias benignas ou malignas de tireóide (Tsou *et al.*, 1997) e por diversas alterações na pele, tais como triquilemonas, fibromas, papilomas e queratoses. O RCV para câncer de mama nessa síndrome é de 25.0% a 50.0%, sendo que mais de 90.0% dos afetados apresentam alguma manifestação da doença em torno dos 20 anos de idade, e cerca de 99.0% apresentam alguma manifestação até a terceira década de vida (Nelen *et al.*, 1996; Eng *et al.*, 2000). Na Síndrome de Cowden, como em outras síndromes de predisposição hereditária ao câncer, o câncer de mama caracteriza-se pelo diagnóstico em idade precoce e pela bilateralidade (Olopade & Weber, 1998).

A Síndrome de Cowden é causada por mutações germinativas no gene *PTEN*, que está localizado no cromossomo 10q23.3 e codifica uma tirosina fosfatase. Estudos revelando perda de heterozigosidade definiram que *PTEN* é um gene supressor tumoral, cuja atividade está relacionada à manutenção do controle de proliferação do ciclo celular (Lynch *et al.*, 1997). Em torno de 85.0% dos indivíduos com diagnóstico clínico apresentam mutações germinativas em *PTEN*, sugerindo heterogeneidade genética (Marsh *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2003).

5.2.3.2 Ataxia Telangiectasia

A Ataxia Telangiectasia (AT) (OMIM #208900) é uma doença autossômica recessiva caracterizada por ataxia de início na infância, deterioração neurológica

progressiva, telangiectasias, imunodeficiência e extrema sensibilidade à radiação ionizante, com conseqüente aumento no risco de tumores, principalmente leucemias e linfomas, os quais respondem por 85.0% dos tumores diagnosticados em indivíduos afetados. Há risco aumentado para câncer gástrico, de mama, ovário, melanoma, leiomioma e sarcoma (<http://www.genetests.org>).

Em 1988, o gene *ATM* foi mapeado no cromossomo 11q22-23, porém ele somente foi clonado sete anos depois. A diversidade de sintomas associada à síndrome AT deve-se à diversidade funcional desempenhada pelo gene, o qual induz diversas vias de resposta celular a danos ao DNA; assim, quando essas vias estão defeituosas, a célula não responde de forma correta e o dano é propagado (Uhrhammer *et al.*, 1998).

Acredita-se que a frequência de heterozigotos para mutações em *ATM* na população geral seja de 1.0% (Savitsky *et al.*, 1995). Mesmo sendo uma síndrome autossômica recessiva, indivíduos heterozigotos apresentam risco aumentado para câncer de mama. O risco de desenvolver câncer de mama é quatro vezes maior em heterozigotos que homozigotos normais (Athma *et al.*, 1996; Stankovic *et al.*, 1998; Bernstein *et al.*, 2003; Bretsky *et al.*, 2003; Thorstenson *et al.*, 2003).

5.2.3.3 Síndrome de Peutz-Jeghers

A Síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ) (OMIM #175200) apresenta padrão de herança autossômico dominante, caracteriza-se pela associação de pólipos gastrointestinais e pigmentação muco-cutânea, sendo causada primariamente por mutações germinativas no gene *STK11* (ou *LKB1*). Indivíduos portadores da SPJ apresentam risco elevado de desenvolver vários tipos de câncer: colo-retal, pancreático, ovariano e de mama. Homens apresentam risco aumentado para tumores nas células de Sertoli. A idade ao aparecimento dos primeiros sintomas é extremamente variável. Um estudo envolvendo 419 pacientes estimou em 85.0% o RCV para tumores do trato gastrointestinal até os 70 anos de idade e em 31.0% o RCV para câncer de mama (Hearle *et al.*, 2006a). Lim *et al.* (2004), analisando 240 indivíduos com mutação germinativa em *STK11*, verificaram que o risco de desenvolver algum tipo de câncer até os 20, 40, 60 ou 70 anos de idade era de 1.0%, 19.0%, 63.0% e 81.0% respectivamente.

O gene *STK11* está localizado no cromossomo 19p13.3 e é considerado um gene supressor tumoral (Gruber *et al.*, 1998) que codifica para uma proteína quinase envolvida em interações proteína-proteína e ligação à membrana além de estar envolvida no processo de apoptose (Collins *et al.*, 2000; Karuman *et al.*, 2001). Das mutações já detectadas, aproximadamente 65.0% afetam a estrutura da proteína, tornando-a não-funcional. Além de alterações pontuais, deleções e duplicações também são relatadas. Aretz *et al.* (2005), utilizando uma combinação de técnicas de detecção de alterações pontuais (seqüenciamento direto da região codificante) e de rearranjos (MLPA), detectaram mutações germinativas em 94.0% dos pacientes com o diagnóstico clínico.

5.2.3.4 Síndrome de Saethre-Chotzen

A Síndrome de Saethre-Chotzen é uma doença autossômica dominante caracterizada por craniossinostose, assimetria facial, braquicefalia, sindactilia parcial e blefaroptose (Bartsocas *et al.*, 1970; Kreiborg *et al.*, 1972; Pantke *et al.*, 1975; Friedman *et al.*, 1977). É considerada uma das síndromes de craniossinostoses mais comuns, ocorrendo em um a cada 25000-50000 nascidos vivos. O diagnóstico é geralmente clínico, e, em alguns casos, se observa uma translocação cromossômica envolvendo o braço curto do cromossomo 7. Mutações germinativas no gene *TWIST1* são identificadas em 46.0% a 80.0% dos indivíduos afetados (Johnson *et al.*, 1998; Paznekas *et al.*, 1998).

O gene *TWIST1*, localizado no cromossomo 7p21, codifica a proteína twist1, que pertence a uma família de reguladores transcricionais com motivo característico “hélice-alça-hélice”, e atua na ligação ao DNA (El Ghouzzi *et al.*, 1997; Howard *et al.*, 1997; Rose *et al.*, 1997).

Sahlin *et al.* (2007), analisando 15 famílias portadoras da Síndrome, verificaram que 50.0% das mulheres afetadas com idade superior a 25 anos haviam desenvolvido câncer de mama. A associação de mutações em *TWIST1* e câncer de mama também é sugerida por Mironchik *et al.* (2005), que destacam uma associação entre expressão aumentada de *TWIST1* e carcinomas mamários com alto grau de invasão e instabilidade cromossômica.

5.3 Diagnóstico Diferencial

A maioria das síndromes de predisposição hereditária ao câncer de mama apresenta uma ampla gama de critérios clínicos de inclusão. Assim, famílias que apresentarem, por exemplo, casos de câncer de mama em idade precoce (geralmente pré-menopáusicos), câncer de mama bilateral, associação de casos de câncer de mama e de ovário, casos de câncer de mama e colo-retal poderão preencher critérios de inclusão preconizados para o diagnóstico clínico de mais de uma síndrome. A alta incidência de câncer de mama em idades jovens é um evento característico na Síndrome de Li-Fraumeni, porém também frequentemente encontrado em HBOC e em muitos casos de HBCC, ou ainda na Síndrome de Cowden. Além do câncer de mama, outros tumores, tais como câncer colo-retal, leucemias, câncer de próstata, câncer de pâncreas, ocorrem com maior frequência em várias síndromes; portanto, há uma sobreposição importante de fenótipos.

Frente ao fato de existirem diversas síndromes genéticas ligadas ao câncer com quadros clínicos que podem se sobrepor, torna-se fundamental a realização de uma investigação detalhada das famílias acometidas. A obtenção da história familiar de forma adequada, aprofundando-se quanto a detalhes referentes à localização exata dos tumores, às idades ao diagnóstico, bem como dados histopatológicos dos tumores relatados são de fundamental importância. Além disso, a obtenção de dados referentes à história familiar de, no mínimo, três gerações deve ser sempre realizada, possibilitando a realização do diagnóstico diferencial das diversas síndromes de predisposição hereditária ao câncer de mama (Achatz MIW).

5.4 ACONSELHAMENTO GENÉTICO NO CÂNCER DE MAMA HEREDITÁRIO

5.4.1 Definição de aconselhamento genético

O Aconselhamento Genético (AG) é um processo de comunicação que trata dos problemas associados à ocorrência ou à possibilidade de ocorrência de um distúrbio genético em uma família. Centrais à filosofia e prática do AG encontram-se as seguintes premissas: utilização voluntária dos serviços, tomada de decisão informada, aconselhamento não-diretivo e não-coercitivo, proteção à privacidade e confidencialidade

da informação genética e atenção aos aspectos psicossociais e afetivos relacionados ao impacto e manejo da informação genética (ASHG, 1975; Kessler, 1979).

5.4.2 Aconselhamento Genético no Câncer de Mama Hereditário

O processo de AG do câncer hereditário inicia com a identificação do indivíduo em risco e com as estimativas do risco desse indivíduo ter câncer. Confirmada a suspeita de uma Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer, o AG tem o objetivo de transmitir o máximo de informações possíveis a respeito do diagnóstico, prognóstico e opções de manejo para indivíduos em risco (Vargas, 2000). Sendo assim, as informações transmitidas durante o AG devem permitir ao indivíduo compreender o diagnóstico e risco pessoal de desenvolver câncer; compreender o modo de herança das Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer e seu risco de recorrência; compreender as opções disponíveis de manejo e controle do risco de ocorrência; facilitar a decisão sobre opções de manejo mais apropriadas para seu caso individual e aceitar melhor o diagnóstico e o risco de recorrência individual e/ou familiar (ASHG, 1975; Nussbaum *et al.*, 2002).

5.4.3 Quando encaminhar uma família para aconselhamento genético e avaliação do risco para câncer de mama hereditário ?

Em torno de 10.0% dos casos de câncer em tratamento hoje têm origem hereditária. Famílias que apresentam múltiplos casos de câncer, tumores bilaterais ou tumores diagnosticados em idades muito precoces em relação à média da idade ao diagnóstico na população geral devem ser avaliadas com mais cuidado. A possibilidade de identificar familiares de elevado risco para o desenvolvimento de câncer torna possível o emprego de uma abordagem preventiva e de detecção precoce do câncer. Os indivíduos considerados de alto risco devem ser encaminhados para o aconselhamento genético, onde a hipótese diagnóstica pode ser confirmada, informações sobre a doença, sua forma de herança, estratégias de redução de risco e as chances de recorrência para outros familiares podem ser transmitidas e discutidas (Rocha *et al.*, 2001; Achatz MIW).

5.4.4 Etapas do AG para Câncer de Mama Hereditário

O processo de AG para câncer de mama hereditário envolve, normalmente, quatro etapas:

a) **AG pré-teste**: geralmente realizado no decorrer de duas a três consultas. Envolve o levantamento dos dados familiares (heredograma), realização de estimativas de risco e de cálculos de probabilidade de mutação (quando aplicável), orientação geral pré-teste abordando aspectos relacionados às opções de teste disponíveis de acordo com a história familiar, possíveis resultados do teste genético, dados referentes às síndromes, à transmissibilidade da mutação na família, possíveis riscos envolvidos na testagem, tais como risco de estresse psicológico e de discriminação, confidencialidade da informação, opção da não-realização do teste genético e opções de prevenção. Cabe ainda destacar que o AG pré-teste deverá ser individualizado e não-direcionado, de modo que o geneticista não interfira diretamente nas decisões do paciente. O paciente deve estar ciente de que o teste genético e a identidade do indivíduo são confidenciais, impedindo assim quaisquer dificuldades relacionadas à discriminação e proporcionando uma relação de confiança entre o paciente e o médico geneticista.

O que se preconiza é que, na etapa pré-teste genético, o paciente deve ser confrontado com os benefícios, possíveis riscos e limitações da investigação, para que possa tomar uma decisão autônoma e adequada à suas necessidades individuais (Bruner *et al.*, 2006). Este é um dos principais objetivos do aconselhamento genético pré-teste e da exigência de realização de consentimento informado antes da investigação molecular, que deve seguir as recomendações da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) para Investigação Genética (2003);

b) Uma consulta para **coleta do material biológico**, oportunidade adicional para esclarecer dúvidas do processo de AG, teste genético e para discutir antecipadamente os possíveis desfechos (resultados) da investigação;

c) **AG pós-teste**: nesse momento, o paciente deve receber AG em que se transmite o resultado e seu significado, além de conseqüências, plano de investigação para demais familiares em risco e informações sobre estratégias de prevenção e manejo frente ao risco

de desenvolver câncer, de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Genética Humana (ASHG, 1994). É um momento de proporcionar ao paciente e a seus familiares orientação e suporte não apenas para decisões reprodutivas e/ou estratégias de prevenção adotadas, mas também para os problemas decorrentes do impacto psicossocial da informação genética (Vargas, 2000).

d) Uma ou mais consultas de **seguimento posterior**, para avaliação das estratégias assumidas e seguimento de outros desdobramentos derivados do estudo do indivíduo/família (Vargas, 2000). Muitas famílias mantêm acompanhamento com a equipe de AG por muitos anos; esse acompanhamento a longo prazo é particularmente importante para manter a vigilância sobre a ocorrência de novos casos na família, reforço das orientações preventivas e acompanhamento da aderência às recomendações.

5.4.5 Diagnóstico clínico de uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama

5.4.5.1 Heredograma

Diante de um paciente com suspeita de câncer de mama hereditário, o primeiro passo é se obter a história familiar, envolvendo pelo menos três gerações (a história deve ser detalhada e incluir informações sobre todos os familiares, afetados com câncer ou não, grau de parentesco para com o caso-índice, tipo de tumor e idade ao diagnóstico). Com os dados obtidos se constrói um heredograma, cuja análise poderá ser elucidativa de um padrão hereditário típico de um gene supressor de tumor, geralmente um padrão de herança autossômico dominante, com penetrância variável (del Giglio *et al.*, 2000).

Para a construção do heredograma é importante que, na medida do possível, haja confirmação através de laudos anátomo-patológicos e/ou atestados de óbito de todos os diagnósticos de neoplasia na família.

5.4.5.2 Critérios para uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer.

Diante de um heredograma incluindo várias gerações e todos os casos de câncer da família, bem como as respectivas idades ao diagnóstico, parte-se para uma análise criteriosa do mesmo com o intuito de verificar se preenche os critérios clínicos de inclusão preconizados por alguma das Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer (os critérios de inclusão utilizados no presente estudo, para as diferentes síndromes analisadas, encontram-se no anexo 12.1.4).

Além da análise do heredograma, características moleculares e morfológicas do tumor podem auxiliar na identificação de pacientes com maior probabilidade de ter uma mutação em algum gene de predisposição. Por exemplo, no caso dos genes *BRCA1/2*, alguns destes tumores têm, com maior frequência, negatividade para receptores de estrogênio, progesterona e HER-2, e maior positividade para p53 quando comparados a tumores de pacientes não-portadores de mutações germinativas em *BRCA1/2* (Lakhani *et al.*, 2002).

5.4.5.3 Modelos de probabilidade de mutação: para a síndrome HBOC.

No caso de *BRCA1* ou *BRCA2*, vários modelos para estimativa da probabilidade de mutação encontram-se disponíveis na literatura e auxiliam na indicação do teste molecular para confirmação da suspeita clínica, como, por exemplo, os modelos de Shattuck-Eidens (Shattuck-Eidens *et al.*, 1997), Couch e Couch modificado (Domchek *et al.*, 2003; 2004), Frank (Frank *et al.*, 2002), BRCAPRO (Berry *et al.*, 2002) e Tyrer-Cuzick (Tyrer *et al.*, 2004), tendo cada um deles suas vantagens e limitações determinadas pelo método, tamanho e tipo da população utilizada para criar o modelo (Nelson *et al.*, 2005).

5.4.5.4 Estimativa do risco de desenvolver câncer de mama ao longo da vida para mulheres assintomáticas com ou sem história familiar.

O risco cumulativo de desenvolver câncer de mama (para pacientes assintomáticos) pode ser estimado a partir de dados derivados de diferentes estudos epidemiológicos, entre os quais destacam-se os estudos CASH (*Cancer and Steroid*

Hormone Study), que originou os dados tabulares de Claus (Claus *et al.*, 1994), e o *Breast Cancer Detection and Demonstration Project*, que possibilitou a construção do modelo de Gail (Gail *et al.*, 1989), além do modelo proposto por Tyrer-Cuzick (Tyrer *et al.*, 2004).

O modelo de Gail é o mais aplicado, contudo ele negligencia história familiar de parentes em segundo grau, trata cânceres pré- e pós-menopáusicos da mesma forma e ignora história pessoal de neoplasia lobular. O modelo de Claus é o que melhor considera a história familiar, porém desconsidera histórias de câncer de mama bilateral, mama masculino ou câncer de ovário e negligencia todas as informações não-familiares, as quais são consideradas pelo modelo de Gail (Euhus, 2001). O modelo de Tyrer-Cuzick, além de estimar probabilidade de mutação em *BRCA1/2*, também pode ser utilizado para estimar risco vital de câncer através da análise da história familiar, assim como fatores de risco hormonais e reprodutivos. Esses modelos são ferramentas de grande utilidade no AG do câncer, já que permitem, na maioria dos casos, uma estimativa mais objetiva do risco e podem ajudar a direcionar decisões sobre diferentes intervenções preventivas, especialmente naqueles pacientes que não se submetem a investigação molecular para confirmação do diagnóstico (Hall & Olopade, 2006; Fasching *et al.*, 2007).

No entanto, esses diferentes modelos apresentam limitações diferenciadas, decorrentes do delineamento do estudo e do tipo de população utilizada. Uma estratégia seria a utilização dos diferentes modelos para pacientes consideradas de risco baixo-moderado. Para aquelas com critérios clínicos para alguma síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama, levaria-se em consideração a probabilidade de mutação e os dados existentes de RCV para os diferentes tipos de câncer (devido às limitações dos diferentes modelos e ao fato de os mesmos não serem totalmente aplicáveis à famílias de alto risco) (Amir *et al.*, 2003).

5.4.6 Escolha do teste genético

5.4.6.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

O TCLE foi desenvolvido para manter o princípio de escolha autônoma do indivíduo e pela necessidade de tornar explícito o acordo entre pesquisador/médico e sujeito da pesquisa/paciente (Carter, 1995). A obtenção do TCLE faz parte do processo de

AG pré-teste e é imprescindível para a realização de testes de predisposição genética ao câncer, não somente no âmbito da pesquisa (National Advisory Council for Human Genome Research, 1994; Offit, 1998).

A necessidade do TCLE baseia-se nas seguintes premissas: a investigação molecular ainda tem caráter experimental em alguns casos; as opções de intervenção no caso de resultados positivos nem sempre estão bem estabelecidas; e a discussão dos elementos do consentimento deve ocorrer antes do teste, permitindo uma decisão autônoma quanto à realização do teste genético de predisposição (Geller *et al.*, 1997; Reilly *et al.*, 1997). Dentre os elementos básicos que devem estar contidos em um TCLE destacam-se: elementos relacionados à autonomia (incluem informações sobre o teste, significados dos possíveis resultados, opções de estimativas de risco sem a realização do teste, risco de transmitir a alteração genética aos filhos, opção pela não-realização do teste); elementos relacionados à beneficiência (opções e limitações de estratégias de rastreamento e manejo posteriores ao teste); elementos relacionados à não-maleficiência (acurácia do teste, riscos de estresse psicológico, riscos de discriminação por parte de empregadores e seguros-saúde); elementos relacionados à origem parental (conduta quando da identificação de não-paternidade ou não-maternidade durante a realização do teste genético, bem como condutas de notificação de outros familiares em risco); elementos relacionados à responsabilidade de privacidade e profissionalismo (aspectos de confidencialidade, custos do teste e seguimento a longo prazo); e, caso necessário, um item referente a considerações especiais (onde poderão ser abordados aspectos sobre estocagem do material genético, apropriação do material biológico, anonimato para participação em estudos posteriores relacionados, dentre outros aspectos considerados relevantes) (Offit, 1998).

5.4.6.2 As limitações no diagnóstico laboratorial

Há várias limitações para o uso preditivo dos testes moleculares, como segue:

- Existem mutações que não são detectáveis pelos métodos em uso;
- Existem mutações cujo impacto funcional no gene alterado é desconhecido;
- Um resultado negativo só será informativo se uma dada mutação já tiver sido identificada na família;

- Um resultado positivo indica predisposição e não certeza para o desenvolvimento de um tumor.
- Os alelos mutantes geralmente apresentam penetrância incompleta, isto é, nem todos os portadores de um certo alelo apresentam determinado fenótipo. No caso das síndromes de predisposição hereditária ao câncer, a penetrância em geral se correlaciona com a idade do indivíduo em questão, sendo que o fenótipo se expressa com frequência crescente ao longo da vida. A penetrância de um dado gene pode ser alterada pela exposição a carcinógenos ambientais, fatores hormonais, reprodutivos e ação de genes modificadores;
- Podem existir genes relacionados à doença que ainda não foram identificados; o que se evidencia pelo número considerável de famílias com múltiplos critérios clínicos para uma síndrome de predisposição nas quais não são encontradas mutações germinativas em genes reconhecidamente causadores do fenótipo.

Outra questão importante refere-se à complexidade da realização do exame. No caso de HBOC, os genes *BRCA1/2* são muito grandes, e centenas de mutações diferentes foram descritas podendo causar anormalidades nas proteínas codificadas, envolvidas no reparo de danos ocasionados ao DNA. É um procedimento complexo e caro, dependente da análise de toda a seqüência codificante desses genes. Geralmente é considerada factível se for realizada em famílias de risco moderado a alto, isto porque, depois de detectada a mutação, pode-se testar outros familiares em risco somente para a mutação detectada no indivíduo testado originalmente, levando a uma diminuição da complexidade e do custo desses exames para o restante da família.

5.4.6.3 A questão da sobreposição de fenótipos: quando é necessário testar para mais de uma síndrome.

Como existem diversas síndromes genéticas ligadas ao câncer com quadros clínicos que podem se sobrepor, torna-se fundamental a realização de uma investigação detalhada das famílias acometidas. Após investigação clínica detalhada e diante de um quadro clínico e de história familiar de câncer que preencha critérios de inclusão em mais de uma síndrome, os pacientes devem ser esclarecidos sobre a possibilidade de realização do diagnóstico molecular das diferentes síndromes de predisposição hereditária. A realização do teste para mais de uma síndrome vai depender de diversos fatores; dentre eles, da

história familiar, da disponibilidade laboratorial para a realização do teste para as diversas síndromes, do custo das diferentes análises e da voluntariedade do paciente.

5.4.6.4 Possíveis resultados do teste genético

O teste genético deve ser oferecido como confirmação do diagnóstico clínico, porém o paciente deve estar bem informado a respeito de suas limitações, bem como dos seus possíveis resultados. Caso haja a detecção da mutação, esta poderá ser rastreada em seus familiares, possibilitando a identificação de portadores assintomáticos. No entanto, caso a mutação não seja detectada pelos métodos utilizados, o paciente deve estar ciente de que outros fatores não identificados podem ocasionar a síndrome e que, mesmo sem o diagnóstico molecular, a família deverá continuar o rastreamento clínico (Hemminki & Eng, 2004; Achatz MIW). Em relação à SLF/LFL, uma vez iniciado o acompanhamento aos pacientes, estes devem ser bem informados quanto à dificuldade do rastreamento para alguns tumores. Deve ser ressaltada a importância do acompanhamento clínico freqüente e especializado.

No caso de HBOC, além da possibilidade de um resultado positivo ou negativo para o teste genético, há um terceiro resultado possível, que é a detecção de uma variante de significado incerto. Estas variantes têm significado indefinido devido à inexistência de estudos aprofundados e conclusivos acerca de seu impacto na função da proteína, ou seja, na sua presença, não se pode concluir se é uma mutação deletéria ou se é uma variante de seqüência sem significado clínico. Em torno de 50.0% das alterações, depositadas até o presente momento no banco de dados BIC, são consideradas variantes de significado desconhecido. Porém, dados mais completos acerca destas variantes são mantidos pelo laboratório *Myriad Genetic Laboratories Inc.* (Salt Lake City, E.U.A.). Este laboratório detém a patente para a pesquisa de mutações germinativas nos genes *BRCA1/2* a nível assistencial para a América do Norte e Europa e tem realizado inúmeros estudos de segregação destas variantes. Atualmente, cerca de 10.0% das alterações de seqüência detectadas pelo laboratório são ainda variantes de significado incerto.

Diante de um resultado como esse, a primeira estratégia a ser utilizada deve ser a testagem do maior número possível de indivíduos da família em questão, para determinar se a variante co-segrega com o câncer na família e, dessa forma, tentar classificar a

alteração como uma mutação deletéria, um polimorfismo ou uma variante sem significado clínico (<http://www.genetests.org>).

6. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

6. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Justificativa:

No Brasil, o câncer de mama é um problema significativo de saúde pública, devido à sua morbidade, e altas taxas de incidência e mortalidade. No Rio Grande do Sul, mais especificamente, as taxas de incidência e mortalidade encontram-se entre as maiores do país. Embora exposição a fatores de risco ambientais e/ou predisposição genética possam explicar essa diferença em relação a outras regiões brasileiras, não existem estudos que investiguem esse dado a nível populacional. O trabalho aqui desenvolvido foi conduzido de forma a representar uma primeira abordagem em relação à investigação, a nível populacional, do papel desempenhado pelos fatores de risco genéticos no desenvolvimento do câncer de mama, objetivando examinar qual a sua contribuição para os dados epidemiológicos observados.

Objetivos:

1. Caracterizar clinicamente uma amostra populacional em diferentes faixas de risco para câncer de mama e quanto à características pessoais e familiares (tais como dados demográficos, fatores de risco genéticos e não-genéticos para câncer de mama, estimativa do risco vital de desenvolver câncer de mama, probabilidade de mutação em gene *BRCA*, e aceitação do teste genético);
2. Determinar a prevalência de indivíduos em maior risco para o câncer de mama hereditário, em uma amostra populacional do sul do Brasil, selecionada com base na história familiar de câncer;
3. Identificar mutações e rearranjos gênicos no gene *BRCA1* em famílias do sul do Brasil com alto risco para síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário;
4. Determinar a frequência da variante *CHEK2* 1100delC em famílias com alto risco para síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e cólon.

7. ARTIGOS CIENTÍFICOS (organizados em Capítulos)

CAPÍTULO 1

Palmero EI, Caleffi M, Schüler-Faccini L, Roth FL, Kalakun L, Skonieski G, Giugliani R, Camey S, Ashton-Prolla P Implementation of a genetic cancer risk assessment program within a breast cancer screening cohort in an underserved population. *Breast Cancer Res Treat* (a ser submetido)

Implementation of a genetic cancer risk assessment program within a breast cancer screening cohort in an underserved population.

Edenir Inêz Palmero^{1,2}, Maira Caleffi³, Lavínia Schüler-Faccini^{1,4,5}, Fernanda Lenara Roth⁴, Luciane Kalakun⁶, Giovana Skonieski³, Roberto Giugliani^{1,4,5}, Suzi Alves Camey⁷, Patricia Ashton-Prolla^{1,2,4,5}

Authors affiliation:

1. Post-Graduate Course in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
2. Genomic Medicine Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.
3. Nucleo Mama Porto Alegre and Associação Hospitalar Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil
4. Service of Medical Genetics, Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.
5. Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
6. Post-graduate course in Epidemiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
7. Department of Statistics, Mathematics Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Running Head: Genetic cancer risk assessment in an underserved population.

Corresponding author:

Patricia Ashton-Prolla

Serviço de Genética Médica de Porto Alegre

Centro de Pesquisas, 3º. andar

Rua Ramiro Barcelos 2350

90035-903 Porto Alegre RS

Brazil

e-mail: pprolla@hcpa.ufrgs.br

Tel.: + 55 51 2101-8011

Fax: + 55 51 2101-8010

ABSTRACT

In April of 2004, a large population-based cohort study (the Nucleo Mama Porto Alegre – NMAMA - Cohort) was started in Porto Alegre to collect data on breast cancer (BC) risk factors and test a model for community-based BC screening in an underserved population. At inclusion, all patients responded a questionnaire about family history (FH), designed to identify patients with an increased likelihood of carrying germline mutations in *BRCA1*, *BRCA2* and other breast cancer predisposition genes. Patients with a positive family history of breast, ovarian and colorectal cancer were referred to genetic cancer risk assessment (GCRA), where medical and family histories were obtained and lifetime breast cancer risk estimates (LTBCRE) as well as prior probability of carrying a *BRCA* mutation were calculated. Three BC risk categories were established: a) average-slightly increased risk (LTBCRE < 20%); b) moderate-high risk (LTBCRE ≥20%) and c) pedigree indicating a breast cancer predisposition syndrome (BCPS). A total of 9234 women were enrolled in the NMPOA cohort and of these, 1247 were referred to GCRA. A total of 345 (27.7%) women did not reach or declined GCRA. The majority of the remaining 902 women, 688 (76.3%), did not fulfill criteria for a BCPS. Fifty-five (8.0%) were classified as moderate-increased risk, and 214 (23.7%) women (183 families) had pedigrees suggestive of a BCPS, including hereditary breast and ovarian cancer syndromes (HBOC), hereditary breast and colorectal cancer syndrome (HBCC) and Li-Fraumeni-like syndrome (LFL). Twenty-five families fulfilled criteria for more than one BCPS. Women at higher risk categories were referred to more intensive follow-up and/or screening protocols. The relatively large proportion of attenders to the proposed GCRA (72.3%), indicates that the program seems to be well accepted by the community and is feasible, regardless of potential cultural, economic and social barriers.

Key words: Hereditary breast cancer, genetic cancer risk assessment, breast cancer.

BACKGROUND AND SIGNIFICANCE

Demographic data.

Latin America (LA) is a continent formed by medium-to-low income countries with evolving health indicators towards patterns seen in developed countries. Latin American populations have an extensive ethnic and cultural diversity, determined by their history and different degrees of admixture between native and immigrant populations. Most of these countries have medium-low annual per capita gross national products (GNP) and by the end of the 20th century 46.0% of the population was still living in poverty. Population growth continues unabated despite reductions in fertility rate and crude birth rate due to declines in mortality and increases in life expectancy at birth [1].

Brazil is the largest and most populated country in LA. It is divided in 26 States grouped in 5 main regions and has a population of 160 million inhabitants, mostly concentrated along the coast. Brazil's GNP is 750 billion dollars (world's 8th) and the per capita income, 4.800 dollars (world's 39th) per year. The infant mortality rate is 42/1000 live births (ranging from 6-150 in some areas) and 83.0% of the population is alphabetized [2, 3].

Rio Grande do Sul (RS) is the southernmost State of Brazil, it corresponds to about 7.0% of the national area and has approximately 10 million inhabitants. Around 82.0% of the population lives in urban areas, 93.5% is alphabetized, life expectancy is 73.4 years, and the infant mortality rate is about 15/1000 live births [2, 3]. The population of RS is quite heterogeneous, and has received a significant number of European and Eastern-European immigrants. The European ethnic background is probably one of the highest in the country, and there is less native (indian) and african contribution [4]. Interestingly, a few genetic disorders have been reported as exceedingly common in this region [5-7]. Its

capital, Porto Alegre is the 10th largest city of the country, with a population of 1.360.590 inhabitants corresponding to 13.4% and 0.8% of the population of the state and the country, respectively [8].

Health care and genetic services in Brazil

The Brazilian constitution guarantees the right to medical assistance to every citizen and the largest share of the population (at least 75.0%) depends almost entirely on health care provided by the government. Primary, secondary and tertiary health care in the public sector is provided by this system, called “SUS” (Sistema Único de Saúde). A special program designed for primary, community-based health care is a family health program called “Programa Saúde da Família” (PSF). It was created in the mid-90’s and is based upon the organization of multidisciplinary health care teams, composed by a physician, a nurse, one or two nurse assistants and 4-6 lay community health workers (‘community agents’) that deliver primary health care to a geographically defined population including approximately 600 families and 3400 individuals. PSF has expanded rapidly in the country and nowadays it covers about 45.0% of the Brazilian population [9-12].

Genetic services in Brazil (as in the rest of Latin American countries) have developed slowly and are mainly centered in teaching hospitals of major cities. With few exceptions, departments of health at city, provincial and national levels do not have explicit policies for the prevention and care of people with genetic disorders. Only two public services that provide genetic counseling for individuals at-risk for hereditary cancer exist in Rio Grande do Sul and they are located in tertiary care centers. Genetic testing *per se* is not available locally, and is not covered by SUS or private health insurance [13-15].

Breast cancer in Brazil and Rio Grande do Sul.

Breast cancer (BC) is the first cause of cancer-related deaths in Brazilian women of all ages. In RS, BC incidence rates for 2006 were predicted to be 88.8 as compared to national rate of 51.7 per 100.000 individuals. Crude mortality rates are only available for year 2004, and numbers for RS are again higher than those for the country (17.9 and 10.6 per 100.000 individuals, respectively). Between the years 1999-2003 approximately 45.0% of breast tumors were diagnosed in stages III and IV and the incidence/mortality ratio was estimated to be 4.7. In the state of RS, BC is the first cause of cancer-related deaths in young women (30-49 years) and BC-related mortality is increasing [16]. Porto Alegre has one of the country's highest BC incidence and mortality rates [146.8 (year 2006) and 26.7 (year 2004) per 100.000 individuals, respectively] [17, 18].

Hereditary breast cancer (HBC)

Of all breast cancer cases, an estimated 5.0-10.0% is hereditary, i.e., caused by a germline mutation in a cancer predisposition gene that confers to its carrier a significantly higher cancer risk [19-21]. During the last two decades, important advances in molecular genetics have resulted in the identification of cancer predisposition genes such as *BRCA1* and *BRCA2* [22, 23]. Germline mutations in these genes are related to an increased risk for BC, ovarian cancer (OC) and other tumors in a syndrome called HBOC (Hereditary Breast and Ovarian Cancer). Clinically significant *BRCA* mutations are estimated to occur in 1 in 300 to 500 persons in the general population [24-27]. Other BC-predisposition genes, such as the tumor suppressor gene *TP53* (associated to Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes, LFS/LFL) [28-30] and *CHEK2* (associated to Hereditary Breast and Colon Cancer syndrome, HBCC) [31] have been identified and are thought to have important,

albeit lower contributions to hereditary breast cancer (HBC) [32, 33]. The identification of individuals at risk for HBC is important for many reasons. First, affected persons have a lifetime risk of developing cancer that is much higher than that observed in the general population, for several different cancer types. Second, other at-risk relatives of an affected person may be identified (the disease follows autosomal dominant inheritance and hence, 50% of the siblings and 50% of the offspring of an affected person will also be carriers of the same mutation). Third, cancer risk reduction strategies (intensive screening, prophylactic surgeries and chemoprevention) are available for mutation carriers [34].

The family history of cancer and the presence of specific risk factors such as history of pre-menopausal BC, male BC, bilateral BC and family history of breast and ovarian cancer are important indicators of HBC risk [35]. In fact, not much attention has been given to the identification and study of these risk factors in the community and in primary health care services [36-39]. In Brazil, data on HBC or more specifically, prevalence of mutations in BC predisposition genes are scarce and only a few germline mutation studies have been reported [40-43]. Information about the prevalence of HBC syndromes and related mutations in Southern Brazil are inexistent.

RATIONALE

In Brazil, breast cancer (BC) is a significant public health problem, due to its morbidity, and high incidence and mortality rates. In addition, a significant proportion of the population has limited access to health services, especially BC screening procedures. About half of the cases are diagnosed in advanced stages and not surprisingly, mortality rates remain high. Southern Brazil has one of the highest BC incidence and mortality rates in the country. Although exposure to environmental risk factors and/or genetic

predisposition may explain this difference in relation to other Brazilian regions, no systematic investigation has been conducted to examine if a significant proportion of women in this region are at a higher risk for hereditary forms of the disease. If genetic predisposition has in fact a contribution, this information should have an impact in the delineation of specific BC prevention strategies for the local community.

METHODOLOGY

Implementation of a genetic cancer risk assessment program in Southern Brazil

In April of 2004, a large population-based cohort study (the Nucleo Mama Porto Alegre – NMAMA - Cohort) was started in Porto Alegre through a partnership of several government, non-profit community-based organizations, universities and private entities. This prospective cohort intends to collect demographic and epidemiologic data of a large sample of women and test a model for community-based BC screening in an underserved population [44, 45]. The goals of the NMAMA cohort are to improve rates of early BC detection, promote BC prevention strategies, detect BC risk factors in this community and ultimately decrease BC mortality rates. The study will follow prospectively women above the age of 15 who presented within the 24 months of enrollment to one of the participating PSF.

Patient recruitment

Health care professionals and community agents of the PSFs engaged in the NMAMA cohort were trained in basic aspects of hereditary cancer, recognition of at-risk patients and referral strategies. From April 2004 through March 2006, women at or above age 15 years visiting one of 18 primary health care units (PSF) in Porto Alegre were

included in the cohort. Family history (FH) of breast cancer and other tumors was assessed in all patients and is the basis for the study described here as the genetic cancer risk assessment (GCRA) program of the NMAMA cohort.

At inclusion in the cohort, all patients responded to a brief questionnaire about family history (Table 1). Most of the questions refer to FH features that have been associated with an increased likelihood of clinically significant *BRCA* mutations in several studies, and thus, these questions were designed to identify patients at-risk for the HBOC syndrome [35, 46-49]. In addition, a question about FH of breast and/or colon cancer was included due to a previous suggestion of a higher than expect number of families with these tumors in cancer genetic clinics of Porto Alegre [50]. Patients answering positively to at least one of these questions were referred by their PSF to GCRA by a clinical cancer geneticist in a secondary health care center, the Nucleo Mama Porto Alegre (NMPOA). Upon arrival at NMPOA, patients were informed about the study and those who volunteered and were older than 18 years were included after signature of informed consent (IC). Ethical approval was obtained from the respective institutional ethics committees. Active recruitment was initiated after an average of 6 months if patients referred by the PSF did not reach NMPOA and included three attempts to schedule a visit by telephone, followed by an invitation letter and an active search by the PSF's community agents. If all three strategies failed, or if a woman did not show after three scheduled appointments, no further contact attempts were made.

Genetic Cancer Risk Assessment (GCRA)

Genetic evaluation included medical and family histories recorded in detailed pedigrees with information traced as far backwards and laterally as possible, extending to

parental lines and including a minimum of three generations. Confirmation of the cancer FH was attempted in all cases and pathology reports, medical records and/or death certificates were obtained whenever possible upon specific consent from the patient and/or family. Lifetime breast cancer risk estimates were obtained using the Claus, Gail and Tyrer-Cuzick models [51-54]. Three BC risk categories were established. Patients were considered at average-slightly increased risk when the estimated lifetime BC risk was under 0.2 (20.0%) using all three models. If the estimate by at least one of the models was at or above 0.2 (20.0%), patients were classified as moderate-high risk. All patients fulfilling criteria for a BC predisposition syndrome (BCPS) were considered at high risk. For the clinical diagnosis of hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndromes, the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) and American Society of Clinical Oncology (ASCO) criteria were used [55-57]. In addition, prior probabilities of carrying a *BRCA1* or *BRCA2* mutation were determined for each patient using mutation prevalence tables and the modified Couch mutation prediction model [49, 53, 58]. All pedigrees were reviewed by at least two clinical geneticists to assess presence of criteria for the diagnosis of LFS, LFL, HBCC or other cancer predisposition syndromes. For LFS, the original criteria described by Li and Fraumeni [28] were used; for LFL, pedigrees were classified according to the criteria of Birch [29] and Eeles [30] and for HBCC, the Meijers-Heijboer criteria were used [31]. Genetic testing was offered to patients fulfilling LFS, LFL, HBCC criteria as described above and for those with HBOC whose FH fulfilled the ASCO criteria and/or who had a prior probability of a germline *BRCA* mutation of 30.0% or more. Testing included mutation analysis of one or more of four breast cancer predisposition genes (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* and *CHEK2*) and its results will be described elsewhere. A general overview of the study is depicted in Figure 1. After conclusion of genetic cancer

risk assessment (GCRA), a written report and a brochure with key information regarding breast cancer prevalence, treatment and prevention as well as information about genetic predisposition to cancer was mailed to all patients.

Follow up

All patients were encouraged to perform monthly breast self-examinations (BSE). Women in the average-slightly increased risk category were referred back to their PSF for prospective follow-up as determined by age and other non-genetic risk factors. Patients in the moderate-increased risk category were referred to clinical breast evaluations at 6 month-intervals and annual mammography; a breast ultrasound was added for all patients under the age of 50 years and whenever necessary. All patients fulfilling criteria for a BCPS were followed with clinical breast examination (CBE) at 6 month-intervals, and at least annual mammography and ultrasound, starting at age 25 years. Those with an increased risk for tumors other than BC were referred to tertiary care centers for inclusion in comprehensive cancer screening programs.

PRELIMINARY RESULTS

Description of the population served by the program

Women enrolled in this study were residents of 7 regions of the city of Porto Alegre, that together comprehend 305 km² or 64.0% of the total area. These regions have approximately 476.000 inhabitants, a number that corresponds to 35.0% of the city's total population. All study subjects were regular users of 18 PSF units and relied almost exclusively on this system for health care. Although specific demographic data on this population of PSF clients is unavailable, according to the most recent municipal census, in

these 7 regions the average percent of illiterate individuals is 5.6%; 49.2% have less than 8 years of education, about 20.0% live in temporary homes and 6.5% of the providers have no income [3, 59].

Patient recruitment

Nine-thousand two-hundred and thirty four (9234) women above the age of 15 years were enrolled in the NMPOA cohort from April 2004 to March 2006. Of these, 1286 (13.9%) answered positively to at least one of the seven questions about family history of BC, OC or colorectal cancer (CRC) (Table 1) and were referred for genetic risk assessment (GCRA) by their PSF. All 1247 women with a positive family history and above age 18 years were invited to participate in this study. For women < age 18 years an older first-degree relative was invited for GCRA. Of the 1247 women with a positive FH, 261 (21.0%) did not reach NMPOA after the initial referral and did not respond to the different recruitment strategies within a period of at least 12 months after inclusion in the NMPOA cohort. In addition, 41 (3.3%) women scheduled an appointment three times and did not show and another 43 (3.4%) did not wish to participate in the study. The remaining 902 women from 829 families were assessed for their genetic risk for BC.

A comparison between demographic data of women with a positive family history that were evaluated in the GCRA program (attenders) and those never evaluated after the initial referral (non-attenders) showed that these groups differed significantly in some aspects. Non-attenders were, on average, younger, less educated, more often smokers and had less often been submitted to a previous breast biopsy ($p < 0.001$; data not shown). Regarding family history of cancer, a significantly higher proportion of non-attenders referred both breast *and* ovarian cancer in a relative that could suggest an ascertainment bias towards loss of higher-risk patients (Table 1). However, when we compared the

answers obtained by questionnaire in the primary health care unit with the reported history during GCRA of attenders (often confirmed with medical records, pathology reports and/or death certificates), a low concordance level was observed between responses, i.e. in the vast majority of cases these dual diagnoses were not confirmed during GCRA (Kappa coefficient = 0.069). Therefore, for this question, the initial report does not seem to reflect the real family history and this, in turn, may be related to poor comprehension of this particular question (non-attenders were on average less educated than attenders), or to a problem with the accuracy of the report of gynecologic tumors. For the other questions, a significant difference in responses between attenders and non-attenders was only observed for a history of breast and/or ovarian cancer in ≥ 2 relatives, but with a higher frequency of positive answers in the attenders group.

Risk Assessment

Of the 902 women submitted to GCRA, the majority, 688 (76.3%), did not fulfill criteria for a breast cancer predisposition syndrome (BCPS). Of these, 633 (92.0%) and 55 (8.0%) women were classified as average-slightly increased and moderate-increased risk, according to their estimated lifetime risk (ELTR) for developing BC. The most common feature of the family history that justified GCRA in this group of patients was presence of a relative with BC diagnosed before age 50 years (Table 1). The remaining 214 women (23.7%) from 183 families had pedigrees suggestive of a BCPS. Of these, 65, 122 and 22 families fulfilled the previously defined criteria for HBOC, LFL and HBCC syndromes (Figure 2). Twenty-five families fulfilled criteria for more than one BCPS (Figure 1).

Demographic and other variables related to ELTR for developing BC in the 902 GCRA attenders are summarized in Table 2. Of note, a significant proportion of women were smokers and overweight or obese, as also observed in the NMPOA cohort as a whole

[44]. Regarding the family history of cancer, a high number of patients referred a positive history in the maternal lineage. A history of BC only or BC and CRC were reported by a significant proportion of the patients. After pedigree analysis, 214/902 patients fulfilled criteria for at least one of the most common BCPS (Figure 2). The 76 patients (from 65 families) fulfilling criteria for HBOC syndrome had average probabilities of mutation in a *BRCA* gene of 21.9% (SD 13.9%) and 25.7% (SD 14.8%) by the Modified Couch (Penn II) model and the *BRCA* mutation prevalence tables, respectively. For all cancer-unaffected attenders, including those with criteria for a BCPS, the ELTR of developing BC was estimated using the Gail, Claus and Tyrer-Cuzick models and the mean ELTRs of the entire sample were: 13.9%, 13.6% and 13.9%, respectively. Patients outside the BCPS group were further subdivided in two risk categories: a) average to slightly-increased risk (ELTR < 20.0%) and b) moderately increased risk of developing BC (ELTR \geq 20.0%). The mean ELTR for BC and the average probability of mutations in a *BRCA* gene for each group are summarized in Table 3. A striking observation was that the average age at BC diagnosis within families of each of these three risk categories did not differ significantly, and was below age 50 in all.

DISCUSSION

To our knowledge this is the first in-depth study of genetic risk factors for BC and prevalence of different hereditary breast cancer phenotypes in a population-based sample of women. It is particularly important because it was conducted in an underserved population that, despite presenting high BC incidence and mortality rates, has poor access to cancer prevention and treatment strategies.

Using a questionnaire that was originally designed to identify patients with the HBOC syndromes, we identified a number of women with a positive family history not only of breast, but also, colorectal cancer. Given that this tumor is relatively frequent in Brazilian women (3rd most incident malignant tumor) and amenable to prevention and curative treatment while diagnosed in its initial stages, incorporation of specific questions regarding family history of this tumor in a broad screening program for familial cancer should be considered. About one-quarter of the women that reported a family history of breast, ovarian or colorectal cancer came from families that fulfilled criteria for one of the most commonly recognized hereditary breast cancer syndromes. No LFS families were identified, but a strikingly high proportion of women had a FH suggestive of Li-Fraumeni-like (LFL) syndrome. Although an overlap does exist between the phenotypes of HBOC, LFS/LFL and HBCC, the prevalence of families with LFL criteria is strikingly high in this sample, especially considering that the original questionnaire used to identify these patients was not designed to screen for the syndrome and thus, the phenotype might be even more prevalent in this population. As early as 1999, Varley et al [60] already described certain low penetrance *TP53* alleles and suggested that deleterious mutations in *TP53* (or *TP53*-related genes) may be more frequent in the population than has been estimated previously. In addition, several recent reports have indicated that a deleterious germline mutation in *TP53* exon 10, R337H, might be very prevalent in Southern Brazil and related to a founder effect in this region [42, 61]. Preliminary analysis of an unselected sample of asymptomatic women submitted to mammographic screening at the same NMAMA cohort identified an unexpected frequency of this germline mutation in this sample from the general population. Furthermore, presence of the mutation was not associated with the classical LFS or LFL phenotypes (Palmero et al., manuscript submitted).

It is premature to affirm that a highly prevalent genetic risk factor exists in this area, and that this factor explains the unusual frequency of families with LFL phenotypes. However, such factor could be associated to other important observations in this region, such as the low age at breast cancer diagnosis and the high BC incidence rates. An important information to either support or refute this hypothesis will be the detailed study of germline mutations in *TP53* and other *TP53*-related genes of these families. In addition, the study of germline *BRCA* mutations in the patients with HBOC criteria will contribute to the understanding of the applicability of currently used diagnostic criteria and mutation prediction models in this population. Finally, the long-term follow-up of patients with a positive family history but ascertained to different categories of risk by the ELTR for developing breast cancer may enable the evaluation of the goodness of fit and discriminatory accuracy of the three models used to assess this population.

Regarding non-genetic risk factors for breast cancer in this group of patients, the prevalence of reproductive/endocrine risk factors [62] does not seem to be significantly increased, as shown by the low frequency of hormone replacement therapy users, the relatively late average age at menarche, early age at birth of the first child, high frequency of parity and relatively early age at menopause. The high proportion of women that are overweight and obese is however striking and warrants further study.

The relatively large proportion of attenders to the proposed GCRA (72.3%) was very encouraging, and is comparable to that shown in other studies. As examples we cite the study of Ricker et al [63] in an underserved predominantly Latin cohort of the U.S.A. where 88.0% of appointments were kept by the patients. In another study of an underserved group of Singaporean women, the acceptance rate for genetic risk assessment was 70.0% [64]. In an interesting recent study by O'Neill et al [65], the outcome of genetics referrals

was evaluated in a group of north-american women with an estimated *BRCA* mutation probability $\geq 10.0\%$. Within six-months after referral, 36.0% of patients had undergone GCRA (acceptors), 27.0% still intended to seek (intenders) and 36.0% refused such assessment (decliners). Population-based mammographic screening programs worldwide, have also described variable compliance rates, around 61.0-83.0% [66-68].

In the group of women studied here, the number of attenders has to be further interpreted in light of the difficulties that most of them face to seek advice, health care and education/prevention opportunities. First, there might be a cultural difference in cancer-associated risk perception and/or a difficulty in understanding the importance of prevention. The way of dealing with risk is not only influenced by the individual's perception but also by his/her culture. Hofstede [69] studied different cultures from nations around the world using five parameters, one of them being the uncertainty avoidance index (UAI). This index reflects the tolerability of a certain society towards uncertainty and ambiguity. Groups that have a high UAI create strategies to control or avoid risk and ambiguity. According to this study, the Brazilian society has a higher UAI as compared to countries like Denmark, the United Kingdom and the United States of America, for instance, and this could interfere with cancer risk perception, and motivation to seek GCRA. In addition, certain cultures are more fatalistic about cancer and perceive fewer benefits from screening [70]. Second, there might be a knowledge barrier to the understanding of how these measures will ultimately increase one's quality of life leading to poor compliance with preventive recommendations as suggested by some authors [64, 71, 72] and this could be one of the reasons why some of the patients in this cohort did not schedule an appointment after referral for GCRA. Third, in many of these women, care of self is often set aside by more urgent needs, such as providing food, housing and education to their families. Finally,

there has been an historical lack of resources to ensure that adequate screening is provided to these women, even if there is evidence for a higher risk [45]. For these reasons, programs such as the one present here, that attempt to identify and prospectively follow women at increased risk for cancer, needs to consider the importance of patient education and social interventions (i.e. facilitate transportation, nutrition and childcare while these women take care of their health) in the difficult task of maintaining compliance to the recommended management guidelines. A more detailed study of non-attenders, their social profile and reasons for not attending may give us better clues on how to improve coverage for programs such as these, and thus ensure that all high-risk patients have access to the information and the opportunity to act towards risk reduction.

Through the implementation of this genetic risk assessment program for an underserved community in Southern Brazil, we were able to identify a significant number of families that fulfill criteria for breast cancer predisposition syndromes that are associated with an increased lifetime risk for developing breast cancer and other tumors. The relatively high number of women that attended GCRA after an initial referral indicates that such a program seems to be well accepted by the community and is feasible, regardless of potential cultural, economic and social barriers. We conclude that the prevalence of genetic and non-genetic risk factors related to breast cancer development may be population-specific. This knowledge and the future study of applicability and validity of genetic cancer risk assessment programs, current BC risk estimation and mutation prediction models in selected populations will help to define the best approach for delineating specific cancer prevention, diagnosis and treatment strategies in high-risk communities.

Note: Additional detailed investigations of the sample presented here are underway. These include a characterization study of breast cancer knowledge, risk perception, and family dynamics, as well as a study on the first-degree family history of cancer. Breast cancer risk estimates using different models of a group of women from the same cohort that are unselected for family history and participate in a mammographic screening program are also being studied.

Table 1 – Positive responses to the family history questionnaire given by women referred to genetic risk assessment (GCRA). n = 1247; including GCRA attenders and non-attenders.

	GCRA non-attenders		GCRA attenders		P
	(n=345)		(n=902)		
	N	(%)	N	(%)	
Did any of your 1st degree relatives have breast or ovarian cancer ?	122	(35.4)	378	(42,0)	0.118
Did any of your relatives have bilateral breast cancer?	48	(14.1)	112	(12,4)	0.561
Did any man in your family have breast cancer?	6	(1.7)	11	(1,2)	0.590
Did any woman in your family have breast <i>and</i> ovarian cancer ?	47	(13.9)	44	(4,9)	p<0.001
Did any woman in your family have breast cancer before the age of 50 years?	214	(62.4)	568	(63,0)	0.551
Do you have 2 or more relatives with breast and/or ovarian cancer ?	63	(18.3)	226	(25,1)	0.016
Do you have 2 or more relatives with breast and/or bowel cancer ?	69	(20.2)	234	(25,9)	0.062

(*) one patient may have answered positively to more than one question.

The NMPOA
Genetic Cancer
Risk Assessment
Program

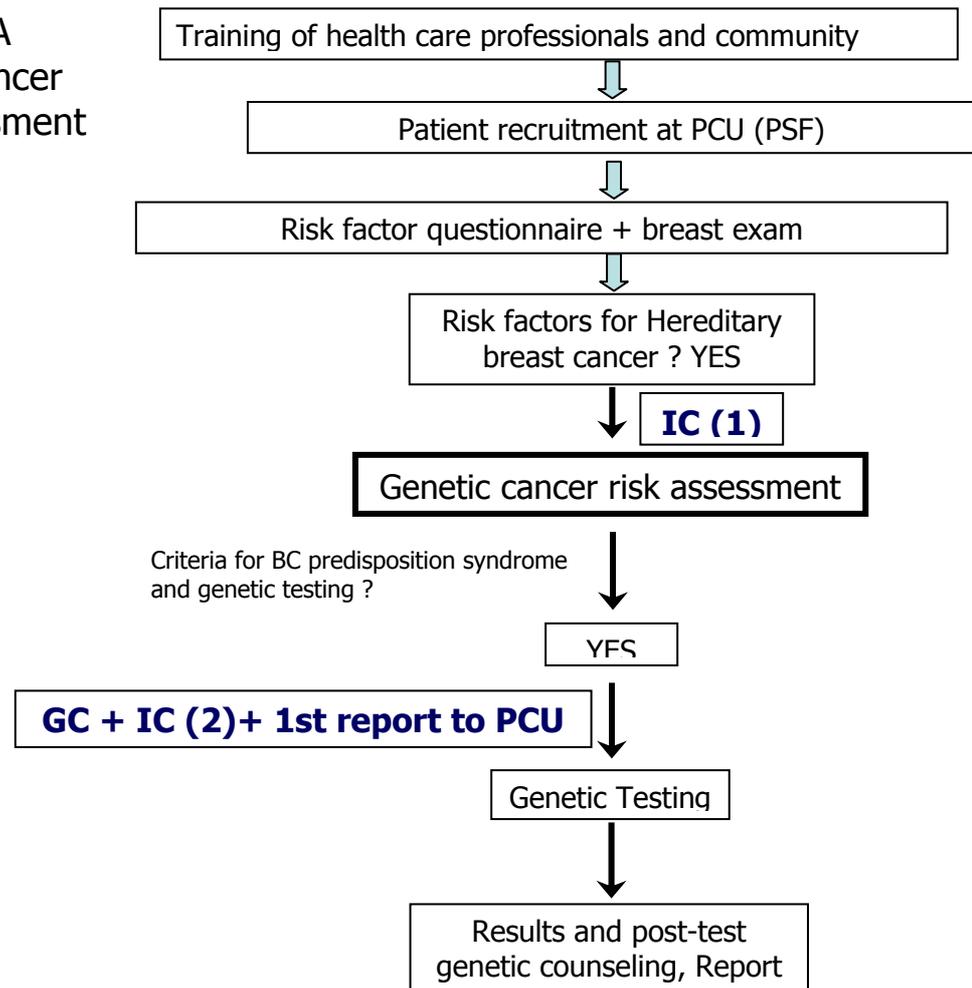


Figure 1 – General overview of the program. (PCU: primary care unit; IC: informed consent).

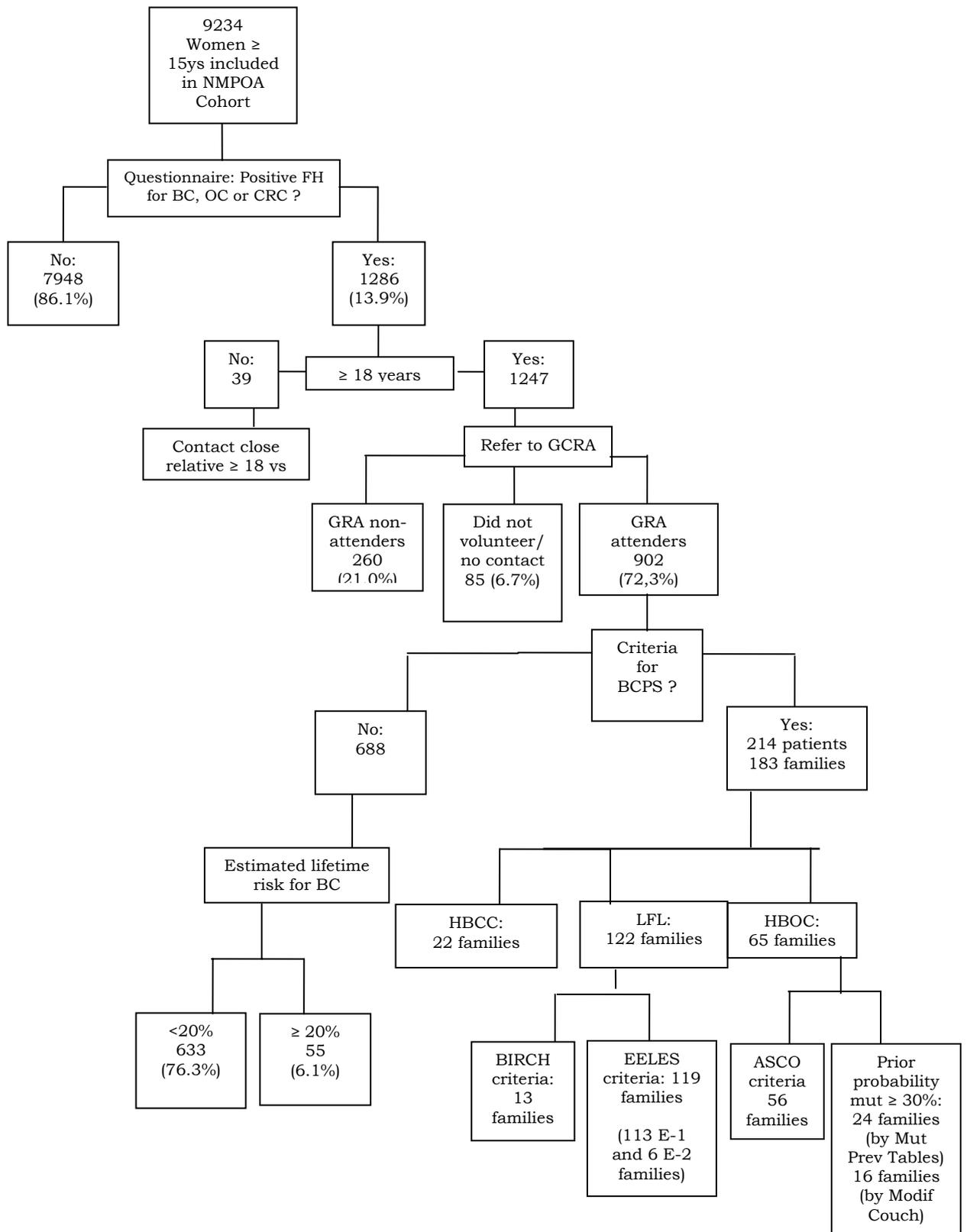


Figure 2 – Preliminary results of genetic risk assessment in a population-based cohort of women > 15 years of age in Porto Alegre, Brazil.

Table 2. Demographics and variables of the 902 women evaluated for genetic risk assessment

	N	%	Mean	SD
Age at assessment	-	-	43.2	12.7
BMI			27.9	5.8
≤18.5	6	0.7	-	-
18.51-25	300	33.3	-	-
25.01,1-30	298	33.0	-	-
>30	285	31.6	-	-
Smoking	262	29.0	-	-
Age at menarche	-	-	12.7	1.7
Parity				
No children	108	12.0	-	-
One or more children	790	88.0	-	-
Age at birth of first child	-	-	21.5	5.0
Reproductive Status				
Pre-menopausal	585	65.2	-	-
Post-menopausal	312	34.8	-	-
Age at menopause	-	-	47.0	5.4
Endogenous hormone exposure (ys)	-	-	27.3	9.7
Hormone replacement therapy	73	8.1	-	-
Consanguinity	65	7.3	-	-
Family history of cancer				
Side of family				
Maternal	554	62.7	-	-
Paternal	223	25.2	-	-
Maternal and paternal	58	6.6	-	-
Others (siblings/offspring)	49	5.5	-	-
BC family history				
Breast cancer only	234	26.1	-	-
Breast and ovarian cancer	87	9.6	-	-
Breast and colon cancer	179	19.8	-	-

Table 3. Risk estimates in the 902 women submitted to genetic risk assessment.

	Average-slightly increased risk M(SD)	Moderate increased risk M(SD)	BCPS M(SD)	p
Number of BC cases in family*	0.98(0.67)	1.45(0.83)	1.69(1.14)	<0.001
Number of BC-affected generations*	0.92(0.54)	1.24(0.55)	1.29(0.64)	<0.001
Average age at BC diagnosis in the family	46.6(10.6)	47.0(11.4)	46.6(11.2)	0.968
ELTR for BC				
Using the Gail** model	10.2(4.1)	19.2(5.1)	12.3(6.6)	<0.001
Using the Claus* model	10.2(2.8)	16.7(7.8)	13.9(7.4)	<0.001
Using the Tyrer-Cuzick** model	9.8(3.7)	19.6(6.2)	12.4(5.6)	<0.001
Prior probability of mutation in a <i>BRCA</i> gene				
Mutation Prevalence Tables***	6.3(3.8)	6.7(3.9)	13.2(13.0)	<0.001
Modified Couch model***	9.7(4.3)	10.3(5.0)	14.8(10.6)	<0.001

M=mean; SD=standard deviation; BCPS=breast cancer predisposition syndrome; BC=breast cancer; ELTR=estimated lifetime risk

* The group with average-slightly increased risk has a mean value that is significantly lower than the other two groups.

** The mean values in all three groups differ significantly from each other.

*** The group with criteria for a breast cancer predisposition syndrome has a mean value that is significantly higher than that of the other two groups.

Note: The number of valid cases used in each of the ELTR and prior probability analyses was as follows: for the Gail, Claus and Tyrer-Cuzick models, 878, 592 and 874 valid cases, respectively. For the mutation prevalence tables and the modified Couch model, 890 and 874 valid cases, respectively.

Acknowledgements: The Núcleo Mama (NMAMA) Cohort, from which the patients derive, is maintained by Associação Hospitalar Moinhos de Vento, in a partnership with Instituto da Mama do Rio Grande do Sul and the Municipal Health Agency from Porto Alegre. The authors are indebted to Karen Barboza de Pereira, Diego Pasetto, Cristina Brinkmann de Oliveira Netto, Ana Cecília Mano de Azevedo, Ademar Bedin Júnior, Luciane Poletto Antunes, Juliana Zignani, Fávio Marcel Telis Gonzalez, Luciano Artico, Patricia Izetti Lisbôa Ribeiro, Ernestina Aguiar, Juliana Giacomazzi, Érica Batassini, Susana Mayer Moreira, Vanessa Belo Reyes and the NMPOA team for their help with the recruitment, evaluation and follow-up of the patients included in this study. We also wish to thank Drs. Juan Clinton Llerena Jr, Pierre Hainaut, Victor Penchaszadeh, Maria Isabel Waddington Achatz, Philip Kivitz and C. Kent Osborne for their stimulating discussions about the design, implementation and outcomes of this program. This study was supported by a grant from Susan G. Komen for the Cure (POP0403033), and in part by grants from Fundo de Incentivo à Pesquisa –FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (# 04-170) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - PRODOC grant number 00202/03-7). El Palmero was supported in part by grants from The International Agency for Research in Cancer (IARC) and CNPq (process number 203732/2005-7).

REFERENCES

1. Website of the Panamerican Health Organization (PAHO) (2007) <http://www.paho.org/english/dd/ais/coredata.htm>. Cited 01 July 2007
2. Website of the Brazilian Public Health System (SUS) (2007) <http://www.datasus.gov.br>. Cited 03 April 2007
3. Website with demographic data about Brazil (2007) <http://www.ibge.gov.br>. Cited 03 June 2007
4. Marrero AR, Das Neves Leite FP, de Almeida Carvalho B et al (2005) Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Hum Biol* 17(4):496-506
5. Severini MH, Silva CD, Sopelsa, A et al (1999) High frequency of type 1 GM gangliosidosis in southern Brazil. *Clin Genet* 56:168-169
6. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B et al (2001) An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9330-9335
7. Jardim LB, Pereira ML, Silveira, I (2001) MJD in South-Brazil: clinical and molecular characterization of kindreds. *Acta Neurol* 104:224-231
8. Website about the city of Porto Alegre (2007) <http://www2.portoalegre.rs.gov.br/observatorio/> Cited 15 May 2007
9. Ramalho AS, Silva RB (2000) Community genetics: a new discipline and its application in Brazil. *Cad Saude Publica* 16:261-263

10. Brasil (2003) Ministério da Saúde. Programa Saúde da Família: ampliando a cobertura para consolidar a mudança do modelo de Atenção Básica. *Rev Bras Saúde Materno-Infantil* 3:113–125.
11. Brasil (2004) Ministério da Saúde, Departamento de Atenção Básica. Atenção Básica e a Saúde da Família. Available at <http://dtr2004.saude.gov.br/dab/atencaobasica.php> Cited 10 March 2007
12. Harzheim E, Duncan BB, Stein AT et al (2006) Quality and effectiveness of different approaches to primary care delivery in Brazil. *BMC Health Serv Res* 6:156.
13. Penchaszadeh VB (2000) Community genetics in Latin America: challenges and perspectives. *Community Genet* 3:124-127
14. Llerena JC Jr (2002) Medical Genetics, Single Brazilian Health System (SUS) and integrated aspect in health attention and care. *Ciência & Saúde Coletiva* 7:17-41
15. Palmero EI, Kalakun L, Schüler-Faccini L et al (2007a) Cancer genetic counseling in public health care hospitals: the experience of three Brazilian services. *Community Genet* 10(2):110-119
16. Gonçalves ATC, Jobim PFC, Vanacor R (2007) Câncer de Mama: Mortalidade Crescente na Região Sul do Brasil entre 1980 e 2002. *Cad Saúde Pública* (in press)
17. Website of the Brazilian National Cancer Institute (2007) <http://www.inca.gov.br> Cited 03 July 2007
18. Official website of the Brazilian State of Rio Grande do Sul (2007) <http://www.rs.gov.br> Cited 03 July 2007

19. Margolin S, Lindblom A (2006) Familial breast cancer, underlying genes, and clinical implications: a review. *Crit Rev Oncog* 12(1-2):75-113
20. De la Chapelle A, Peltromäki P (1998) The genetics of hereditary common cancers. *Curr Opin Genet Dev* 8:298-303
21. Offit K (1998) *Clinical Cancer Genetics: Risk Counseling and Management*. Wiley-Liss, New York
22. Miki Y, Swenson J, Shattuck-Eidens D et al (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266:66-71
23. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J et al (1994) Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2 to chromosome 13q12-13. *Science* 265:2088-2090
24. Peto J, Collins N, Barfoot R et al (1999) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 91:943-949
25. Anglian Breast Cancer Study Group (2000) Prevalence and penetrance of BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of breast cancer cases. *Br J Cancer* 83:1301-1308
26. Antoniou AC, Gayther SA, Stratton JF et al (2000) Risk models for familial ovarian and breast cancer. *Genet Epidemiol* 18:173-190
27. Antoniou AC, Pharoah PD, McMullan G et al (2002) A comprehensive model for familial breast cancer incorporating BRCA1, BRCA2 and other genes. *Br J Cancer* 86:76-83
28. Li FP and Fraumeni JF Jr (1969) Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 71:747-752

29. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ et al (1994) Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 54:1298-1304
30. Eeles RA (1995) Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv* 25:101-124
31. Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H et al (2003) The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. *Am J Hum Gen* 72:1308-1314
32. Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ et al (1988) A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 48:5358-5362.
33. Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H et al (2002) A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 71:432-438
34. Guillem JG, Wood WC, Moley JF et al (2006) ASCO/SSO Review of Current Role of Risk-Reducing Surgery in Common Hereditary Cancer Syndromes. *J Clin Oncol* 24:4642-4660
35. Nelson HD, Huffman LHH, Fu R et al (2005) Genetic Risk Assessment and BRCA Mutation Testing for Breast and Ovarian Cancer Susceptibility: Systematic Evidence Review for the U.S. Preventive Services Task Force *Ann Intern Med* 143:362-379
36. Hall IJ, Burke W, Coughlin S et al (2001) Population-based estimates of the prevalence of family history of cancer among women. *Community Genet* 4:134-142
37. Pharoah PD, Lipscombe JM, Redman KL et al (2000) Familial predisposition to breast cancer in a British population: implications for prevention. *Eur J Cancer* 36:773-779

38. de Silva D, Gilbert F, Needham G et al (1995) Identification of women at high genetic risk of breast cancer through the National Health Service Breast Screening Programme. *J Med Genet* 32:862-866
39. Hoskins KF, Zwaagstra A, Ranz M (2006) Validation of a tool for identifying women at high risk for hereditary breast cancer in population-based screening. *Cancer* 107(8):1769-1776
40. Lourenço JJ, Vargas FR, Bines J et al (2004) BRCA1 mutations in Brazilian patients. *Genet. Mol. Biol* 27, 4:500-504
41. Dufloth RM, Carvalho S, Heinrich JK et al (2005) Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. *São Paulo Med J* 123(4):192-197
42. Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F et al (2007) The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett* 245(1-2):96-102
43. Gomes MC, Costa MM, Borojevic R et al (2007) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil. *Breast Cancer Res Treat* 103(3):349-353
44. Caleffi M, Ashton-Prolla P, Weber B et al (2005) Breast cancer screening in 10,000 women of an underserved population in South Brazil: The NMAMAPOA cohort. *J Clin Oncol* 23 (16S):877s
45. Smith RA, Caleffi M, Albert U-S et al (2006) Breast cancer in limited-resource countries: early detection and access to care. *Breast J* 12 (Suppl 1):S16-S26
46. Couch FJ, DeShano ML, Blackwood MA et al (1997) BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 336:1409-1415

47. Shattuck-Eidens D, Oliphant A, McClure M et al (1997) BRCA1 sequence analysis in women at high risk for susceptibility mutations. Risk factor analysis and implications for genetic testing. *JAMA* 278:1242-1250
48. Srivastava A, McKinnon W, Wood ME (2001) Risk of breast and ovarian cancer in women with strong family histories. *Oncology* 15:889-902
49. Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE et al (2002) Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. *J Clin Oncol* 20:1480-1490
50. Palmero EI, Ashton-Prolla P, da Rocha JC et al (2007b) Clinical characterization and risk profile of individuals seeking genetic counseling for hereditary breast cancer in Brazil. *J Genet Couns* 16(3):363-371
51. Gail MH, Brinton LA, Byar DP et al (1998) Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* 81:1879-1886
52. Claus EB, Risch N, Thompson D (1994) Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer* 73:643-651
53. Domchek SM, Eisen A, Calzone K et al (2003) Application of Breast Cancer Risk Prediction Models in Clinical Practice. *J Clin Oncol* 21:593-601
54. Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J (2005) A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Stat Med* 23(7):1111-1130. Erratum in: *Stat Med* (2005) 24(1):156.

55. ASCO Subcommittee on Genetic Testing for Cancer Susceptibility (1996) Statement of the American Society of Clinical Oncology: Genetic Testing for Cancer Susceptibility. *J Clin Oncol* 14:1730-1736
56. Ford D, Easton DF, Stratton M et al (1998) Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 62(3):676-689
57. Website of the National Comprehensive Cancer Network, USA (2007) <http://www.nccn.org> Cited 03 July 2007
58. Domchek SM, Blackwood MA, Tweed AJ et al (2004) University of Pennsylvania BRCA1/BRCA2 prediction model. In: Abstract presented at the Cancer Risk Prediction Models: A Workshop on Development, Evaluation, and Application. Washington, D.C. 20-21 May 2004
59. Porto Alegre (2004) Prefeitura Municipal. Gabinete do prefeito. Secretaria do Planejamento Municipal. Mapas da inclusão e exclusão social de Porto Alegre. Brazil
60. Varley JM, McGown G, Thorncroft M et al (1999) Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors. *Am J Hum Genet* 65(4):995-1006
61. Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC et al (2004) Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 48(5):647-650
62. Henderson BE, Bernstein L (1996) Endogenous and exogenous hormonal factors. In: Harris JR, Lippman ME, Morrow M et al *Diseases of the Breast*, Lippincott-Raven, New York

63. Ricker C , Lagos V, Feldman N et al (2006) If we build it...will they come ? – establishing a cancer genetics services clinic for an underserved predominantly latina cohort. *J Gene Couns* 15(6):505-514
64. Chin TM, Tan SH, Lim SE et al (2005) Acceptance, motivators, and barriers in attending breast cancer genetic counseling in Asians. *Cancer Detect Prev* 29(5):412-418
65. O'Neill SM, Peters JA, Vogel VG et al (2006) Referral to cancer genetic counseling: are there stages of readiness? *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 142(4):221-231
66. O'Malley AS, Forrest CB and Mandelblatt J (2002) Adherence of low-income women to cancer screening recommendations. *J Gen Intern Med* 17(2):144-154
67. Banks E, Beral V, Cameron R et al (2002) Comparison of various characteristics of women who do and do not attend for breast cancer screening. *Breast Cancer Res* 4(1):R1
68. Finney MF, Tumiel-Berhalter LM, Fox C et al (2006) Breast and cervical cancer screening for Puerto Ricans, African Americans, and non-Hispanic Whites attending inner-city family practice centers. *Ethn Dis* 16(4):994-1000
69. Hofstede G (1997) *Cultures and organizations*. McGraw-Hill, New York
70. Russell KM, Perkins SM, Zollinger TW et al (2006) Sociocultural context of mammography screening use. *Oncol Nurs Forum* 33(1):105-112
71. Farmer D, Reddick B, D'Agostino R et al (2007) Psychosocial correlates of mammography screening in older African American women. *Oncol Nurs Forum* 34(1):117-123

72. Achat H, Close G, Taylor R (2005) Who has regular mammograms? Effects of knowledge, beliefs, socioeconomic status, and health-related factors. *Prev Med* 41(1):312-320

CAPÍTULO 2

Palmero EI, Schüler-Faccini L, Hainaut P, Camey S, Moreira-Filho CA, Cunha DR, Roth FL, Kalakun L, Ewald IP, Martel-Planche G, Santos PK, Ribeiro PLI, Cossio SL, Giugliani R, Caleffi M, Ashton-Prolla P Screening for germline *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, and *CHEK2* mutations in families at-risk for hereditary breast cancer identified in a Brazilian population-based study. *Breast Cancer Res Treat* (a ser submetido)

Screening for germline *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, and *CHEK2* mutations in families at-risk for hereditary breast cancer identified in a Brazilian population-based study

Edenir Inêz Palmero^{1,2}, Lavínia Schüler-Faccini^{1,3,4}, Pierre Hainaut⁵, Suzi Alves Camey⁶, Carlos Alberto Moreira-Filho^{7,8}, Danielle Renzoni da Cunha⁷, Fernanda Lenara Roth³, Luciane Kalakun⁹, Ingrid Petroni Ewald², Ghyslaine Martel-Planche⁵, Patricia Koehler dos Santos^{1,2}, Patricia Lisbôa Izetti Ribeiro², Silvia Liliana Cossio^{2,11}, Roberto Giugliani^{1,3,4}, Maira Caleffi¹⁰, Patricia Ashton-Prolla¹⁻⁴

Authors affiliation:

1. Post-Graduate Course in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
2. Genomic Medicine Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.
3. Service of Medical Genetics, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.
4. Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
5. Cluster of Molecular Carcinogenesis, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France
6. Department of Statistics, Mathematics Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
7. Center of Experimental Research, Albert Einstein Research and Education Institute, Sao Paulo, Brazil.
8. Department of Immunology, Biomedical Science Institute, University of São Paulo, São Paulo, Brazil.
9. Post-graduate course in Epidemiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
10. Nucleo Mama Porto Alegre and Associação Hospitalar Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil.
11. Post-Graduate Course in Gastroenterology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Running head: Hereditary breast cancer in a Brazilian Population-Based Cohort Study

Correspondence to: Patricia Ashton-Prolla, MD, PhD, FACMG
Serviço de Genética Médica, Hospital de Clinicas de Porto Alegre,
Rua Ramiro Barcelos 2350 – Porto Alegre, RS, Brazil
CEP 90035-903
Telephone number: + 55 51 2101 8011
Fax number: + 55 51 2101 8010
Email: pprolla@hcpa.ufrgs.br

ABSTRACT

In Brazil, breast cancer is a serious public health problem due to its high incidence and mortality rates. In this study, we investigated the prevalence of hereditary breast cancer syndromes in a population-based cohort of women attending primary health care units in Brazil's southernmost capital, Porto Alegre. All women included in this cohort were submitted to a questionnaire about family history (FH) of breast, ovarian and colorectal cancer. Those with a positive FH were invited for genetic cancer risk assessment (GCRA). If the pedigree analysis resulted in the identification of criteria suggestive of the hereditary breast cancer (HBC) phenotype, genetic testing was offered to the family, including mutation analysis for the breast cancer predisposition genes *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, and *CHEK2*. Of 902 women submitted to GCRA, 214 (23.7%) had pedigrees suggestive of HBC (183 families). Fifty of the 183 families underwent genetic testing: 18 and 40 for *BRCA1/BRCA2* and *TP53* germline mutations, respectively; 7 were screened for the *CHEK2* 1100delC mutation. For *BRCA* genes, DHPLC mutation screening and sequencing of the resulting variants plus long-range PCR to identify *BRCA1* gene rearrangements were performed. No deleterious mutations or rearrangements were identified. In the 40 families with LFL criteria, the germline mutation R273C was found in one family. The *CHEK2*1100delC deletion was found in one of the seven families with criteria for hereditary breast and colorectal syndrome. In spite of the relatively strict inclusion criteria, which aimed at testing families at high risk for HBC syndromes and the comprehensive testing approach used, the risk posed to most of these families remains unexplained. To our knowledge this is the first report of the prevalence of HBC phenotypes and germline mutations in corresponding breast cancer predisposition genes in a sample of at-risk individuals identified in a community-based cohort in South America.

Key words: Breast cancer predisposition syndrome, hereditary breast cancer, genetic cancer risk assessment.

INTRODUCTION

Breast cancer is a significant health care problem worldwide. In Latin America, it was not considered a significant health concern three decades ago [1]. Since then, epidemiological and demographic transitions have led to increased exposure to risk factors for cancer in general, and for breast cancer in particular. As a result, Latin America shows a superposition of cancers that are frequent in industrialized countries (breast, lung, prostate, colon) with those more frequently diagnosed in developing countries (cervix, esophagus, oral cavity, bladder, liver) [2]. The increase in breast cancer incidence may also reflect lifestyle and reproductive changes, such as a progressive decrease in the number of pregnancies, dietary changes and increased prevalence of overweight [3]. In Brazil, breast cancer-related mortality is still increasing, and this trend is likely a consequence of poor access to mammographic screening programs and frequent diagnoses in advanced stages of the disease [4-9].

Brazil is the largest and most populated country in Latin America and it is ethnically heterogeneous [10]. In comparison to national figures, Rio Grande do Sul, the southernmost State, has about 1.7 times higher breast cancer incidence and mortality rates. In addition, the disease is the first cause of death by cancer in Brazilian women of all ages, especially in young women, under the age of 50 years [8, 9, 11].

An estimated 5-10.0% of all breast cancers are hereditary, i.e. caused by germline mutations in high-penetrance cancer predisposition genes [12]. Of these, the more important are the *BRCA1* (MIM#113705) and *BRCA2* (MIM#600185) tumor suppressor genes [13, 14], which are associated with the hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) syndrome. Lifetime risks of breast and ovarian cancer are as high as 60 and 30-40%, respectively, among US women with germline mutations in these genes [15, 16]. To date,

over 3.000 distinct germline mutations, polymorphisms and sequence variants have been described in *BRCA1* and *BRCA2*, spread throughout the coding region of both genes (*Breast Cancer Information Core* - BIC) [17]. Most are point mutations, small insertions or deletions. However, large genomic deletions and duplications involving one or more exons of *BRCA1*, and less commonly, *BRCA2*, have been reported in recent years [18-20]. Most of these mutations are caused by recombination events involving *Alu* repeats that are particularly numerous in the *BRCA1* locus [21]. The proportion of genomic rearrangements over all *BRCA1* gene mutations in HBOC families seems to be population-dependent varying from 2% in a series of American families [22] to 36% in Dutch patients [23].

Besides *BRCA1* and *BRCA2*, inherited mutations in other tumor suppressor genes also increase the risk for breast cancer and other tumors. Germline mutations in the *CHEK2* gene are associated with a modest increase in the risk of breast and colorectal cancer in the hereditary breast and colon cancer syndrome (HBCC) [24]. Mutations in *PTEN* are associated with an increased risk for breast and thyroid cancer (among other tumors) in individuals with Cowden's syndrome [25, 26]. In addition, inherited mutations of *TP53* are associated with an increased risk for breast cancer and several other tumors in families with the Li-Fraumeni Syndrome (LFS) and its variant forms collectively called Li-Fraumeni-*like* syndrome (LFL) [27-29].

In this study, we analyzed a population-based cohort of women recruited from primary health care units in Porto Alegre and referred to genetic cancer risk assessment (GCRA) if they had a positive family history for breast, ovarian and/or colorectal cancer. Those women with pedigree suggestive of an hereditary breast cancer predisposition syndrome were offered genetic testing for germline mutations in one or more of the main breast cancer predisposition genes (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* and *CHEK2*).

MATERIALS AND METHODS

1. Patient Recruitment

In April of 2004, a large population-based cohort study (the Nucleo Mama Porto Alegre – NMAMA - Cohort) was started in the southernmost capital of Brazil, Porto Alegre, through a partnership of several government, non-profit community-based organizations, universities and private entities. This prospective cohort intends to collect demographic and epidemiological data of a large sample of women and test a model for community-based breast cancer screening in an underserved population [7, 30] in an attempt to ultimately decrease BC mortality rates in this region. The study will prospectively follow women above the age of 15 years who presented within the 24-month-period (April 2004 - March 2006) of enrollment from one of 18 primary health care units (PCUs) in a selected geographic region of Porto Alegre.

Family history of breast, ovarian and colorectal cancer was assessed in all women by a brief questionnaire (basis for the study described elsewhere as the Genetic Cancer Risk Assessment Program of the NMAMA cohort [Palmero et al., manuscript in preparation]). Seven questions of this instrument refer to family history features that have been associated with an increased likelihood of clinically significant *BRCA* mutations and thus, these questions were designed primarily to identify patients at-risk for the HBOC syndrome [31-35]. In addition, one question about FH of breast and/or colon cancer was included due to a previous suggestion of a higher than expected number of families with these tumors in cancer genetic clinics of Porto Alegre [36]. Patients answering positively to at least one of the seven questions were referred to genetic risk assessment in a secondary health care center, the Nucleo Mama Porto Alegre (NMPOA). Genetic evaluation included medical and family histories recorded in detailed pedigrees with information traced as far

backwards and laterally as possible, extending to paternal lines and including a minimum of three generations. Confirmation of the cancer FH was attempted in all cases and pathology and medical records, as well as death certificates, were obtained whenever possible upon specific consent from the patient and/or her family. Lifetime breast cancer risk estimates were obtained using the Claus, Gail, and Tyrer-Cuzick models [37-40]. All pedigrees were reviewed by at least two clinical geneticists to assess presence of criteria for the diagnosis of LFS, LFL, HBCC, Cowden or other cancer predisposition syndromes. Patients fulfilling criteria for a breast cancer predisposition syndrome were offered genetic testing. In addition, for the clinical diagnosis of HBOC syndrome, the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) and American Society of Clinical Oncology (ASCO) criteria were used [41-43]. In addition, prior probabilities of carrying a *BRCA1* or *BRCA2* mutations were determined for each patient using mutation prevalence tables and the modified Couch mutation prediction model [34, 39, 44]. For LFS, the original criteria described by Li and Fraumeni [27] were used; for LFL, pedigrees were classified according to the criteria of Birch [28] and Eeles [29]; for HBCC and Cowden's syndrome, the criteria described by Meijers-Heijboer and Nelen were used respectively [24-26]. Criteria to indicate genetic testing for HBOC were set so as not to miss any of the families at very high risk for germline *BRCA1* and *BRCA2* mutations and included families fulfilling the ASCO criteria [41, 42] and/or who had a prior probability of mutation in a *BRCA* gene of 30.0% or more [34, 39, 44]. Genetic testing included mutation analysis of one or more of the four main breast cancer predisposition genes (*BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, and *CHEK2*). Blood samples were obtained from cancer-affected women and/or their family members after informed consent, depending on accessibility of individuals and

willingness to participate in the study. The study was approved by the Institutional Review Board of the participating centers.

2. Screening for Germline Mutations

2.1. *BRCA1/BRCA2* genes

DNA was isolated from peripheral blood by standard methods [45]. For mutation testing, the entire coding region and flanking intronic sequences were amplified from genomic DNA by polymerase chain reaction (PCR) to yield 300-600 base-pair fragments that were subsequently analyzed by DHPLC. Variants encountered by DHPLC were further sequenced. In order to optimize mutation detection in exon 11 of the *BRCA1* gene and exons 10, 11, 18 and 27 of *BRCA2*, these exons were subdivided into several fragments. PCR was performed using 34 and 42 primer pairs to amplify *BRCA1* and *BRCA2* respectively, in a 50 μ l volume containing 100 μ M dNTPs, 20 μ M of each primer and 100-200 ng of genomic DNA. For all PCRs, 0.2U of a high-fidelity *Taq* DNA polymerase (Amersham Biosciences, Piscataway, USA) was used. Cycling protocols comprised an initial denaturing step at 94°C for 3 min. Thirty-five subsequent amplification cycles as follows: denaturing at 94°C for 1 min and 30 s, annealing for 1 min, with different temperatures according to the exon analyzed and extension at 72°C for 1 min, followed by a final extension at 72°C for 10 min. All of the oligonucleotide primers and corresponding annealing temperatures have been previously described in the literature [46-48].

Mutation screening by DHPLC was carried out using a WAVE MD 4000 DNA Fragment Analysis System equipped with a DNASep™ Cartridge (Transgenomic Inc., Omaha NE, USA) as described elsewhere [48]. Heterozygous profiles were identified by

visual inspection of the chromatograms and putative sequence variants were further analyzed by bi-directional sequencing on a MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) or an ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA) using an independent PCR product. Sequence alterations were declared as causative mutations after comparison with data submitted to the Breast Cancer Information Core (BIC) [17].

Families that fulfilled criteria for HBOC syndrome were also screened for large rearrangements by Long Range PCR as described by Payne et al [21].

2.2 *TP53* gene

Patients fulfilling Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-*like* syndrome criteria [27-29], were screened for *TP53* germline mutations by PCR amplification of genomic DNA followed by DHPLC and/or direct sequencing of the entire coding region and flanking intronic sequences. The same DHPLC screening methodology described above was used. Exons 4-9 were screened by DHPLC followed by sequencing of the variants and exons 2, 3, 10 and 11 were analyzed by direct sequencing as described by Le Calvez et al [49]. For each variant elution profile identified by DHPLC, genomic DNA was reamplified with the original set of primers and the amplicon was sequenced in both directions using the ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Sequence variations were declared as causative mutations after comparison with data submitted to the *TP53* database at the International Agency for Research on Cancer - IARC [50]. All mutations were confirmed by a second, independent analysis.

2.3 *CHEK2* gene

Families with a history of breast and colorectal cancer consistent with the HBCC syndrome phenotype were screened for the *CHEK2* 1100delC mutation, located in exon 10 by PCR amplification followed by direct sequencing. To ensure amplification of the functional copy of *CHEK2* and exclusion of *CHEK2* pseudogenes, a strategy of long-range PCR amplifications with primers designed outside the pseudogene sequences was used as described by Vahteristo et al [51].

RESULTS

1. Sample characteristics

Of all 9234 women included in the NMAMA cohort (Porto Alegre, Brazil), 1286 (13.9%) answered positively to at least 1 of the 7 questions about FH. Those above 18 years (1247) were invited for GCRA. Of the 1247 patients referred to GCRA, 902 (72.3%) effectively participated in the assessment and of these, 214 (23.7%) women from 183 families, fulfilled criteria for one or more of the breast cancer predisposition syndromes (BCPS) considered in our study: 65 fulfilled criteria for HBOC, 122 for LFL and 22 for HBCC syndromes.

None of the patients assessed reported a personal and/or family history suggestive of Li-Fraumeni and Cowden's Syndrome. Detailed information on study design, patient recruitment, and demographic data of the 902 patients seen for GCRA is described elsewhere (Palmero et al., manuscript in preparation). When comparing the 214 women with criteria for a BCPS with the 902 women submitted to GCRA because of a positive FH of cancer, families in the first group had an increased number of cancer-affected

individuals, an increased number of cancer-affected generations and a higher number of cancer-related deaths in first degree relatives ($p < 0.01$).

Of the 214 women with criteria for a BCPS, 64 (29.9%; corresponding to 50 families) decided to continue with the genetic investigation and proceed to germline mutation testing. An additional 54 cancer-unaffected and at-risk patients (25.2%) attempted contact with their cancer-affected relatives to invite them for GCRA but they did not yet schedule an appointment. Twenty-six cancer-unaffected women were incapable of contacting their affected relatives because they were all either not located (8 individuals, 3.7%); or deceased (18 individuals, 8.4%). For 30 (14.0%) of the unaffected at-risk women, the cancer affected relatives refused GCRA and genetic testing and 29 women (13.6%) declined genetic testing. Finally, in 7 patients (3.3%) the cancer diagnoses in the family were not yet confirmed and contact with their relatives is pending this information; and in 4 women that did not proceed to genetic testing (1.9%) the reasons are unknown.

Among the 50 probands tested, the most frequent cancer site was breast, and as expected, the majority of these diagnoses were made before the age of 50 years. Seven families had at least one BC case under age 30 years (4 HBOC, 2 LFL and 1 HBCC) and an additional 16 families had at least one case diagnosed between 30 and 39 years of age (7 HBOC, 8 LFL and 1 HBCC). Only two probands were diagnosed with ovarian cancer (one HBOC and one LFL family). On the other hand, six probands had colorectal cancer (3 LFL and 3 HBCC families). Ten of the 50 probands were cancer unaffected (from 7 LFL families and 3 from families with both HBOC and LFL criteria). However, 4 of them were supposedly obligate carriers by family history. Additional information on cancer site and phenotype among the 50 families studied is summarized in Tables 1 and 2. At least one tumor diagnosis was confirmed by pathology reports, medical records, or death certificates

in 45/50 (90.0%) families. However, confirmation of a sufficient number of cancer diagnoses to affirm with certainty the BCPS phenotype, was only possible in 13 families (26.0%). During the process of genetic testing, two Li-Fraumeni-*like* families that had confirmation of some cancer diagnoses but not in sufficient number to affirm the phenotype with certainty, delivered additional information not confirming several of the previously assumed cancer diagnoses in the families. Thus, although tested for germline *TP53* mutations and showing an aggregate of cancer cases suggestive of LFL, they do not fulfill either Birch or Eeles LFL criteria. (families 163 and 186).

Due to the high frequency of breast cancer diagnoses in the 50 families studied, 14 (28.0%) of them fulfilled criteria for more than one BCPS initially, when testing was indicated and therefore, these families were screened for germline mutations in more than one predisposition gene. Thus, 8 families were tested for *BRCA1/2* and *TP53* germline mutations, 2 families for *BRCA1/2* and *CHEK2* mutations, 3 families for *TP53* and *CHEK2* mutations, and one family was screened for mutations in all four genes (*BRCA1/2*, *CHEK2* and *TP53*). During the process of genetic testing, three families presented additional information of the presumed cancer diagnoses and one of the phenotypes was excluded in each (HBOC in family 681, HBCC in family 284, and LFL in family 186) (Table 2).

2. Mutation detection studies.

2.1 HBOC

Nineteen individuals from 18 families with the HBOC syndrome criteria underwent genetic testing. After DHPLC screening, the PCR products showing variant or dubious profiles were sequenced for confirmation. A total of 183 of 646 (28.3%) and 278 of 798 (34.8%) *BRCA1* and *BRCA2* amplicons were sequenced, respectively. There was a

complete agreement between the results from DHPLC and sequencing for both *BRCA* genes (one example is depicted in Figure 1). In addition, different variant DHPLC profiles of the same amplification product always corresponded to distinct sequence variations.

Sequencing results were compared to data deposited in the BIC database. We identified 12 and 22 sequence variants in *BRCA1* and *BRCA2*, respectively (Table 3). Most of them were previously described and deposited in the BIC database as variants with no clinical significance. We did not detect any known deleterious mutations in the 18 families studied. Screening for large gene rearrangements in *BRCA1* did not show any detectable gene rearrangements (preliminary results).

2.2 LFL

An unexpected high number of families fulfilled criteria for LFL syndrome (122 families, 14.7% of the entire sample [829 families]), including 13 and 119 families fulfilling Birch and Eeles criteria, respectively. Ten families had both Birch and Eeles criteria for LFL. Of the 122 families, 40 underwent genetic testing (3 families with Birch criteria, 8 families with both Birch and Eeles criteria; 1 family with both Eeles 2 and Eeles 1 criteria and 28 families with Eeles 1 criteria). Twelve of these 40 families (30.0%) fulfilled criteria for more than one BCPS – Table 2).

In 21 cases, we were able to analyze exons 4 to 11 of the *TP53* gene, where the vast majority of described mutations are encountered (around 90.0% of all mutations are located between exons 5 to 9) [52]. The remaining samples were submitted to DHPLC and/or complete sequencing of all coding exons of the gene. Well known *TP53* polymorphisms were identified in most of the families and one of them harbored a deleterious germline mutation (Table 4) in exon 8, a C/T transition in codon 273, resulting in the substitution of

an arginine to a cysteine [53] This family fulfilled Eeles-1 criteria for LFL; the proband was diagnosed with a central nervous system (CNS) tumor (astrocytoma) at 61 years of age, and two first-degree relatives were diagnosed with CNS and prostate cancers, after age 70 (Figure 2).

2.3 HBCC

Among the 183 families with a hereditary breast cancer phenotype, 22 fulfilled criteria for HBCC [24], but only 7 of them underwent genetic testing. Interestingly, all of the seven families also fulfilled criteria for a BCPS other than HBCC at inclusion in the study. The common *CHEK2* 1100delC mutation was identified in one of these 7 families (14.3%) with multiple breast cancer diagnoses (proband at age 52 and one relative under age 50 years), colorectal cancer (ages 50 and 68 years), as well as cancer of the lung, throat, endometrium, cervix and uterus (Figure 3).

DISCUSSION

The identification and characterization of genetic alterations in families at high risk for breast cancer predisposition syndromes enables carriers to undertake individualized cancer screening and prevention strategies, thus increasing the likelihood of increased disease-free survival rates.

The aim of this study was to investigate the prevalence of hereditary breast cancer phenotypes and of breast cancer predisposition mutations in Southern Brazil. Although a significant number of families had a pedigree suggestive of hereditary breast cancer, only part of them underwent genetic testing and in only two of the families, a germline mutation was encountered.

For HBOC, although we aimed at selecting patients at a somewhat higher prior probability of mutation than in most studies (average mutation probability between 20-30% using different criteria and prediction models) we did not identify known deleterious germline mutation in any of the 18 families studied. In a recent report of *BRCA* mutation screening in a group of 402 Brazilian breast cancer patients unselected for family history, Gomes et al [54] showed a mutation frequency of 2.3% and a surprisingly high frequency of one of the *BRCA1* Ashkenazi Jewish founder mutations, 5382insC. All women lived in the state of Rio de Janeiro and the frequency of Ashkenazi ancestry in the sample (if any) is not described. In addition, although the average prior probability of mutation in their sample is not clear, one would expect that it was likely less (unselected sample) than the cutoff probability used for offering genetic testing in our report. In another Brazilian study that assessed mutation prevalence in a group of 47 women from Rio de Janeiro, Lourenço et al [55], using more strict inclusion criteria, found that 7 (15.0%) were mutation carriers; again, 5382insC was one of the most common mutations encountered, and none of the patients acknowledged Ashkenazi origin. Since both of these studies were conducted in the Brazilian State of Rio de Janeiro, it is possible that *BRCA* mutation prevalence in women from other Brazilian states, such as ours, is lower. Indeed, *BRCA* mutation prevalence is probably heterogeneous, not only depending on criteria adopted for inclusion in a given study, but also related to specific features of different populations. For example, in a Finnish study of 128 HBOC patients, Laurilla et al [56] did not identify any *BRCA1* mutation after sequencing the entire coding region of the gene. Finally, the effects of a small sample size and less than optimal confirmation of the cancer diagnoses in many of the families studied must also be considered. The negative findings of the Long-Range PCR for gene rearrangements in *BRCA1* could also be related to small sample size. One

complicating factor is that the prevalence of such rearrangements in South American HBOC patients is largely unknown and studies in other populations report a highly variable prevalence of such rearrangements. In the Dutch, for example, large genomic rearrangements constitute 36.0% of the mutations detected in *BRCA1* [23]. On the other hand, a study of 82 Finnish HBOC families did not identify any *BRCA1* or *BRCA2* germline rearrangement [57].

In spite of the large number of sequence variants identified in the *BRCA1/BRCA2* genes worldwide, many of them are still classified as variants of unknown significance (VUS) (around 50% of the BIC entries; and around 10% of the results reported by Myriad Genetic Laboratories, Salt Lake City, U.S.A.). In this study, we found 1 and 5 VUS in *BRCA1* and *BRCA2*, respectively. We also identified 17 variants without clinical significance and 11 novel sequence variants, most of them present in more than one family. Further characterization of these novel variants is imperative and is underway. The first strategy will be familial studies, where we will test as many cancer-affected and -unaffected relatives as possible in an attempt to define segregation of the genotype in association with phenotype. Additional studies, such as multiple alignments of the protein sequences to determine the degree of sequence conservation through the evolutionary history [58], and hypothetical analyses of protein conformational changes related to these variants are underway. Finally, for some of the intronic mutations, RNA studies will be conducted. All efforts will be made to further characterize variants of unknown significance, especially if they were not described previously. As cited by Arnold et al [59], the temptation to implicate a missense mutation that occurs at low frequency as a potential functional lesion must be tempered by the possibility that the variant may exist more frequently in another population and thus be considered mere polymorphism.

The finding of a high number of pedigrees suggestive of the LFL phenotype in our sample was surprising. First, because the questionnaire used to screen women from the general population for GCRA, was originally designed to identify the HBOC phenotype, and second because Li-Fraumeni syndrome and its variants are always considered rare cancer predisposition syndromes with only a few families described worldwide. In the 40 probands studied, only one, from one of the 37 families with Eeles criteria for LFL, harbored a deleterious *TP53* germline mutation. This family was included in the study due to an initial report of ovarian cancer in a first-degree relative of the proband. During GCRA, this relative was found to have cancer of the uterine cervix; other tumors were identified in additional relatives and the phenotype of LFL syndrome became apparent (Figure 2). Of note, this family has not one case of breast cancer. It is important to remember that a significant number of cancer diagnoses in the LFL families could not be confirmed and this may explain why the mutation prevalence for LFL-Eeles families encountered here was much lower than described previously (8.0%) [60]. Interestingly, in the single published mutation study of Brazilian LFL families (including 10 families from the State of Rio Grande do Sul), the mutation prevalence for LFL Eeles 1 and Birch families was much higher (23.1% and 61.5%, respectively). Again, our findings may be related to relatively small sample sizes and to the presence of lower-risk LFL families, some of them not having a sufficient number of cancer diagnoses confirmed to allow certainty about the BCPS phenotype. Considering the high lifetime risk for breast cancer and other tumors, associated with the SLF/LFL phenotype [61], and the surprisingly high number of families identified, most of them not harboring mutations in exons 4-11, additional investigations must be conducted to determine the reasons for these observations.

Further studies should include screening for *TP53* large gene rearrangements, promoter and intronic mutations, and mutations in other *TP53*-related genes such as *MDM2* [2, 62].

Finally, screening for the common *CHEK2* 1100delC mutation in seven HBCC families resulted in the identification of one mutation-positive family corresponding to a mutation prevalence of about 14.0%, (comparable to the 18.0% previously described in the literature) [24]. With the small sample size analyzed, these results could merely be related to chance, however they go along with other previous observations of a higher than expected number of colon cancers in the families of breast-cancer affected women undergoing GCRA [36].

Two major limitations can be identified in our study. First, the relatively small sample size, which we feel is not entirely unexpected. The limited acceptance of genetic testing that we faced throughout this study may be explained by cultural aspects of the population, low literacy of the majority of women counseled and this in turn could be associated with limited understanding of the benefits and implications of testing. Study design may also have influenced genetic testing acceptance. The women included in this study were recruited from their primary health care units and were not originally concerned with their genetic risk for cancer; or, if they were concerned, they did not seek genetic counseling directly. Furthermore, since this was a population-based sample, most of our probands were cancer-unaffected individuals from at-risk families for whom genetic testing required participation of at least one willing and alive cancer-affected relative. Another potential concern is that only a proportion of cancers in probands and/or relatives was confirmed, and therefore, there may be misclassifications of cancer site, tumor type as well as age at tumor diagnosis. Confirmation of cancer diagnoses in relatives, often distant ones, is usually challenging and in this population it may be particularly difficult, since

many of them have lost contact with their families. Cancer registries unfortunately do not cover all cancer occurrences in the State, especially not for occurrences before the past ten years, and have often incomplete or unconfirmed data. In addition, we are dealing with an underserved population, with high rates of poverty and unemployment, difficult access to proper health care, and less education, among other socioeconomic disparities. All of these factors together may also contribute to poor understanding about increased risk and the existence and benefits of risk reduction strategies and consequent reduced motivation for genetic testing [63]. Finally, the genetic counseling process that was an integral part of the genetic cancer risk assessment and included in depth discussion of the meaning and identification of hereditary breast cancer, as well as benefits and limits of genetic testing, may have also contributed to favor an educated decision and choice towards both, accepting and declining genetic testing for different reasons. The multidisciplinary approach used in the present study, that involved the participation of clinical geneticists, mastologists, radiologists, family therapists, biologists and nurses certainly contributed to ensure a comprehensive genetic cancer risk assessment to each patient.

In spite of the use of relatively strict inclusion criteria for testing of some BCPS (such as HBOC) and less strict criteria for others (LFL) and the comprehensive testing methodology used (using methods to detect different types of alterations, like point mutations and rearrangements), the high risk posed to most of the families described here remains unexplained. Even considering the limitations highlighted before, this study raises several questions about the importance of genetic factors in determining the high breast cancer incidence and mortality rates in Southern Brazil and the acceptability of genetic testing in this population. Additional investigations, as discussed above, will be offered to all families studied here to increase the likelihood of identifying causative factors for their

cancer phenotypes. Continued efforts will be made to confirm as many cancer diagnoses as possible in these families. However, expanded studies, on a larger sample should be conducted to verify if indeed the prevalence of germline mutations in common breast cancer predisposition genes is that low in this population. If indeed it is, we may have to revise criteria for genetic testing in this population and thoroughly investigate the contribution of different and/or novel high penetrance genes or the influence of multiple, more prevalent genetic variants of lower penetrance.

Table 1. Cancer phenotype of the 50 BCPS families submitted to genetic testing

BCPS Criteria	Number of families*	Average age at BC dx (years)	Number of cancer diagnoses/family	Occurrence of Childhood tumors	Two or more tumors diagnosed < 45ys	Number of cancer-affected generations
	n	Mean (±SD)	Mean (±SD)	n (%)	n (%)	Mean (±SD)
Criteria for one BCPS						
HBOC	18	45.2 (11.9)	6.7 (3.7)	2 (1.6)	47 (38.8)	2.7 (0.9)
LFL	40	48.3 (12.9)	6.1 (3.3)	12 (4.9)	71 (28.9)	2.8 (0.9)
HBCC	7	51.8 (15.6)	7.6 (1.8)	1 (1.9)	12 (22.6)	2.7 (0.5)

(*) One family may fulfill more than one criterion. For a detailed description of the families with multiple criteria, refer to Table 2

Table 2 – Detailed description of the 14 families that at inclusion were identified as having criteria for more than one BCPS. PR = pathology reports; DC = death certificates; MR = medical records and/or reports (Proband refers to individual tested in the family)

Family #	Criteria	# cancer diagnoses	# diagnoses confirmed (1)	Cancer-affected proband	Proband cancer site	Other cancer diagnoses relatives (by site)	Sufficient data to affirm proposed criteria by phenotype
6	LFL (Birch/Eeles 1) + HBOC	7	2	Yes	Colon (F-40)	breast (F-38, F-47, F-bil39), CNS (F-38, M-50) , lung (M-64)	NO
25	LFL (Eeles 1) + HBCC	9	1	Yes	Colon (F-72)	breast (F-60), colon (F-35, M-13), uterine (50), prostate (ND, ND), pancreas (M-ND), esophageal (M->70)	NO
101	LFL (Eeles 1) + HBOC	Mat=3; Pat=3	0	No	NA	Mat= breast (F-38, F-46), gastric (M-70); Pat= sarcoma (M-15), leukemia(M-49), gastric (F-ND)	NO
103	LFL (Eeles 1) + HBCC	8	1	Yes	Bil Breast (F-65)	breast (F-36, F-82), gynecologic (49), lung (F-ND), leukemia (M-ND), colon(M-ND), unknown (M-ND)	NO
186 (2)	LFL (Birch) + HBOC	4	0	No	NA	breast (F-35, F-40, F-40), kidney (M-5)	NO
284 (3)	LFL (Birch/Eeles 1) + HBCC	5	0	Yes	Colon (F-71)	breast (F-50), colon (F>50), CNS (M>70), gastric (M-41)	NO
439	HBOC + HBCC	6	2	Yes	Bil Breast (F<50)	breast (F-bil39, F-70) , uterine (>30), colon (M-60), ovarian (70)	YES
442	LFL (Eeles 1) + HBOC	18	1	Yes	gastric (F-39), ovarian(42)	breast (F15, F40, F21, FND, FDN, FND, FND, FND, FND, FND), gastric (FND), prostate (ND), leukemia (M48), kidney (FND), unknown (F64, MND)	NO
520	LFL (Birch) + HBOC	9	5	Yes	Bil Breast (F-42)	Breast (F49, F38, F<52, Fbil<55) , bone (M31), esophageal (M50) , colon (F>60), leukemia (M8)	YES
552 (4)	LFL (Eeles 1) + HBOC + HBCC	Mat=10; Pat=2	1	Yes	Breast (F-38)	Mat= breast (F36, F62, F25, FND), colon (M>50, M<48, MND), ovarian (ND), uterine (ND)/ Pat= brain (MND), prostate (ND)	NO
554	LFL (Eeles 1) + HBOC	4	2	Yes	Breast (F-44), melanoma (F-39)	ovarian (63, 60)	NO
590	LFL (Eeles 1) + HBOC	8	3	Yes	Breast (F-49)	breast (F53), thyroid (F36) , ovarian (28), gastric(F40), throat (M50), nose (FND), unknown (FND)	NO
681(5)	HBOC + HBCC	9	8	Yes	Breast (F-52)	lung (M62), endometrial (64), uterine (41, <50), breast (F<50), colon (M50, F68), throat (M<50)	YES for HBCC
736	LFL (Eeles 1) + HBOC	10	0	No	NA	pancreas (F25, M50), uterine (32, 49), ovarian (32, 49, 36), colon (F40), bil breast (F47), lung (F60)	NO

(1) Includes confirmation of cancer site and/or type by pathology reports, death certificates and/or review of medical records.

(2) One of the cancer diagnoses was not confirmed posteriorly, and therefore this family, although tested for *TP53* mutations, does not fulfill criteria for LFL (Birch) as thought initially

(3) One of the cancer diagnoses was not confirmed posteriorly, and therefore this family, although tested for the *CHEK2* 1100delC mutation, does not fulfill criteria for HBCC as thought initially

(4) Family meets criteria for HBOC and HBCC in the maternal side and for LFL (Eeles12) in the paternal lineage of the proband's.

(5) One of the cancer diagnoses was not confirmed posteriorly, and therefore this family, although tested for BRCA1/2 mutations, does not fulfill criteria for HBOC as thought initially

Mat= maternal side; Pat= Paternal side; Bil=bilateral; F=female; M=male; CNS= central nervous system; ND= non determined. In bold: diagnosis confirmed by pathology reports or death certificates.

Table 3. *BRCA1* and *BRCA2* sequence variants identified in the 18 families fulfilling HBOC syndrome criteria.

Gene and Localization	Sequence Variation	Clinical Significance	Number of Affected Families*	Number of Times Recorded in BIC Database	Contact and Creation Date in BIC Database
<i>BRCA1</i>					
<i>BRCA1</i> IN 7	IVS7-34C/T	No	2	9	Spitzer(12/04/1999)
<i>BRCA1</i> EX11	Q356R	Unknown	3	82	Spitzer (12/04/1999)
<i>BRCA1</i> EX11	2201C/T	No	15	13	Khoo (16/06/2000)
<i>BRCA1</i> EX11	2430T/C	No	10	25	Simard (01/01/1997) Newman (01/01/1997)
<i>BRCA1</i> EX11	P871L	No	15	26	Simard (01/01/1997) Szabo (01/01/1997)
<i>BRCA1</i> EX11	E1038G	No	14	37	Simard; Szabo; Newman; Khoo (01/01/1997)
<i>BRCA1</i> EX11	K1183R	No	16	33	No information
<i>BRCA1</i> EX11	K1208T	Not Described	13	NA	NA
<i>BRCA1</i> EX13	4427T/C	No	9	35	Simard (01/01/1997) Khoo (01/01/1997)
<i>BRCA1</i> EX16	S1613G	No	10	35	Simard; Khoo; Ellis; Newman (01/01/1997)
<i>BRCA1</i> IN17	IVS17+44A/T	Not Described	5	NA	NA
<i>BRCA1</i> IN18	IVS18+66G/A	No	13	9	Simard (01/01/1997)
<i>BRCA2</i>					
<i>BRCA2</i> 5'UTR	203G/A	No	9	12	Nunes (22/06/1998)
<i>BRCA2</i> IN1	IVS1-7T/A	Not Described	1	NA	NA
<i>BRCA2</i> EX4	D129N	Not Described	10	NA	NA
<i>BRCA2</i> IN4	IVS4-89T/C	Not Described	4	NA	NA
<i>BRCA2</i> IN6	IVS6-49A/C	Not Described	4	NA	NA
<i>BRCA2</i> EX10	N289H	No	8	13	Friedman; Osório; Ehlers-Fahsold (13/11/1997)
<i>BRCA2</i> EX10	N289Y	Not Described	6	NA	NA
<i>BRCA2</i> IN10	IVS10-74T/C	Not Described	9	NA	NA
<i>BRCA2</i> EX11	2457T/C	No	5	3	Oefner (30/11/1998)
<i>BRCA2</i> EX11	3624A/G	No	10	8	Nunes (22/06/1998)
<i>BRCA2</i> EX11	Q1181P	Not Described	2	NA	NA
<i>BRCA2</i> EX11	D1699G	Unknown	1	1	Myriad (23/12/2003)
<i>BRCA2</i> EX11	T1915M	Unknown	1	7	No information
<i>BRCA2</i> EX11	R2108H	Unknown	1	125	Myriad (13/11/1997)
<i>BRCA2</i> EX14	7470A/G	No	9	10	Friedman (13/11/1997)
<i>BRCA2</i> IN14	IVS14+3delA	Not Described	1	NA	NA
<i>BRCA2</i> EX15	V2527L	Not Described	5	NA	NA
<i>BRCA2</i> IN16	IVS16-14T/C	No	15	15	Friedman (13/11/1997)
<i>BRCA2</i> EX18	G2724V	Unknown	6	1	Myriad (12/04/1999)
<i>BRCA2</i> EX20	E2856A	No	2	185	Myriad (13/11/1997)
<i>BRCA2</i> EX22	A2951T	No	3	40	Myriad (13/11/1997)
<i>BRCA2</i> EX22	K2950N	Unknown	1	111	Myriad (13/11/1997)

NA= non applicable; *number of families described in our study with the variation

Table 4. *TP53* sequence variants identified in the 40 families fulfilling LFL syndrome criteria

Gene and Localization	Sequence Variation	Clinical Significance	Number of affected families
<i>TP53</i>			
IN2	11827 (rs1642785)	Polymorphism	10*
IN3	11951 (ins16bp)	Polymorphism	8*
EX4	P36P (rs1800370)	Polymorphism	2
EX4	R72P (rs1642785)	Polymorphism	16
IN7	14201 (rs12951053)	Polymorphism	3
EX8	R273C	Deleterious germline Mutation	1
IN9	14766 (rs1800899)	Polymorphism	1

* *TP53* Introns 2 and 3 were analyzed in 21 families only.

bp = base pairs

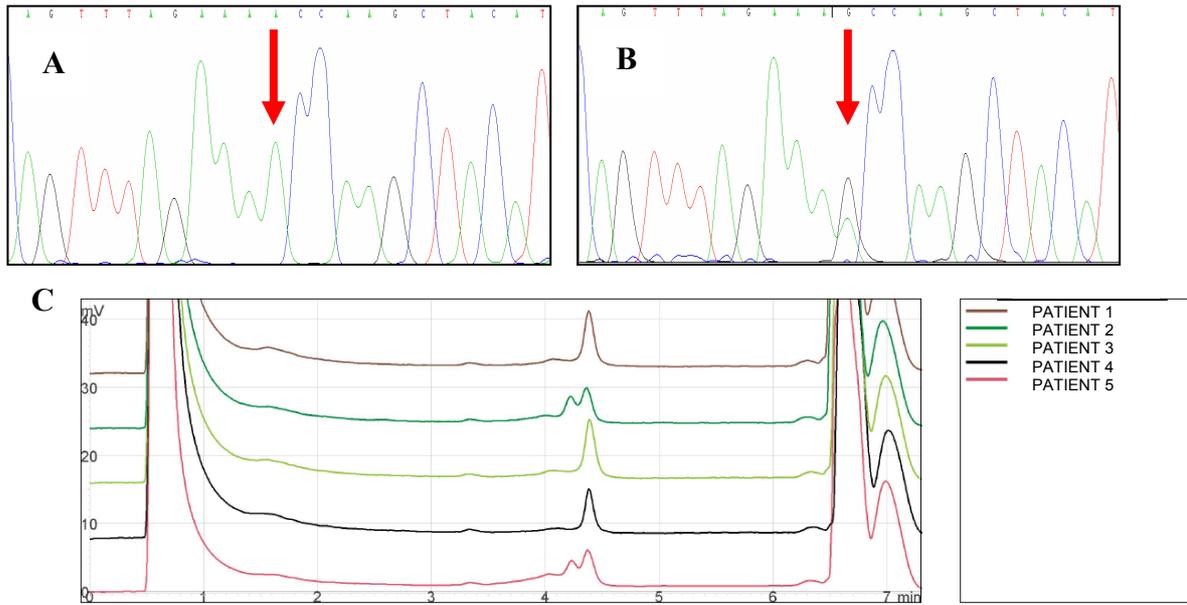
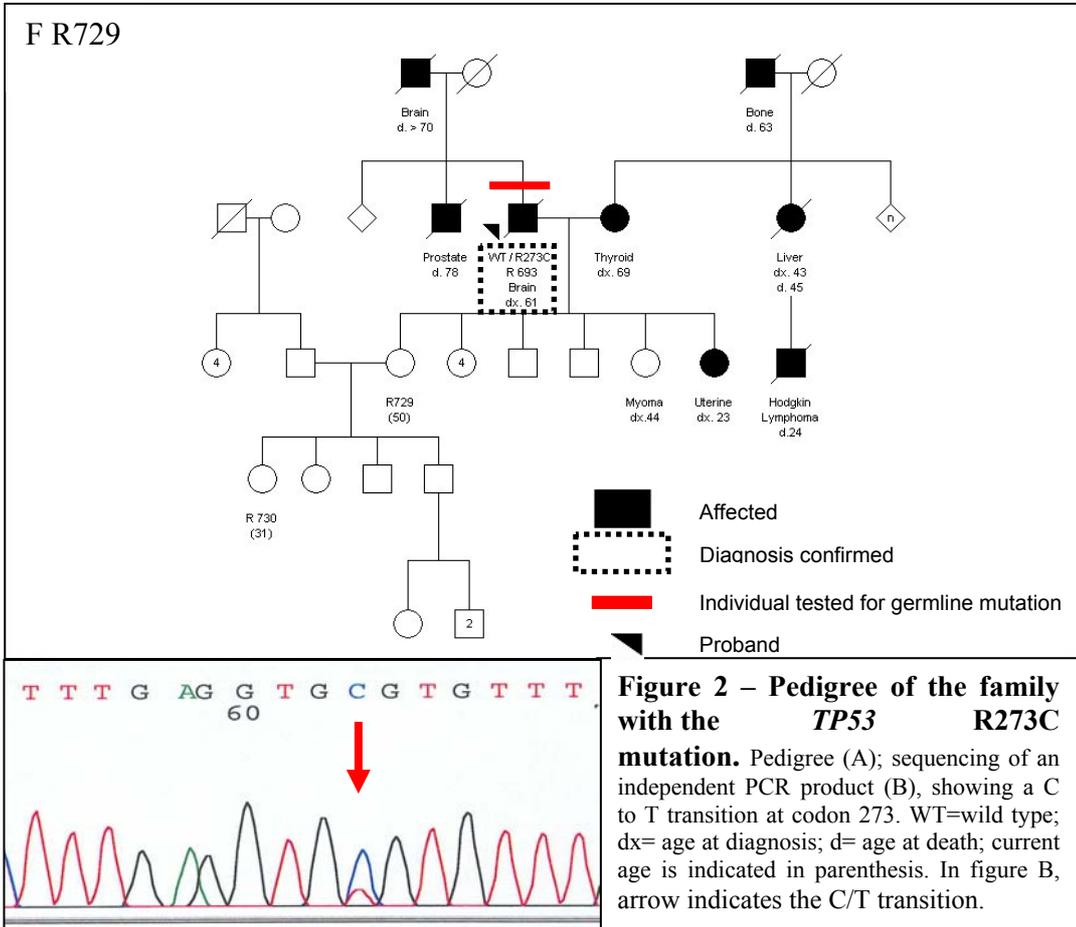
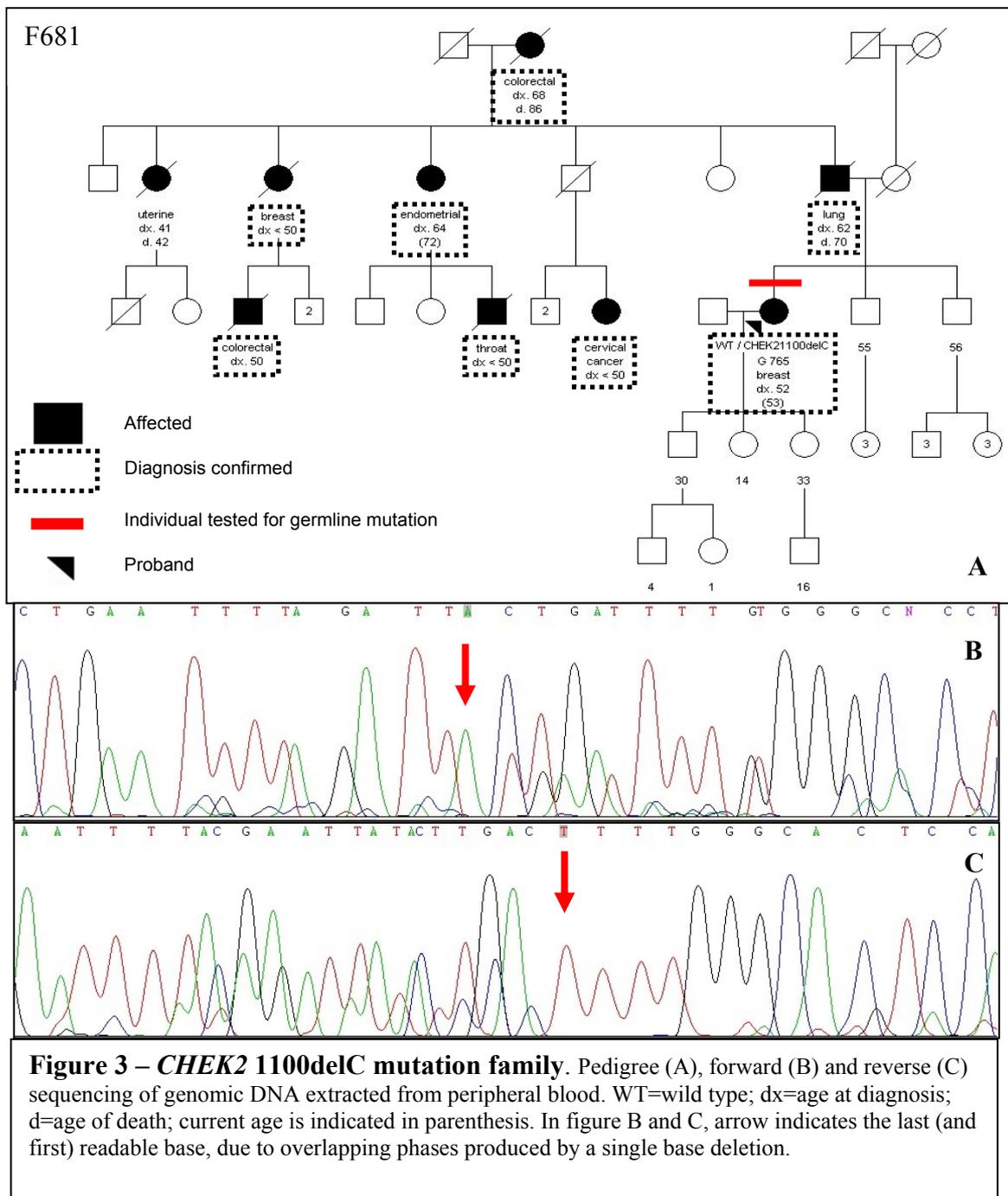


Figure 1 – Detection of *BRCA2* sequence variants by DHPLC and sequencing.
 A) Normal sequence (Patient 1) and B) mutant sequence (Patient 2) at position 3624 of *BRCA2* exon 11. C) DHPLC chromatographic profiles for the same amplicons. Patients 3 and 4 are normal and Patient 5 has the same sequence variation (3624A/G).





Acknowledgements: The Nucleo Mama (NMAMA) Cohort, from which the patients derive, is maintained by Associação Hospitalar Moinhos de Vento, in a partnership with Instituto da Mama do Rio Grande do Sul and the Municipal Health Agency from Porto Alegre. The authors are indebted to Patricia Schneider, Hermides Pinto Junior and Andre Muller for their expert technical assistance and Karen Barbosa and Diego Pasetto for their assistance with data managing, patient recruitment and pedigree organization. The authors are indebted to Cristina Brinkmann de Oliveira Netto, Ana Cecília Mano de Azevedo, Ademar Bedin Júnior, Luciane Poletto Antunes, Juliana Zignani, Fávio Marcel Telis Gonzalez, Luciano Artico, and the NMPOA team for their help with the recruitment, evaluation and follow-up of the patients included in this study. This study was supported by a grant from Susan G. Komen for the Cure (POP0403033), and in part by grants from Fundo de Incentivo à Pesquisa –FIPE, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (# 04-170) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - PRODOC grant number 00202/03-7). El Palmero was supported in part by grants from The International Agency for Research in Cancer (IARC) and CNPq (process number 203732/2005-7). The authors have no potential conflict of interest to disclose.

REFERENCES

1. Robles S, Galanis E (2002) Breast cancer in Latin America and the Caribbean. *Rev Panam Salud Publica* 11(3):178-185
2. Gallo CV, Mendonça GAS, Moraes E et al (2005) TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. *Mutat Res* 589:192-207
3. Leal MC, Gama SG, Frias P et al (2005) Healthy lifestyles and access to periodic exams among Brazilian women. *Cad Saúde Publica* 21(Suppl):78-88
4. Silveira GPG, Motta NW, Lago S (2000) Câncer de mama. *Revista Médica da Santa Casa* 11:1928-1930
5. Bosetti C, La Vecchia C (2005). Cancer mortality in Latin America: implications for prevention. *Rev Panam Salud Publica* 18(1):1-4.
6. Gonçalves ATC, Jobim PFC, Vanacor R et al (2007) Câncer de Mama: Mortalidade Crescente na Região Sul do Brasil entre 1980 e 2002. *Cad Saúde Pública (FIOCRUZ)* (in press)
7. Smith RA, Caleffi M, Albert U-S et al (2006) Breast cancer in limited-resource countries: early detection and access to care. *Breast J* 12(Suppl 1):S16-S26
8. Website of the National Institute of Cancer (2007) <http://www.inca.gov.br>. Cited 18 June 2007
- 9 Website of the Government of Rio Grande do Sul (2007) <http://www.rs.gov.br>. Cited 8 June 2007
10. Gaspar PA, Hutz MH, Salzano FM et al (2001) TP53 polymorphisms and haplotypes in South Amerindians and Neo-Brazilians. *Ann Hum Biol* 28:184-194

11. Website of the Government of Rio Grande do Sul (2007) <http://www.datasus.gov.br>. Cited 18 June 2007
12. King MC, Marks JH, Mandell JB (2003) Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 302:643-646
13. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D et al (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility: gene BRCA-1. *Science* 266:66-71
14. Wooster R, Bignell G, Lancaster J et al (1994) Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2 to chromosome 13q 12-13. *Science* 265:2088-2090
15. Cass I, Baldwin RL, Varkey T et al (2003) Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. *Cancer* 97:2187-2195
16. Antoniou AC, Pharoah PD, Easton DF et al (2006) BRCA1 and BRCA2 cancer risks. *J Clin Oncol* 24(20):3312-3313
17. Breast Cancer International Core database (2007). Available at <http://research.nhgri.nih.gov/bic>. Cited by 10 May 2007
18. Preisler-Adams S, Schonbuchner I, Fiebig B et al (2006) Gross rearrangements in BRCA1 but not BRCA2 play a notable role in predisposition to breast and ovarian cancer in high-risk. *Cancer Genet Cytogenet* 168: 44–49
19. Thomassen M, Gerdes AM, Cruger D et al (2006) Low frequency of large genomic rearrangements of BRCA1 and BRCA2 in western Denmark. *Cancer Genet Cytogenet* 168(2):168-171.
20. Gutierrez-Enriquez S, de La Hoya M, Martinez-Bouzas C et al (2007) Screening for large rearrangements of the BRCA2 gene in Spanish families with breast/ovarian cancer. *Breast Cancer Res Treat* 103(1):103-107

21. Payne SR, Newmann B, King M (2000) Complex germline rearrangement of BRCA1 associated with breast and ovarian cancer. *Genes Chromosom Cancer* 29:58-62
22. Hendrickson BC, Judkins T, Ward BD et al (2005) Prevalence of five previously reported and recurrent BRCA1 genetic rearrangement mutations in 20,000 patients from hereditary breast/ovarian cancer families. *Genes Chromosom Cancer* 43:309–313
23. Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M et al (1997) BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat Genet* 17:341–345
24. Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H et al (2003) The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. *Am J Hum Genet* 72:1308–1314
25. Nelen MR, Padberg GW, Peeters EAJ et al (1996) Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nat Genet* 13:114-116
26. Eng C (1997) Cowden syndrome. *J Genet Counseling* 6:181-191
27. Li FP and Fraumeni JF Jr (1969) Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 71(4):747-752.
28. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ et al (1994) Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 54:1298-1304
29. Eeles RA (1995) Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv* 25:101-124
30. Caleffi M, Ashton-Prolla P, Weber B et al (2005) Breast cancer screening in 10,000 women of an underserved population in South Brazil: The NMAMAPOA cohort. *J Clin Oncol* 23(16S):877s
31. Couch FJ, DeShano ML, Blackwood A et al (1997) BRCA1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 336:1409-1415

32. Shattuck-Eidens D, Oliphant A, McClure M et al (1997) BRCA1 sequence analysis in women at high risk for susceptibility mutations: risk factors analysis and implications for genetic testing. *JAMA* 278:1242-1250
33. Srivastava A, McKinnon W, Wood ME (2001) Risk of breast and ovarian cancer in women with strong family histories. *Oncology (Williston Park)* 15:889-902
34. Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE et al (2002) Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. *J Clin Oncol* 20:1480-90.
35. Nelson HD, Huffman LH, Rongwei F et al (2005) Genetic risk assessment and BRCA mutation testing for breast and ovarian cancer susceptibility: systematic evidence review for the U.S. preventive services task force. *Ann Intern Med* 143:362-379
36. Palmero EI, Ashton-Prolla P, da Rocha JC et al (2007) Clinical characterization and risk profile of individuals seeking genetic counseling for hereditary breast cancer in Brazil. *J Genet Couns* 16(3):363-371
37. Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD et al (1996) The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer* 77:2318-2324
38. Gail MH, Brinton LA, Byar DP et al (1989) Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* 81:1879-1886
39. Domchek SM, Eisen A, Calzone K et al (2003) Application of Breast Cancer Risk Prediction Models in Clinical Practice *J Clin Oncol* 21:593-601
40. Tyrer J, Duffy SW, Cuzick J (2005) A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Stat Med* 23:1111-1130. Erratum in: *Stat Med* (2005) 24(1):156

41. ASCO Subcommittee on Genetic Testing for Cancer Susceptibility (1996) Statement of the American Society of Clinical Oncology: Genetic Testing for Cancer Susceptibility. *J Clin Oncol* 14:1730-1736
42. Ford D, Easton DF, Bishop T et al (1994) Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Lancet* 343:692-695
43. Website of the National Comprehensive Cancer Network (2007) <http://www.nccn.org.br> Cited 18 June 2006
44. Domchek SM, Blackwood MA, Tweed AJ et al (2004) University of Pennsylvania BRCA1/BRCA2 prediction model. In: Abstract of the Cancer Risk Prediction Models: A Workshop on Development, Evaluation, and Application, Washington, D.C. 20-21 May 2004
45. Website of the Life Sciences Company (2007) <http://www.life-sciences.com.br> Cited by 4 April 2007
46. Friedman LS, Ostermeyer EA, Ssabo CI et al (1994) Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet* 8:399-404
47. Friedman LS, Gayther SA, Kurosaki T et al (1997) Mutation Analysis of BRCA1 and BRCA2 in a Male Breast Cancer Population. *Am J Hum Genet* 60:313-319
48. Karl H Hecker (ed) (2003) Genetic variance detection: nuts and bolts of DHPLC in genomics. DNA Press, Germany
49. Le Calvez F, Ahman A, Tonisson N et al (2005) Arrayed primer extension resequencing of mutations in the TP53 tumor suppressor gene: comparison with denaturing HPLC and direct sequencing. *Clin Chem* 51(7):1284-1287

50. Website of the International Agency for Research on Cancer, TP53 database (2007)
<http://www-p53.iarc.fr> Cited 8 January 2007
51. Vahteristo P, Tamminen A, Karvinen P et al (2001b) p53, Chk2, and Chk1 genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of Chk2 in inherited cancer predisposition. *Cancer Res* 61:5718–5722
52. May P, May E (1999) Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 18:7621-7636
53. Eeles RA, Warren W, Knee G et al (1993) Constitutional mutation in exon 8 of the p53 gene in a patient with multiple primary tumors: molecular and immunohistochemical findings. *Oncogene* 8(5):1269-1276
54. Gomes MCB, Costa MM, Borojevic R et al (2007) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil. *Breast Cancer Res Treat* 103:349–353
55. Lourenço JJ, Vargas FR, Bines J et al (2004) BRCA1 mutations in Brazilian patients. *Genet Mol Biol* 4:500-504
56. Laurilla E, Syrjakoski K, Holli K et al (2005) Search for large genomic alterations of the BRCA1 gene in a Finnish population. *Cancer Genet Cytogenet* 163(1): 57-61
57. Lahti-Domenici J, Rapakko K, Paakkonen K et al (2001) Exclusion of large deletions and other rearrangements in BRCA1 and BRCA2 in Finnish breast and ovarian cancer families. *Cancer Genet Cytogenet* 129:120–123
58. Abkevich V, Zharkikh A, Deffenbaugh AM et al (2004) Analysis of missense variation in human BRCA1 in the context of interspecific sequence variation. *J Med Genet* 41(7):492-507
59. Arnold N, Peper H, Bandick K et al (2002) Establishing a control population to screen for the occurrence of nineteen unclassified variants in the BRCA1 gene by denaturing

high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 782(1-2):99-104

60. Varley JM, McGown G, Thorncroft M et al (1997b) Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. *Cancer Res* 57:3245-3252.

61. Birch JM, Alston RD, McNally RJ et al (2001) Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene* 20:4621-4628

62. Meek DM (1999) Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene* 18:7666-7675

63. Porto Alegre. Prefeitura Municipal. Gabinete do prefeito. Secretaria do Planejamento Municipal (2004) Mapas da inclusão e exclusão social de Porto Alegre. Prefeitura Municipal de Porto Alegre, Brazil.

CAPÍTULO 3

Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MIW, Olivier M, Martel-Planche G, Marcel V, Aguiar E, Giacomazzi J, Ewald IP, Giugliani R, Ashton-Prolla P Detection of R337H, a germline *TP53* mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett* (submetido)

Detection of R337H, a germline *TP53* mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil

Edenir Inêz Palmero^{1,2}, Lavínia Schüler-Faccini^{1,3,4}, Maira Caleffi⁵, Maria Isabel Waddington Achatz⁶, Magali Olivier⁷, Ghyslaine Martel-Planche⁷, Virginie Marcel⁷, Ernestina Aguiar^{2,8}, Juliana Giacomazzi^{2,8}, Ingrid Petroni Ewald^{2,8}, Roberto Giugliani¹⁻⁴, Pierre Hainaut⁷ and Patricia Ashton-Prolla^{1-4*}

¹ *Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil;* ² *Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisas Biológicas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil;* ³ *Department of Genetics, UFRGS, Brazil;* ⁴ *Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil;* ⁵ *Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil;* ⁶ *Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, Brazil;* ⁷ *Molecular Carcinogenesis and Biomarkers Group, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France;* ⁸ *Post-Graduate Program in Medical Sciences, UFRGS, Brazil.*

*Correspondence to: Patricia Ashton-Prolla, MD, PhD. Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos 2350. 90035-903 Porto Alegre RS Brazil. Tel: + 55 51 2101-8011 Fax: + 55 51 2101-8010. e-mail: pprolla@hcpa.ufrgs.br

Running Head: Germline TP53 mutation in a breast cancer screening cohort.

ABSTRACT:

Germline *TP53* mutations predispose to a rare familial cancer syndrome, the Li-Fraumeni Syndrome (LFS), characterized by the early onset of multiple cancers including childhood adrenocortical carcinomas, sarcomas and brain tumors, and breast cancer and colon cancer in young adults. An identical germline mutation at codon 337 in *TP53* (R337H) has been reported in a number of unrelated subjects with familial cancer risk in South Brazil. Here we have assessed the prevalence of R337H in 750 healthy women participating in a community-based breast cancer screening program in the area of Porto Alegre. The mutant was detected in 2 participants (0.3%) who were 4th degree relatives and reported a familial history of cancer at multiple sites that did not match classical criteria for LFS. Testing in additional family members detected the mutation in 3 subjects, one of whom developed breast cancer at the age of 36. These findings indicate that R337H may be a low penetrance mutant which predisposes to multiple cancers and occurs in the population of South Brazil at a frequency 10 to 20 times higher than other *TP53* mutants commonly associated with LFS.

KEY WORDS: *TP53* mutations, Li-Fraumeni syndrome, breast cancer predisposition, inherited breast cancer.

INTRODUCTION

Germline mutations in *TP53* are associated with inheritance of the Li-Fraumeni Syndrome (LFS, OMIM #151623), a rare autosomal dominant disorder characterized by a familial clustering of tumors, with a predominance of sarcomas, breast cancers, brain tumors and adrenocortical carcinomas, diagnosed before the age of 45 years [1,2]. Other cancers, such as leukemia, lung cancer, skin melanoma, colorectal cancer, gastric cancer, pancreatic cancer, and prostate cancer are also present in excess in some families and, in some cases, germ cell tumors, choroid plexus papilloma and Wilms tumor have been reported as part of the spectrum [3,4,5,6,7]. The diagnostic criteria were initially defined as presence in the family of one individual with sarcoma before the age of 45, one first-degree relative with any cancer of the LFS spectrum under the age of 45 and another first- or second-degree relative with any cancer under age 45 or sarcoma at any age. Germline mutations in *TP53* are found in 70% of cancer-prone families fulfilling this definition. Subsequently, a number of families with tumor patterns that resemble LFS but do not fulfill the original criteria have been described, leading to different definitions of Li-Fraumeni-Like (LFL) syndromes. Germline *TP53* mutations are present in 20-40% of the families matching LFL definitions [6,8,9].

In a study of 45 Brazilian families matching at least one of the clinical definitions of LFL [10], 6 were found to carry a particular germline *TP53* mutation at codon 337 (CGC to CAC, arginine to histidine, R337H). This mutation has been initially identified in the germline of subjects from Southern Brazil who developed childhood adrenocortical carcinoma (ADC) but no other cancer, suggesting that R337H may exert tissue-specific effects and predispose exclusively to this tumor type [11]. However, the detection of this mutation in families with a wide spectrum of inherited cancers, compatible with LFL definitions, indicates that this mutant has the potential to predispose to a larger spectrum of cancer than initially assumed. Biochemical evidence indicates that the mutation has special, pH-dependent functional properties. The mutant protein forms oligomers and retains wild-type activity at pH 7, but fails to do so at pH 8, thus displaying a mutant phenotype only in pH conditions at the upper limit of the physiological range [12]. Outside Brazil, this mutation has been reported only once in a French family [13]. The reason why R337H occurs at a high frequency in cancer-prone families in Southern Brazil is unknown.

Analysis of hypervariable microsatellite *loci* within the *TP53* gene supports the hypothesis of a founder effect [14].

Given the particular pH-dependent phenotype of R337H, we have envisaged that the mutant allele may be relatively common in the general population of Southern Brazil, but may express its deleterious properties only in particular physio-pathological contexts that may explain the variable patterns of cancers in families who carry this mutation in the germline.

MATERIALS AND METHODS

In the present study, we have assessed the prevalence of R337H in the germline of a consecutive group of 750 cancer-unaffected women aged 40-69, participating in a breast cancer mammography screening programme that covers 18 health districts in the city of Porto Alegre [15]. All participants signed an informed consent and provided a blood sample. At recruitment, demographic data and information on individual and familial risk of breast cancer (BC) were collected through a structured questionnaire.

DNA was extracted from peripheral blood using standard procedures [16] and amplified with primers hybridizing to *TP53* in introns 9 and 10 to generate a 238-base pair PCR product encompassing the entire exon 10 plus flanking splice sites. This product was analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using the restriction enzyme *HhaI*, which specifically cleaves a DNA sequence that is scrambled by mutation at codon 337 [10]. The uncleaved mutant allele was identified in 4% agarose gels after ethidium bromide staining, and the nature of the mutation was determined by bi-directional, automated sequencing of an independent PCR product (Figure 1).

RESULTS

All patients were cancer-unaffected, unselected for family history and reported no particular breast-related complaints at inclusion. The mean age of the participants was 51.1 years (SD \pm 7.5 ys); 212 (28.3%) women were smokers and a surprisingly high number of women, 556 (74.1%), were overweight (BMI \geq 25). The majority of women were found to have either no abnormalities or benign findings on mammography (BIRADS 1, 2 or 3: 99.1%).

The R337H mutant was detected in two of the 750 participants (0.3%). The clinical examination of the breast and mammography were normal (BIRADS 1) in both participants, and none of them had an individual history of previous cancer disease. However, the two participants reported a familial history of cancer, and were found to be 4th degree relatives (Figure 2). The participants (III.6 and IV.12) were re-contacted, informed of their results, and additional at-risk family members were invited to participate in the study. Those interested in participating provided an extended family history and a blood sample for R337H testing after informed consent. The mutation was found in three additional family members: one woman affected with breast cancer at the age of 36 years (IV.13) and two asymptomatic 62- and 80-year-old women (II.2, III.12). Furthermore, genotyping for three common polymorphisms in intron 2 (PIN2, rs1642785) [17] intron 3 (PIN 3) [18,19] and exon 4 (PEX4, rs1042522) [20] indicated that subjects with R337H share a common set of polymorphisms, compatible with the hypothesis that the same mutant haplotype is present in all R337H carriers.

DISCUSSION

The results observed in this study suggest a much higher prevalence for the R337H mutant than that of other *TP53* germline mutations causing the LFS/LFL syndromes in the general population. The presence of four mutation-positive but cancer-unaffected individuals in this family, two of them well above the age of 50, supports the hypothesis that R337H is a low-penetrance allele. In addition, although several members of the family were affected with different types of cancer (pancreatic, gastric, lung, head and neck, and uterine cancers), only two of these were early-onset tumors and the family overall did not fulfill any of the currently recognized clinical criteria for the diagnosis of LFS/LFL syndrome. It should be noted that childhood ADC is not part of the tumor pattern in this family, further demonstrating that R337H may predispose to a wide cancer spectrum.

To our knowledge, this is the first study to report detection of a germline *TP53* mutation associated with an increased risk of developing several types of cancer in a population-based screening programme. So far, individuals with germline *TP53* mutations have been detected in the course of genetic testing for high-risk families reporting to cancer risk evaluation programs on the basis of a suspicious family history. These results suggest that the R337H allele may be present in a small but significant proportion of the general

population in Southern Brazil, raising new, unprecedented clinical and ethical challenges. Taken together, the information available on tumor patterns in R337H carriers suggests that the mutation has a low penetrance and it is likely that many carrier families may remain unaffected throughout life. On the other hand, some families with R337H appear to develop familial syndromes of the LFS/LFL type. In between, some R337H families present tumor patterns that show only one of the LFS/LFL traits, such as an excess of childhood ADC. It is therefore likely that other, yet unidentified genetic factors may act as modifiers of R337H penetrance and phenotype. On the basis of current knowledge, however, care should be exercised in the detection, information and management of subjects who are R337H carriers. The strict follow-up as recommended in LFS/LFL families should be proposed only if justified by familial history. Surveillance should take into account the possibility of an increased risk of multiple cancers, and not exclusively childhood ADC. In particular, initiatives for testing children in a population-based setting for identifying subjects at risk for childhood ADC should be reviewed with extreme caution because of the ethical and clinical implications over the lifetime of subjects who would be detected as R337H carriers. It is therefore essential to focus efforts on assessing the risk of cancer associated with R337H carriage, and on identifying modifiers that may help to better predict who could be at higher risk among R337H carriers.

Acknowledgments

The Nucleo Mama Cohort, from which the patients derive, is maintained by Associação Hospitalar Moinhos de Vento, in a partnership with Instituto da Mama do Rio Grande do Sul and the Municipal Health Agency from Porto Alegre. The authors thank Drs. Dakir Duarte Filho, Ademar José Bedin Júnior and Fávio Marcel Telis Gonzalez, Patricia Izetti Lisbôa Ribeiro, Giovana Skonieski and other members of the NMPOA Team for their essential role in recruiting and managing the NMPOA cohort. This study was supported in part by the following grants: Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Grant number:40.0949/2005-9) to R. Giugliani; Susan G. Komen for the Cure (Grant POP 0403033) to P. Ashton-Prolla, Fundação de Incentivo à Pesquisa Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA, Project 05-182) to L. Schüler-Faccini; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - PRODOC grant number 00202/03-7) to P. Ashton-Prolla. EI Palmero was supported in part by grants from The International Agency for Research in Cancer (IARC) and CNPq (process number 203732/2005-7).

REFERENCES

- [1] F.P. Li, J.F. Fraumeni Jr., Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome, *J. Natl. Cancer Inst.* 43 (1969) 1365-73.
- [2] F.P. Li, J.F. Fraumeni Jr, J.J. Mulvihill, W.A. Blattner, M.G. Dreyfus, M.A. Tucker, et al., A cancer family syndrome in twenty-four kindreds, *Cancer Res.* 48 (1988) 5358-62.
- [3] T. Frebourg, N. Barbier, Y.X. Yan, J.E. Garber, M. Dreyfus, J.F. Fraumeni Jr, et al., Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* 56 (1995) 608-15.
- [4] J.E. Garber, E.M. Burke, B.L. Lavalley, A.L. Billett, S.E. Sallan, R.M. Scott, et al., Choroid plexus tumors in the breast cancer-sarcoma syndrome, *Cancer* 66 (1990) 2658-60.
- [5] A.L. Hartley, J.M. Birch, K. Tricker, S.A. Wallace, A.M. Kelsey, M. Harris, et al., Wilms' tumor in the Li-Fraumeni cancer family syndrome, *Cancer Genet. Cytogenet.* 67 (1993) 133-5.
- [6] J.M. Birch, A.L. Hartley, K.J. Tricker, J. Prosser, A. Condie, A. Kelsey, et al., Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families, *Cancer Res*, 54 (1994) 1298-304.
- [7] L.C. Strong, M. Stine, T.L. Norsted, Cancer in survivors of childhood soft tissue sarcoma and their relatives, *J. Natl. Cancer Inst.* 79 (1987) 1213-20.
- [8] R.A. Eeles, Germline mutations in the TP53 gene, *Cancer Surv.* 25 (1995) 10-24.
- [9] M. Olivier, R. Eeles, M. Hollstein, M.A Khan, C.C. Harris, P. Hainaut, The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users, *Hum. Mutat.* 19 (2002) 607-14.
- [10] M.I. Achatz, M. Olivier, F.L. Calvez, G. Martel-Planche, A. Lopes, B.M. Rossi, et al., The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families, *Cancer Lett.* 245 (2007) 96-102.

- [11] R.C. Ribeiro, F. Sandrini, B. Figueiredo, G.P. Zambetti, E. Michalkiewicz, A.R. Lafferty, et al., An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (2001) 9330-5.
- [12] E.L. DiGiammarino, A.S. Lee, C. Cadwell, W. Zhang, B. Bothner, R.C. Ribeiro, et al., A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer, *Nat. Struct. Biol.* 9 (2002) 12-6.
- [13] A. Chompret, L. Brugieres, M. Ronsin, M. Gardes, F. Dessarps-Freichey, A. Abel, et al., P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals, *Br. J. Cancer* 82 (2000) 1932-7.
- [14] E.M. Pinto, A.E. Billerbeck, M.C. Villares, S. Domenice, B.B. Mendonca, A.C. Latronico, Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors, *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 48 (2004) 647-50.
- [15] M. Caleffi, P. Ashton-Prolla, B. Weber, J.M. Zignani, E.C. Dias, L.P. Antunes, et al., Breast cancer screening in 10,000 women of an underserved population in South Brazil: The NMAMAPOA cohort, *J. Clin. Oncol.* 23 (16S) (2005) 877s (abstract# 9664).
- [16] S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 1215.
- [17] L.M. Pleasants, M.F. Hansen, Identification of a polymorphism in intron 2 of the p53 gene, *Hum. Genet.* 93 (1994) 607-8.
- [18] V. Lazar, F. Hazard, F. Bertin, N. Janin, D. Beller, B. Bressac, Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene, *Oncogene* 8 (1993) 1703-5.
- [19] F. Gemignani, V. Moreno, S. Landi, N. Moullan, A. Chabrier, S. Gutierrez-Enriquez, et al., A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA, *Oncogene* 23 (2004) 1954-6.

- [20] G. Beckman, R. Birgander, A. Sjalander, N. Saha, P.A. Holmberg, A. Kivela, et al.,
Is p53 polymorphism maintained by natural selection?, *Hum. Hered.* 44 (1994)
266-70.

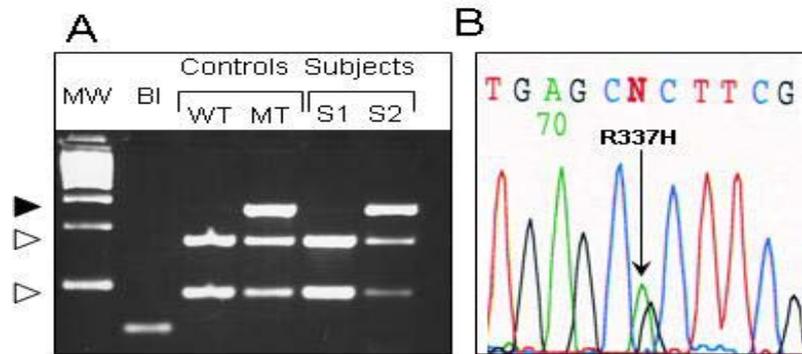


Figure 1. Detection of R337H by restriction fragment length polymorphism and sequencing. DNA extracted from peripheral blood was amplified by PCR to generate a 238-base pair product encompassing exon 10 and flanking splice sites. A: Restriction length fragment polymorphism (RFLP) analysis with *HhaI*. Black arrowhead: uncleaved fragment (mutant); white arrowhead: cleavage products (wild-type). MW: molecular weight marker. BI: blank. S1 and S2 are two subjects with wild-type and mutant codon 337, respectively. B: Sequencing of an independent PCR product of sample S2, showing a G to A transition at the second base of codon 337.

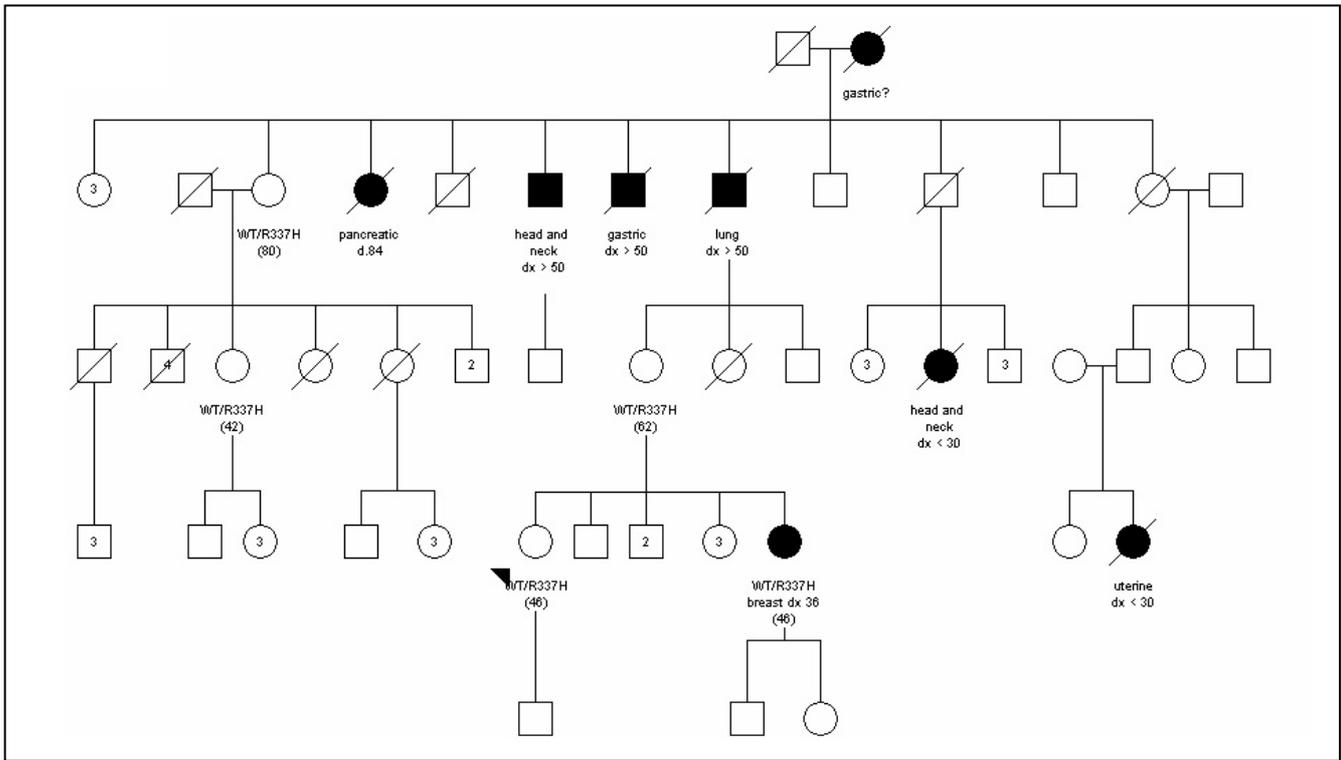


Figure 2. Pedigree of the two asymptomatic R337H carriers participating in a mammography screening program (III.6 and IV.12). Cancer-affected individuals are shown in blackened symbols. Arrow indicates proband; current age is indicated in parenthesis. Dx: age at diagnosis; d.: age at death. WT: wild-type.

8. DISCUSSÃO

8. DISCUSSÃO

8.1 Caracterização geral do estudo e da amostra

O presente estudo foi realizado com o intuito de identificar possíveis fatores genéticos envolvidos em uma maior incidência e mortalidade por câncer de mama verificados no Sul do País e, mais especificamente, em Porto Alegre. Para tanto, a amostra avaliada foi de mulheres da população em geral, atendidas em postos do Programa Saúde da Família (PSF), e participantes de um estudo de coorte, o qual foi proposto objetivando avaliar a prevalência de fatores de risco para câncer de mama na população em estudo e para testar a eficácia de um programa de rastreamento mamográfico na redução da mortalidade e morbidade pela doença. Essa coorte, denominada Núcleo Mama Porto Alegre (NMPOA), está acompanhando prospectivamente (previsão de acompanhamento de 10 anos) cerca de 9200 mulheres de uma área geográfica delimitada de Porto Alegre.

As mulheres incluídas no referido estudo foram recrutadas em 18 postos do PSF de Porto Alegre, os quais foram escolhidos pela Prefeitura da cidade como participantes iniciais desse programa. A escolha das unidades foi baseada na proximidade destas à central de atendimentos e mamografias (o NMPOA), disponibilidade de estrutura mínima das unidades em iniciar o programa e/ou ao grau de cobertura que cada uma das unidades atinge em sua região (em torno de 85.0% da população das unidades inicialmente incluídas na coorte dependem exclusivamente do PSF para atendimento básico de saúde). Todos os atendimentos com mastologista, radiologista, enfermeira especializada em mastologia, nutricionista, psicólogo e geneticista, bem como as mamografias, ecografias, punções mamárias e cirurgias foram realizadas no Núcleo Mama Porto Alegre, localizado em uma ala do Hospital Parque Belém de Porto Alegre. As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Medicina Genômica (Hospital de Clínicas de Porto Alegre), no Laboratório de Carcinogênese Molecular (IARC, *International Agency for Research on Cancer*, França) bem como no Laboratório de Pesquisa Molecular do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Albert Einstein (São Paulo).

Quanto às características sócio-demográficas da população incluída na coorte NMPOA, dados provenientes da Prefeitura Municipal de Porto Alegre indicam tratar-se de uma população carente em diversos aspectos, em situação de vulnerabilidade maior que a

média da capital, sendo que em torno de 8.0% da população acima dos 15 anos é analfabeta e em 33.5% dos lares o provedor encontra-se em condições de analfabetismo ou semi-alfabetização. Além disso, verifica-se nessas regiões altas taxas de desemprego e subemprego (44.0% dos provedores dos lares recebem até, no máximo, dois salários mínimos) e o saneamento básico é deficiente (22.0% dos lares não dispõe de água encanada, serviços de esgotamento sanitário e recolhimento de lixo adequados) (<http://www2.portoalegre.rs.gov.br/observatorio>). Em determinados locais, como por exemplo, na região das Ilhas, grande parte dos habitantes tem como ocupação a separação de lixo para posterior reciclagem, não apresentam horários definidos de trabalho, armazenam os dejetos no pátio de suas casas e, geralmente contam com a participação das crianças da família nesta tarefa (o que contribui para as altas taxas de evasão escolar e analfabetismo verificadas entre as crianças).

No decorrer de 2 anos, foram incluídas 9234 mulheres com idade superior a 15 anos na coorte NMPOA. A inclusão no estudo deu-se através do preenchimento de um questionário (Anexo 12.1.1), o qual incluía, dentre outros aspectos, a presença de história familiar de câncer de mama, câncer de ovário e/ou câncer colo-retal (CCR). A inclusão de questionamentos sobre a história familiar de câncer encontra embasamento no fato de esta ser um dos principais aspectos relacionados a um aumento no risco de câncer ao longo da vida (Sweet *et al.*, 2002; James *et al.*, 2006). Além disso, há na literatura, poucos dados referentes ao risco de câncer de mama hereditário em amostras selecionadas a partir da população em geral. Em sua maioria, conforme destaca Nelson *et al.* (2005), os estudos baseiam-se em mulheres previamente selecionadas pelo seu alto risco genético, a partir de sua história pessoal e familiar de câncer, não sendo dessa forma representativas da história familiar de câncer da população em geral.

O referido questionário foi preenchido por médicos, enfermeiros e agentes comunitários junto aos postos de saúde. Para o desempenho desta tarefa, os mesmos receberam um treinamento padronizado, não somente quanto ao preenchimento do questionário em si, mas também sobre aspectos epidemiológicos e técnicos acerca do reconhecimento de fatores de risco, diagnóstico e tratamento do câncer de mama, importância da detecção precoce e da aderência à estratégias de prevenção, importância da colheita da história familiar de câncer e do quanto esta história pode mudar o rumo da avaliação e acompanhamento do paciente. Também receberam treinamento no

reconhecimento de uma história familiar sugestiva de câncer de mama hereditário. A capacitação foi oferecida a todos os profissionais de saúde dos 18 PSFs envolvidos. Um questionário de conhecimento em relação a câncer, câncer de mama e câncer de mama hereditário foi aplicado imediatamente antes e logo após as capacitações, com questões relacionadas ao conteúdo abordado no treinamento. O índice global de acertos dentre os 42 profissionais de saúde avaliados foi de 78.2% antes do treinamento e 85.5% após sua realização ($p>0,05$). Entre os 28 agentes comunitários, o índice de acertos prévios ao treinamento foi de 72.4% e o posterior foi de 90.4% ($p<0,05$). Esses resultados (embora preliminares e provenientes de projeto de pesquisa paralelo em andamento), apontam para a importância que o treinamento teve, especialmente entre os agentes comunitários de saúde, em relação a uma melhor compreensão sobre os fatores de risco para câncer de mama e importância da prevenção e do diagnóstico precoce. Estudo realizado por Yong *et al.* (2003), avaliou 284 profissionais de saúde e 221 estudantes de medicina quanto ao seu nível de conhecimento relacionado ao risco de câncer de mama e aos fatores hereditários envolvidos e encontrou que apenas 50.0% dos profissionais e “futuros profissionais” entrevistados possuíam conhecimento prévio sobre a utilização do teste genético e da mastectomia profilática como opções a serem consideradas por mulheres em risco para câncer de mama hereditário, reforçando dessa forma a importância da educação continuada sobre a genética do câncer junto aos diferentes profissionais da saúde.

Do total de 9234 mulheres entrevistadas nos 2 anos de recrutamento, 1286 (13.9%) foram encaminhadas para avaliação do risco genético de câncer (ARGC). Trinta e nove destas mulheres não foram incluídas diretamente nas avaliações posteriores por apresentarem idade inferior a 18 anos. Porém, foi enviado convite para que familiares de primeiro grau delas comparecessem para ARGC no NMPOA. Das 1247 mulheres com idade ≥ 18 anos avaliadas pela equipe da genética (constituída por duas médicas geneticistas, uma terapeuta de família e um biólogo com treinamento em ARGC), tivemos um total de 27.7% de perdas, sendo que em 21.0% dos casos nunca se conseguiu fazer contato com as pacientes para o agendamento da consulta e, em 6.7% dos casos houve desistência por parte da paciente (consulta agendada 3 vezes sem comparecimento e/ou desistência ao longo da investigação). O percentual de perdas é relativamente pequeno se avaliarmos a amostra dentro do seu contexto: famílias com baixa escolaridade, alto índice de pobreza, para as quais ir ao médico significa um dia de trabalho perdido (a maioria

exerce trabalhos informais, com o rendimento dependente da sua produtividade diária), além de muitas vezes não terem onde/com quem deixarem os filhos ou como pagar a passagem. Outro fator importante a ser considerado é a falta de motivação ou de conhecimento em relação à importância de medidas preventivas, em especial acerca da importância que um estudo sobre a história familiar de câncer poderá ter na vida. Devemos lembrar que estas mulheres, no momento do ingresso no estudo (PSF) não estavam ativamente buscando informações sobre seu risco de desenvolver câncer, muitas provavelmente não tinham idéia desse risco, ou talvez não quisessem explorar este problema (Smith *et al.*, 2006). Estes são motivos adicionais para enfatizar a importância da avaliação aqui proposta em um contexto de pesquisa, com oportunidade para tantas consultas quantas forem necessárias e seguindo a recomendação da realização de aconselhamento genético em todos os casos e submetendo todos os pacientes, especialmente aqueles contemplando a realização de teste genético, a aplicação de consentimento livre e esclarecido antes da participação no estudo.

Utilizamos diversas estratégias de recrutamento para a ARGC, sendo algumas passivas (como por exemplo a divulgação junto aos postos de saúde da importância da história familiar de câncer e da possibilidade de realização de acompanhamento gratuito com equipe especializada junto ao NMPOA para famílias consideradas de risco) e outras ativas: a) realização de “mutirões”, onde os diferentes profissionais de saúde iam até a região de residência de parte da população e realizavam o preenchimento do questionário e/ou a primeira consulta de ARGC na unidade do PSF; b) visitas dos agentes comunitários de saúde convidando a população à participar do estudo; c) envio de cartas e realização de telefonemas para reforçar o encaminhamento ao programa de ARGC (para as pacientes já identificadas como tendo uma história familiar de câncer pelo questionário). Conforme Hughes *et al.* (2004), independente da estratégia de recrutamento utilizada no estudo, esta deve ser planejada de forma a contemplar e ser efetiva entre os diferentes setores populacionais da amostra envolvida. Ainda, conforme os pesquisadores, em termos de estratégias de recrutamento, os métodos de recrutamento ativos são mais frequentemente utilizados e mostram-se mais eficazes, principalmente em populações mais vulneráveis. Estas geralmente apresentam menor grau de alfabetização, por este motivo são menos sensibilizadas por estratégias de recrutamento passivo (devido à falta de conhecimento ou de preocupação sobre o tema em questão). Além disso, métodos de recrutamento ativos

personalizados possibilitam à população-alvo uma maior compreensão acerca do estudo e dão aos seus membros oportunidade de questionar os procedimentos envolvidos no estudo.

Sendo assim, um total de 902 mulheres (72.3% da amostra inicialmente referida para ARGC) foram efetivamente avaliadas. O índice de aderência obtido confirma o já citado na literatura em diversos estudos envolvendo recrutamento para consultas de avaliação do risco genético. Estudo feito por Chin *et al.* (2005) em um grupo de 438 mulheres provenientes de Singapura avaliadas quanto ao risco genético de câncer, apresentou uma adesão de 70.0%. Dois estudos adicionais similares realizados em uma mesma população exemplificam a importância do tipo de estratégia utilizada para o sucesso do recrutamento. Utilizando a mesma população-alvo e estratégias de recrutamento ativo e critérios de inclusão similares, Lipkus *et al.* (1999) e Thompson & Easton (2002) apontam uma eficiência de recrutamento de 86.0% e 53.0%, respectivamente em seus estudos. A diferença principal entre os estudos de Lipkus e Thompson reside no teor e complexidade da investigação em cada estudo: o primeiro envolvia participação em um programa educacional sobre fatores de risco para câncer de mama e realização de mamografias, enquanto o segundo incluía avaliações psicológicas e participação em sessões de ARGC e posterior teste genético. Um comparativo pode ser traçado com duas etapas de nosso estudo, a ARGC e o encaminhamento e decisão da realização do teste genético. A eficiência no recrutamento das mulheres com história familiar de câncer e seu encaminhamento para ARGC atingiu mais de 70.0%, enquanto que a adesão ao teste genético, por parte de mulheres com risco genético maior pertencentes a esse mesmo grupo, foi bem menor, em torno de 30.0%.

A ARGC foi realizada, após preenchimento de termo de consentimento de participação no estudo (Anexo 12.1.11), em duas a quatro consultas em média, com preenchimento de termo de consentimento inicial (inclusão no estudo), questionário de conhecimento sobre câncer de mama em geral e sobre aspectos relacionados ao câncer de mama hereditário (Anexo 12.1.2), questionário sobre percepção do risco de câncer (Anexo 12.1.3), seguidos da avaliação genética propriamente dita com a construção do heredograma, estimativas de risco de desenvolver câncer de mama ao longo da vida e estimativa da probabilidade de mutação em genes *BRCA*. Além disso, as pacientes com critérios para teste genético e voluntariedade para tal, preenchiam um questionário de motivação para o teste e TCLE específico para realização do teste (Anexo 12.1.12). No

decorrer das consultas foram explicados às pacientes o objetivo da avaliação, a importância da informação sobre a história familiar para definir o risco de câncer de mama e como esta estimativa de risco poderia modificar (ou não) o acompanhamento prospectivo e a inclusão em programas mais rigorosos de prevenção. Também foram revisadas com as pacientes as respostas ao questionário de conhecimento utilizando o momento da consulta de ARGC como oportunidade de educação no tema. Conforme Barcenas *et al.* (2006), a realização de AG pré-teste de alta qualidade, que inclua estimativas de RCV além de cálculos de probabilidade de mutação são exigências em estudos considerando a realização de teste genético para genes *BRCA*.

O processo de ARGC foi realizado em, no mínimo, 2 consultas para criar um melhor vínculo com as pacientes, otimizar o entendimento das questões principais da ARGC e suas conseqüências, e criar maior oportunidade para o esclarecimento de dúvidas e reflexão acerca da melhor decisão a ser tomada. Além disso, esse número mínimo de consultas foi estabelecido para permitir que se buscasse ao máximo a comprovação de dados da história familiar de câncer. Um grande esforço foi realizado para buscar a comprovação do maior número possível de diagnósticos de câncer por laudos anátomo-patológicos, atestados de óbito e laudos médicos. Mesmo assim, somente 11.0% das 902 mulheres avaliadas trouxeram laudos de pelo menos um familiar afetado por câncer. Esta dificuldade em angariar a informação em nossa amostra pode ter diferentes explicações. Primeiro, as pacientes são provenientes de uma amostra populacional e não de uma clínica de oncologia ou de alto risco genético; em sua maioria não são afetadas por câncer e não buscaram atendimento por uma preocupação com o risco de desenvolver câncer (como ocorre em serviços de oncogenética). Segundo, há uma dificuldade real em localizar e retirar laudos médicos em nosso meio. Para diagnósticos realizados há mais de dez anos, muitas instituições não guardam registros e/ou material biológico (como blocos de parafina que poderiam ser utilizados para teste genético). Muitas instituições têm restrições importantes à liberação de laudos e material biológico a pessoas diferentes do paciente em si (mesmo que familiares de um indivíduo já falecido) e outras foram acometidas por catástrofes para o registro de dados (como é o caso de um grande grupo de hospitais públicos de Porto Alegre - o Grupo Hospitalar Conceição - onde todos os registros de exames anátomo-patológicos e blocos de parafina de um período de quinze anos foram

perdidos em um incêndio). Terceiro, em muitas famílias houve uma dificuldade social de contato com familiares afetados, muitos não mais localizáveis pelo caso-índice.

Nas famílias de alto risco, com heredogramas sugestivos de uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama, a taxa de comprovação dos diagnósticos de câncer foi bem maior. Em 45 das 50 famílias (90.0%) houve confirmação de pelo menos um caso de câncer por atestado de óbito (AO), laudo anátomo-patológico (LAP) ou laudo médico (LM), embora em muitas o número de confirmações por família não tenha sido suficiente para confirmar com absoluta certeza o diagnóstico clínico (história relatada) de uma síndrome de predisposição ao câncer. Essa diferença pode se dever a uma preocupação maior (e anterior à ARGC) com o câncer nessas famílias que teriam guardado melhor os seus registros; pode se dever a uma maior motivação de busca da informação por parte dos casos-índice e seus familiares; ou pode se dever a uma maior motivação e esforço de nossa equipe em confirmar os diagnósticos nessas famílias.

Apesar do índice de comprovação da história familiar de câncer por laudos ter sido inferior ao esperado, estudo paralelo de nosso grupo constatou grande acurácia da história familiar relatada de câncer em familiares de primeiro grau. Este estudo (ainda em andamento) está sendo desenvolvido em diversas etapas. Em uma primeira etapa, foi determinada a prevalência da história relatada de câncer (todos os tipos) em familiares de primeiro grau. Das 9234 mulheres incluídas na coorte, 2268 (24.6%) relataram ter pelo menos um familiar de primeiro grau com algum tipo de câncer. Uma amostra aleatória de 710 mulheres deste grupo (31.0%) foi selecionada e contactada por telefone para confirmar esse relato. Em 88.0% dos casos a história familiar relatada na entrevista telefônica era exatamente igual à descrita no questionário de inclusão na coorte. Em 4.0% a história de câncer em familiar de primeiro grau não se confirmou e em 8.0% dos casos a presença da história familiar de primeiro grau de câncer foi confirmada, porém não houve consistência quanto ao familiar afetado ou ao tipo de câncer presente. No grupo de pacientes com história familiar de câncer encaminhadas para ARGC o heredograma realizado por médico geneticista confirmou a história relatada de câncer em familiar de primeiro grau em 91.1% dos casos (Roth, FL).

Em relação ao questionário de conhecimento sobre câncer de mama e câncer de mama hereditário (adaptado de Lerman *et al.* 1994; 1995; 1996), respondido por todas as pacientes imediatamente antes da ARGC, dados preliminares da análise de cerca de 500

pacientes indicam média de 41.0% de acertos nas questões de conhecimentos sobre câncer de mama em geral (SD= 1,4) e 44.0% nas questões relacionadas ao câncer de mama hereditário (SD= 1,7). A aplicação deste questionário foi importante por diversos motivos. Nos permitiu ter uma idéia da compreensão dos temas “câncer de mama” e “câncer de mama hereditário” nesta população e nos forneceu um roteiro para transmitir informações e disseminar conhecimento acerca dos temas durante a ARGC. A discussão destas questões com as pacientes e o esclarecimento de dúvidas acerca desses temas durante o ARGC pode ter contribuído para estreitar o vínculo aconselhador/paciente e para favorecer a discussão de dúvidas.

Além do questionário de conhecimento, as pacientes também preencheram um formulário referente à sua percepção pessoal do risco de câncer ao longo da vida (adaptado de Van Dijk *et al.*, 2003). A análise desses dados ainda não foi realizada mas sua posterior comparação com os dados de RCV estimados a partir dos modelos disponíveis na literatura e aplicados às pacientes (Gail, Claus e Tyrer-Cuzick) poderão nos auxiliar no entendimento do perfil da amostra frente às diferentes categorias de risco e aos desfechos da ARGC e realização do teste genético. Diversos estudos na literatura destacam a importância que a percepção pessoal do risco de câncer pode desempenhar na adesão a programas de rastreamento e redução do risco dessa doença (Leventhal & Leventhal, 1999; Van Dijk *et al.*, 2003; Palmero EI, “no prelo”).

Considerando a importância do RCV de desenvolver câncer de mama na avaliação clínica e seguimento das pacientes do programa, nos baseamos em três modelos amplamente utilizados em outros países para estas estimativas. A opção de utilizar mais de um modelo de estimativa do RCV foi baseada nas limitações existentes para cada um dos modelos individualmente e na nossa intenção de avaliar as pacientes dentro de uma faixa de risco e não a partir de um risco numérico isolado. Verificamos, que nas pacientes consideradas de alto risco, (aquelas com critérios clínicos para uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer), o RCV estimado era menor que o de pacientes consideradas de risco moderado pela história familiar, confirmando relatos prévios de subestimativa do risco com uso desses modelos em famílias com câncer de mama hereditário (Nelson *et al.*, 2005). Um exemplo clássico é dado pelo modelo de Gail (Gail *et al.*, 1989) que apesar de considerar diversos fatores de risco ambientais para câncer de mama não leva em conta a história familiar de câncer de ovário, câncer de mama em

familiares de segundo grau e/ou paternos e a idade ao diagnóstico dos tumores na família. Mesmo o modelo de Claus (Claus *et al.* 1994), centrado na história familiar de câncer, apresenta importantes limitações: ignora dados referentes a história reprodutiva e patologias mamárias prévias, bem como história familiar além de segundo grau. O modelo de Tyrer-Cuzick, mais recentemente desenvolvido (Tyrer *et al.*, 2004), supre parte dessas necessidades já que avalia dados referentes à história familiar de câncer da paciente sem desconsiderar outros fatores de risco, tais como uma menarca precoce, idade tardia ao nascimento do primeiro filho, dentre outros. Além disso, o modelo de Tyrer-Cuzick engloba dados referentes à medidas antropométricas nos fatores de risco para o câncer de mama. Ao considerarmos os diferentes modelos disponíveis, nossa primeira impressão é de que o modelo de Tyrer-Cuzick seja o mais adequado para estimar o risco de câncer de mama em nossa amostra, já que permite incluir além dos dados hormonais, reprodutivos e familiares, informações referentes ao sobrepeso, o qual foi evidenciado em grande número das pacientes investigadas, e não é contemplado em nenhum dos outros modelos.

Uma grande limitação da utilização de todos estes modelos em nosso meio é que eles foram criados e validados em mulheres européias e/ou norte-americanas. A falta de estudos nacionais sobre estes modelos nos motivou a conduzir um estudo local (estudo paralelo em realização) com as pacientes de 40-69 anos do NMPOA sem diagnóstico prévio de câncer de mama e submetidas a rastreamento mamográfico. Nesse estudo está sendo realizada uma análise comparativa dos modelos de Gail e Tyrer-Cuzick, com uma descrição da prevalência dos fatores de risco incluídos em cada modelo; estimativas médias do risco de desenvolver câncer de mama e uma avaliação da contribuição de cada uma das variáveis utilizadas pelos modelos para a construção do risco estimado nessa amostra.

Quanto à estimativa da probabilidade de mutação em genes *BRCA*, os modelos correntes, quando avaliados isoladamente, também apresentam uma série de limitações (Nelson *et al.*, 2005). Por exemplo, as tabelas de prevalência de mutação (Frank *et al.*, 2002) não consideram a presença de câncer de mama bilateral e nem a presença de câncer de próstata e pâncreas, previamente associados na literatura a mutações em genes *BRCA* (The Breast Cancer Linkage Consortium, 1999). Essas informações por outro lado, são incorporadas no cálculo de probabilidade do modelo de Couch modificado (Penn II) (Domchek *et al.*, 2003; 2004). Portanto, também no caso da estimativa de probabilidade de

mutação em gene *BRCA* usamos mais de um modelo para otimizar a identificação de pacientes em mais alto risco. Uma ressalva importante a ser considerada é que também não há nenhum estudo de validação destes modelos em mulheres brasileiras. Para que estes modelos sejam realmente considerados aplicáveis à nossa população estudos maiores, com avaliação clínica e molecular completa de famílias HBOC terão que ser conduzidos. A análise comparativa das probabilidades de mutação obtidas para estas famílias e dos resultados da avaliação molecular definirão a eficácia destes modelos na população local. Em nosso estudo, apesar de que análises complementares precisam ser realizadas para definir com certeza a patogenicidade de algumas das variantes de seqüência encontradas nos genes *BRCA*, a ausência de mutações deletérias conhecidas em uma amostra de 17 famílias com probabilidade média de mutação de cerca de 25.0% pode ser um indicativo de que estes modelos talvez não sejam bons preditores de mutação em mulheres de nosso meio.¹

Uma dificuldade adicional na estimativa da probabilidade de mutação é a estrutura familiar limitada de muitos de nossos pacientes, com muitos familiares já falecidos há vários anos, número reduzido de mulheres em algumas gerações, além da baixa penetrância das alterações em genes *BRCA* em homens. Estudo realizado por Weitzel *et al.* (2007) definiu como tendo estrutura limitada aquelas famílias com menos de duas mulheres aparentadas em primeiro ou segundo grau com idade superior a 45 anos em ambas linhagens, materna e paterna de um caso índice. O estudo relatado por Weitzel e colaboradores incluiu análise dos genes *BRCA* em 261 mulheres com câncer de mama antes dos 50 anos de idade e sem história familiar (primeiro e segundo grau) de câncer. Destas, 50.0% pertenciam a famílias com estrutura limitada. Alterações germinativas em *BRCA1* ou *BRCA2* foram detectadas em 13.7% das pacientes provenientes de famílias com estrutura limitada e em 5.2% daquelas com estrutura adequada. Após comparação da probabilidade de mutação obtida a partir de diferentes modelos (incluindo as tabelas de prevalência de mutações da Myriad) com a taxa de mutações detectada pelo seqüenciamento dos genes, os autores verificaram a insensibilidade dos diferentes modelos à presença de uma estrutura familiar limitada. Assim, evidencia-se mais uma vez a importância de que esses modelos sejam considerados ferramentas acessórias na ARGC,

¹ Apesar de 18 famílias terem sido testadas para mutações em genes *BRCA*, em uma delas a história de câncer posteriormente confirmada não sustentou o critério para HBOC estabelecido previamente.

mas que seus resultados sejam interpretados com cautela, por um profissional com ampla experiência em aconselhamento genético do câncer. Também por esse motivo é importante que na ARGC a avaliação dos heredogramas seja realizada por mais de um examinador quanto à presença de critérios para uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer, como foi realizado aqui.

A avaliação de risco é um processo complexo que envolve diferentes aspectos da história médica pessoal e familiar de cada paciente e requer análise criteriosa do heredograma. Por esse motivo também, é difícil acreditar que um único modelo seja capaz de estimar acuradamente o risco de desenvolver câncer e a probabilidade de mutação, sendo possivelmente a utilização de múltiplos modelos mais adequada. Mais do que tentar definir um risco exato que possa ser transmitido à paciente, o objetivo dessa avaliação é de determinar uma faixa de risco dentro da qual a paciente se encontra e que auxiliará a equipe de saúde a definir a melhor estratégia de acompanhamento clínico da paciente e seus familiares em risco. Apesar dos modelos aqui utilizados não estarem validados para uso no Brasil, eles são os únicos disponíveis e, em conjunto com a avaliação clínica, permitiram classificar a amostra em categorias de risco. Estudos mais amplos a nível nacional, padronizados quanto aos critérios para indicação do teste genético, modelos de avaliação de risco utilizados e envolvendo grande número de indivíduos serão necessários para validar os diferentes modelos e recomendar qual a melhor estratégia de ARGC em nosso meio.

8.2 Investigações moleculares nas pacientes de alto risco para câncer de mama hereditário

Do total das 902 mulheres submetidas à avaliação do risco genético para câncer, 214 (23.7%) provenientes de 183 famílias preenchem critérios de inclusão para alguma síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama no momento da inclusão no estudo. Após aconselhamento genético, das 183 famílias com critérios, 50 (27.3%) optaram pela realização de teste para pesquisa de mutações germinativas em genes de predisposição. Os principais motivos para não-realização do teste genético foram: dificuldade de contactar familiares afetados por câncer (candidatos ao teste), inexistência de familiares afetados vivos para a participação no estudo, não-voluntariedade dos

familiares ou ainda da própria paciente, impossibilidade de confirmação da história familiar de câncer (e, portanto a existência de critérios para HBOC) e, desistência do estudo por parte do paciente durante o processo de AG. Além desses fatores, um importante aspecto a ser lembrado é a potencial falta de motivação e/ou preparação por parte da população para o estudo, pois diferente da situação da maioria dos estudos relatados sobre ARGC e teste genético, nos quais a população-alvo é recrutada em serviços especializados de genética e câncer, e vêm às consultas buscando a avaliação de risco, em nosso estudo muitas pacientes iniciaram o processo sem saber ao certo o que esperar da ARGC e o que viria a seguir.

A indicação para o teste genético de mutações em genes *BRCA* foi feita para as famílias HBOC de mais alto risco, ou seja, aquelas que pela história preenchiam os critérios preconizados pela ASCO ou que tinham uma probabilidade de mutação igual ou superior a 30.0% conforme estimado pelas tabelas de prevalência de mutação de Myriad ou pelo modelo Penn II (Frank *et al.*, 2002; Domchek *et al.*, 2003; 2004). Dentre as 183 famílias que preenchiam critérios para alguma síndrome de predisposição hereditária ao câncer, 56 preenchiam os critérios estabelecidos pela ASCO, sendo o mais freqüente o que se refere a presença de pares de irmãos ou pares mãe/filha com câncer de mama antes dos 50 anos de idade. Vinte e quatro e 16 famílias apresentavam probabilidade de mutação superior a 30.0%, de acordo com as tabelas de prevalência de mutação disponibilizadas pelos laboratórios Myriad e conforme o modelo Penn II, respectivamente (varias famílias preenchiam mais de um critério).

Usando novamente como referência o trabalho recentemente publicado por Weitzel *et al.* (2007) acerca da estrutura familiar limitada, surge o questionamento acerca da necessidade da ampliação da presente amostra e de futuramente incluir um número maior de famílias com critérios menos estritos ou probabilidade de mutação < 30.0%. Como citado anteriormente, estudos envolvendo um tamanho amostral maior, com critérios de inclusão padronizados e de preferência incluindo pacientes de múltiplos estados brasileiros será necessário para validar esses modelos de probabilidade de mutação em nosso meio.

Nas 50 famílias testadas para alguma das 3 síndromes em questão, (considerando apenas o lado parental para o qual a história familiar preenchia critérios de uma síndrome), verificamos um total de 342 tumores (em 321 indivíduos), sendo que o número de tumores nas famílias variou de 2 a 17 (média de 6.8). Um fato interessante é o tamanho das famílias

analisadas, onde o número de familiares de primeiro grau varia de 4 a 22 (média de 7.0 familiares de primeiro grau por família). Apenas 28 indivíduos com mais de um tumor primário foram identificados, sendo 17 associações de câncer de mama com tumor ginecológico. Além disso, 11 casos de câncer de mama bilateral foram verificados. Como esperado, a média de idade ao diagnóstico do câncer de mama nesse grupo foi de 47.2 anos, significativamente inferior à média de idade ao diagnóstico para a população em geral (entre 55 e 65 anos de idade) (Koliren *et al.*, 2005; <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>; http://www.health.nsw.gov.au/public-health/chorep97/can_brstage.htm).

Das 65 famílias com critérios clínicos para HBOC, 18 (27.7%) optaram pela realização do teste genético. Identificamos 117 tumores na amostra testada e, destes, 58 eram tumores de mama (49.6% do total), dos quais 7 (12.0%) eram bilaterais. Como esperado, o segundo tumor mais freqüente nas famílias HBOC testadas foi ovário (10 casos), seguido de endométrio e colo de útero (8 e 3 casos, respectivamente), CCR (7 casos), gástrico (6 casos), pulmonar (5 casos), além de casos de câncer de pâncreas, próstata, garganta, esôfago, sistema nervoso central (SNC), leucemia, rim, tumores ósseos e melanoma. Verificou-se ainda um total de 4 casos de câncer com origem indeterminada. Os tumores detectados através da construção e análise do heredograma estão conforme a descrição teórica prevista na literatura, que aponta os tumores de mama e ovário como os mais freqüentemente relacionados à *BRCA1/2*, além de uma maior freqüência de câncer de próstata e pâncreas (The Breast Cancer Linkage Consortium, 1999; Cass *et al.*, 2003). Existem ainda diversos estudos que associam uma freqüência aumentada de CCR e mutações no gene *BRCA1* (Lux *et al.*, 2006). Não identificamos em nossa amostra nenhum caso de câncer de mama masculino.

Após preenchimento do TCLE, foi realizado o rastreamento de mutações germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* em 19 indivíduos provenientes de 18 famílias. A família 62 teve 2 indivíduos testados porque a paciente inicialmente disponível para coleta era afetada com câncer de endométrio. Este tumor é menos característico na síndrome, e, portanto, a probabilidade desta probanda carrear a mutação foi considerada menor e optamos por testar também um segundo indivíduo da família com história pessoal prévia de câncer de mama. Em três das 18 famílias, devido à indisponibilidade de afetados vivos e/ou com voluntariedade para teste, o probando era não-afetado por câncer (famílias 101,

186 e 736). Obteve-se comprovação dos tumores com laudos em 61.0% das famílias HBOC testadas. Embora sejam dificuldades reais do dia-a-dia da ARGC em praticamente todos os centros, a investigação de indivíduos não-afetados por câncer e a comprovação de diagnósticos de câncer em apenas 2/3 dos casos apenas, podem ter contribuído para uma menor prevalência de mutações na amostra estudada.

A metodologia utilizada no teste genético incluiu um primeiro rastreamento da seqüência codificante de ambos genes (*BRCA1/2*) bem como parte dos íntrons flanqueadores, seguida de seqüenciamento confirmatório das variantes encontradas. O rastreamento inicial foi realizado por DHPLC, metodologia que foi estabelecida no laboratório com este trabalho. Esta metodologia poderá ser utilizada futuramente para rastreamento de mutações em diferentes genes de predisposição. Para aumentar a confiabilidade dos resultados, os genes foram divididos em diversos amplicons, que variaram em tamanho de 206 a 633 pb. Assim, no total, para a análise de um único paciente, 76 regiões de *BRCA1* e *BRCA2* foram amplificadas por PCR. Os amplicons foram analisados em mais de uma temperatura no DHPLC para aumentar a confiabilidade do resultado. Pudemos, através das análises realizadas, corroborar os dados de outros pesquisadores que relatam a alta sensibilidade, reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados provenientes do DHPLC (p.ex. Sivakumaran, *et al.*, 2003). Gerhardus *et al.*, (2007) através de revisão da literatura, compararam doze diferentes métodos de rastreamento de mutações nos genes *BRCA1/2* e os resultados indicaram ser esse o método de melhor relação custo-benefício, por apresentar-se menos laborioso e caro que o seqüenciamento direto de ambos genes, além de apresentar alta sensibilidade e especificidade. No entanto, cabe ressaltar que o estabelecimento da técnica é um processo trabalhoso, que exige a padronização das condições de separação de todos os amplicons, com a verificação das diferentes temperaturas de análise ideais a cada caso, de forma a contemplar os diferentes domínios de desnaturação do fragmento de DNA.

Após comparação de dados do DHPLC com os resultados do seqüenciamento verificamos que além de alta confiabilidade e sensibilidade o método é reprodutível pois vários amplicons foram analisados em mais de um equipamento de DHPLC e o padrão dos picos foi praticamente idêntico. Pelo fato de ser uma técnica em padronização no nosso laboratório optamos por seqüenciar, além dos fragmentos variantes, pelo menos um fragmento “normal” para cada amplicon. Em todos os fragmentos identificados como não-

variantes pelo DHPLC não encontramos nenhuma alteração de seqüência. Após a análise dos 1444 cromatogramas e dos 461 seqüenciamentos, detectamos em nossa amostra um total de 34 variantes, sendo 12 em *BRCA1* e 22 em *BRCA2* (a maioria delas verificada em mais de uma família).

As variantes encontradas foram comparadas com dados depositados no banco de dados BIC (*Breast Cancer Information Core*), um banco de dados *online* e de acesso gratuito, com dados relacionados a mutações, polimorfismos e demais variantes nos genes *BRCA1/2*. Além da relação das variantes já detectadas mundialmente, o banco disponibiliza também resultados de estudos funcionais, os quais possibilitam a classificação das variantes como sendo mutações deletérias, variantes de significado clínico desconhecido e variantes sem significância clínica (Szabo *et al.*, 2000). Até o presente momento, mais de 3400 variantes foram depositadas no BIC e, cerca de 50.0% destas ainda são classificadas como “variantes de significado desconhecido”, o que em muito dificulta o processo de AG posterior ao teste (Ahn *et al.*, 2007). O que se preconiza é que máximo empenho seja feito para definir a patogenicidade das variantes através de estudos de associação, alinhamentos múltiplos, estudos funcionais, no intuito de direcionar as estratégias de prevenção e rastreamento a serem adotadas pelo paciente e seus familiares.

Em nossa amostra, dentre as 34 variantes de seqüência detectadas, a metade foram mutações de ponto do tipo troca de sentido não-sinônimas, (17/34; 50.0%), 26.5% eram intrônicas (9/34), 7 (20.6%) foram classificadas como sinônimas e uma (2.9%) ocorreu na região 5' não codificante (região 5'UTR) do gene *BRCA2*. Ao contrário dos dados disponíveis no BIC para *BRCA1*, onde alterações que alteram a matriz de leitura (*frameshift*) são as mais freqüentemente relatadas, não detectamos em nossa amostra nenhuma variação que alterasse a matriz de leitura dos genes analisados. Também não encontramos na presente análise nenhuma das mutações comumente presentes na população judaica Ashkenazi, as quais foram verificadas com uma freqüência relativamente alta em estudo realizado por Gomes *et al.* (2007) e Lourenço *et al.* (2004) em mulheres com câncer de mama provenientes do Rio de Janeiro.

Das alterações detectadas no gene *BRCA1*, 4 encontram-se entre as 20 mais freqüentemente depositadas junto ao banco de dados (4427T/C; 2430T/C; 2201C/T; Q356R). Nove das 12 alterações verificadas em *BRCA1* já haviam sido descritas por outros pesquisadores e previamente classificadas como não tendo significado clínico. Uma das

alterações detectadas (Q356R) já havia sido descrita, porém seu significado clínico é desconhecido. Além disso, encontramos em 13 das 18 famílias investigadas a alteração K1208T e, a alteração IVS17+44A/T estava presente em 5 das 18 famílias, sendo que ambas variações não estavam previamente descritas no BIC.

Em relação ao gene *BRCA2*, das 22 variantes detectadas, 6 encontram-se entre as 20 mais comumente depositadas no BIC (7470A/G; E2856A; 3624A/G; R2108H; 2457T/C; K2950N). Das alterações verificadas, 8 já haviam sido descritas e classificadas como não deletérias. Cinco alterações já haviam sido descritas e seu significado clínico permanece desconhecido. Nove variantes novas foram identificadas no gene *BRCA2*, estando 5 delas localizadas em íntrons e as demais foram classificadas como alterações de ponto do tipo troca de sentido de significado clínico incerto.

Dados provenientes de estudo realizado por Dufloth *et al.* (2005), no qual foram avaliadas 31 mulheres de São Paulo, apontam para uma frequência de mutações de 13.0%, sendo que das 3 mutações detectadas em 4 famílias, uma ocorreu em *BRCA1* (alteração da matriz de leitura) e 2 em *BRCA2* (uma delas estava presente em duas famílias e a outra, variante de significado clínico desconhecido, em uma família).

Simon *et al.* (2003) analisando 64 indivíduos com história familiar de câncer de mama e/ou ovário, provenientes de São Paulo, Brasil e incluindo indivíduos de origem judaica Ashkenazi e não-judeus, encontraram 37 indivíduos apresentando 17 diferentes alterações nos genes *BRCA1/2*, sendo que as alterações normalmente associadas à população judaica (185delAG, 5382insC e 6174delT) foram detectadas entre indivíduos de origem judaica Ashkenazi e entre não-judeus. Além disso, das 17 alterações encontradas, duas não haviam sido previamente descritas na literatura. Outro estudo envolvendo amostras brasileiras foi realizado por Lourenço *et al.* em 2004. Os autores analisaram 47 pacientes selecionados devido ao preenchimento de critérios de inclusão para HBOC. Alterações germinativas nos genes *BRCA1/2* foram encontradas em 7 dos 47 pacientes analisados, sendo 5 delas alterações na matriz de leitura do gene (*frameshift*), uma envolvendo sítios de processamento do gene e uma alteração de perda de sentido (*nonsense*).

O alto número de variações intrônicas detectadas em nosso estudo (26.5% do total) deve-se, provavelmente, à localização dos oligonucleotídeos utilizados na amplificação de ambos genes, que em sua maioria, estavam situados pelo menos 40 bases a montante e a

justante dos exons. Das 9 variações intrônicas, 6 encontram-se mais de 30 pares de bases distantes do início ou término do exon, e provavelmente não afetam o sítio de processamento intron/exon. A alteração IVS16-14T/C encontra-se a 14 pb do exon, porém já foi previamente descrita e classificada como não-deletéria. Duas das variações encontram-se relativamente próximas ao início (IVS1-7T/A) ou término de exons (IVS14+3delA) e necessitam ser estudadas em maior detalhe. Para isso, serão feitos, num primeiro momento, estudos de associação envolvendo demais familiares (afetados ou não por câncer) das 2 famílias em questão (famílias 736 para a variante IVS1-7T/A e a família 638 para a variante IVS14+3delA) para verificar a segregação da variante de seqüência com a doença. Adicionalmente, estudos do produto de RNAm destes genes serão conduzidos para verificar se há alteração no processamento dos íntrons.

Quanto às 5 variantes novas encontradas (mutações de ponto de sentido trocado) e as 6 variantes já relatadas no BIC mas para as quais não se sabe o impacto funcional e seu papel na predisposição ao câncer, estudos de segregação também serão realizados com as famílias em questão em uma primeira etapa.

Por fim, uma simulação do impacto destas variantes foi realizada com auxílio do programa “*Polyphen*” (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>) que prediz a patogenicidade de uma determinada alteração ou a classifica como provavelmente benigna com base em estudos funcionais, predição e anotação de seqüências, e em alinhamentos múltiplos de seqüências provenientes de diferentes níveis da escala evolutiva (Sunyaev *et al.*, 2001). As duas variantes de *BRCA1* analisadas com auxílio do software, K1208T e Q356R, foram classificadas como provavelmente deletérias, com base em estudos de alinhamento múltiplo. Estas variantes ocorreram em 13 e 3 famílias de nossa amostra, respectivamente, o que em um primeiro momento, pela prevalência nos faria pensar em polimorfismos e não em mutações deletérias. As variações intrônicas não são analisadas pelo referido programa.

Em relação ao gene *BRCA2*, 9 variantes foram analisadas com o programa “*Polyphen*”, o qual classificou três das variantes (R2108H, K2950N e V2527L) como possivelmente benignas, com base em estudos estruturais e de alinhamentos múltiplos de seqüências. Quatro variantes foram classificadas como “possivelmente deletérias”, sendo elas D129N, Q1181P, D1699G e T1915M. Essas variações foram verificadas em 10, 2, 1 e 1 famílias de nossa amostra, respectivamente. Duas variantes foram consideradas “provavelmente deletérias”, por estudos de alinhamento múltiplo. As variantes em questão

são N289Y e G2724V, cada uma delas verificada em 6 famílias de nossa amostra (anexo 12.2.10).

Apesar da análise preliminar com programas de predição de patogenicidade ser útil, esta é uma ferramenta acessória que não pode substituir análises funcionais e por esse motivo estudos de segregação serão propostos a todas as famílias nesta situação (Goldgar *et al.*, 2004).

Ainda em relação à análise das pacientes com critérios clínicos para HBOC, não detectamos em nossa amostra a presença de rearranjos gênicos no gene *BRCA1*, em uma análise preliminar utilizando estratégia de PCR longo. Não existem, ao nosso conhecimento, outros estudos envolvendo pesquisa por rearranjos em *BRCA1* na população brasileira. Dessa forma, dada a contradição existente na literatura (estudos com mulheres alemãs verificando que em torno de 36.0% das variações em *BRCA1* devem-se a rearranjos, a estudos realizados em mulheres finlandesas os quais não detectam a presença de rearranjos gênicos de *BRCA1* em nenhuma das mulheres analisadas), e considerando a restrição imposta pelo nosso número amostral, não podemos inferir a frequência de rearranjos gênicos no gene *BRCA1* na população brasileira. Estudos adicionais destas famílias utilizando a técnica de MLPA (*multiple-ligand probe analysis*) para detecção de rearranjos estão em andamento.

Diferentes estratégias foram e continuam sendo empregadas na investigação molecular de famílias com a síndrome HBOC, porém cabe destacar o mencionado por Palomba *et al.* (2005), os quais afirmam que a proporção de mutações recorrentes e únicas varia em diferentes populações e subpopulações refletindo dessa forma, as influências históricas de migrações que contribuiriam para a formação da atual estrutura populacional. Assim, dados verificados para a população brasileira como um todo, não necessariamente serão corroborados por dados oriundos da região Sul do país, dada a alta heterogeneidade genética presente.

Em relação às demais síndromes de predisposição ao câncer de mama consideradas no presente estudo, identificamos inicialmente 22 famílias com os critérios de inclusão para HBCC (modificados a partir de Meijers-Heijboer *et al.*, 2003). As famílias foram incluídas por terem respondido afirmativamente a uma das questões do instrumento de inclusão, referindo história familiar positiva de câncer de mama e/ou colo-retal. Das 22 famílias com os critérios clínicos 7 (31.8%) optaram pela realização do teste genético.

Além de casos de câncer de mama e colo-retal, as 7 famílias HBCC apresentavam ainda tumores hematológicos, câncer de pulmão, ovário, SNC, útero, próstata, pâncreas, esôfago, estômago e pele.

Em uma das famílias (família 439) mais de um indivíduo afetado foi testado para a presença de *CHEK2* 1100delC. Em todos os casos, o indivíduo testado apresentava história pessoal prévia de câncer. Em 57.0% dos casos (4 de 7 famílias), houve comprovação dos casos de câncer através de laudos anátomo-patológicos ou atestados de óbito. Em uma das famílias (14.3%) dados adicionais sobre os diagnósticos de câncer refutaram a hipótese inicial de HBCC e, portanto, apesar desta família inicialmente preencher critérios para a síndrome, estes não foram confirmados.

A mutação *CHEK2* 1100delC foi detectada em uma das 7 famílias investigadas (14.3%). A família 681 foi incluída por apresentar 2 casos de CCR e 2 casos de câncer de mama. Inicialmente a família foi também analisada quanto à presença de alterações germinativas em *BRCA1/2* já que apresentava uma probabilidade de mutação, conforme tabelas de prevalência de mutações, superior a 30.0%. A análise quanto à presença de alterações nos genes *BRCA* mostrou-se negativa, confirmando estudos que relatam a presença de *CHEK2* 1100delC apenas em famílias negativas para alterações nos genes *BRCA1/2* (The *CHEK2* Breast Cancer Consortium, 2002; Vahteristo *et al.*, 2002). Posteriormente, dados adicionais da história familiar excluíram a existência de critérios clínicos para HBOC nesta família. O fato de termos detectado a alteração em uma de 6 famílias com critérios para HBCC (16.6%) é um dado interessante, já que conforme Cybulski *et al.* (2004), o gene *CHEK2* é típico de uma categoria de genes que conferem um aumento modesto no risco de câncer e, mutações nesses genes são raras e associadas com penetrância moderada. Os pesquisadores afirmam ainda que é difícil estudar esses genes, porque amostras muito grandes são necessárias para identificar riscos relativos significativos. Sendo assim, estudos com tamanho amostral maior estão sendo conduzidos para verificar a frequência da variante *CHEK2* 1100delC em famílias com critérios para HBCC de diferentes estados brasileiros (Abud J., dados não apresentados).

Além de famílias com critérios para síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC) e ao câncer de mama e colo-retal (HBCC), identificamos, através de uma análise criteriosa dos heredogramas, cento e vinte e duas famílias com critérios clínicos para a Síndrome de Li-Fraumeni *like* (66.7% da amostra

com critérios para alguma síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama), fato considerado surpreendente por diversos motivos: a) o estudo foi delineado para identificar primariamente famílias HBOC e embora haja sobreposição de fenótipos, com câncer de mama sendo o tumor mais freqüente em ambas síndromes, ele é apenas um dos tumores do amplo espectro da síndrome LFL; b) SLF/LFL são consideradas síndromes muito raras, com em torno de 370 famílias identificadas em todo o mundo (<http://www-p53.iarc.fr/Germline.html>).

Considerando o fato de o nosso instrumento de inclusão não ter sido inicialmente proposto para detecção de famílias com SLF/LFL, optamos por utilizar critérios amplos, porém bem delimitados, visando à inclusão do maior número de famílias com o perfil SLF/LFL. Entre as famílias selecionadas para este estudo, nenhuma preencheu os critérios inicialmente propostos por Li e Fraumeni (Li & Fraumeni, 1969), o que era esperado por serem estes os critérios mais estritos. A maioria das famílias (97.5%) preenchia os critérios mais abrangentes propostos por Eeles (1995). Treze famílias (10.6%) preenchem os critérios propostos por Birch *et al.* (1994). Os critérios de Birch são intermediários e é comum que famílias que preencham os critérios propostos por esses autores preencham também os critérios menos estritos de Eeles, o que foi também observado em nossa amostra. O número expressivo de famílias com critérios para a síndrome LFL em nossa amostra, é corroborado de certa forma pelos achados de Achatz *et al.* (2007), nos quais, de 45 famílias recrutadas em 3 diferentes centros brasileiros de referência em oncogenética com critérios LFS/LFL, 75.6% eram LFL.

Observamos, em alguns casos, que famílias encaminhadas erroneamente como tendo história familiar de câncer de mama e ovário, foram num segundo momento classificadas como apresentando critérios clínicos para LFL. Apesar de haver consistência em 89.2% dos casos, entre a história familiar relatada no momento da inclusão no estudo e a história familiar relatada durante a ARGC, ocorreram, em alguns casos, inconsistências, na sua maioria relacionadas ao tipo tumoral relatado (Roth FL dados não relatados no presente estudo). Os casos de câncer de ovário freqüentemente não se confirmaram e as famílias foram re-classificadas, sendo que algumas passaram a ser consideradas como LFL, devido ao espectro de tumores, como é o caso das famílias 62, 681 e R729. Conforme Frank *et al.* (2002), uma história familiar de câncer de mama é, tipicamente, mais acurada que a história de câncer de ovário, ocorrendo com freqüência super-estimativas no número

de casos de câncer de ovário relatados pelos pacientes. Apesar dessas limitações, quando confirmada, a história familiar de câncer de ovário é associada a uma maior prevalência de alterações germinativas nos genes *BRCAl/2* que uma história que apresente apenas casos de câncer de mama.

Das 122 famílias com critérios clínicos para pesquisa de mutações germinativas em *TP53*, 40 (32.8%) optaram pela sua realização. Do total de famílias testadas, 11 preenchem os critérios propostos por Birch *et al.* (1994), e, as demais foram incluídas através dos critérios clínicos propostos por Eeles (1995), sendo importante ressaltar que várias famílias preenchem mais de um critério de inclusão.

O espectro tumoral verificado nas famílias analisadas foi bastante amplo. De um total de 275 casos de câncer nestas famílias, encontramos, em frequência decrescente, câncer de mama (71 casos, sendo 8 bilaterais), próstata (23 casos), CCR (22 casos), SNC (21 casos), leucemia (17 casos), endométrio e colo de útero (11 e 3 casos, respectivamente). Não verificamos em nossa amostra casos de câncer adrenocortical (segundo tumor mais freqüente na síndrome, de acordo com os dados depositados junto ao IARC) (IARC *TP53* Database v. R11). Quatro casos de sarcoma foram detectados na amostra, sendo que três foram comprovados com laudos anátomo-patológicos. Além disso, havia na amostra casos de câncer de pulmão, estômago, esôfago, ovário, pâncreas, pele, linfoma, bexiga, rim, melanoma, câncer ósseo, tumor de Wilms, meduloblastoma, testículo e 16 tumores de diagnóstico histopatológico ou topográfico desconhecido. Foram relatados 2 casos de “câncer na perna” em idades jovens, possivelmente sarcomas, mas por falta de comprovação anátomo-patológica, não foram classificados como tal. A maioria das famílias analisadas apresentava uma combinação de tumores de mama e próstata (7 casos, 17.0%), mama e leucemia (6 casos, 14.6%), e, mama e SNC (6 casos, 14.6%). As demais famílias apresentavam uma combinação diferente de tumores, porém tumores mamários estavam presentes em 83.0% das famílias analisadas. O fato de termos verificado uma ampla gama de tumores além dos já associados à LFL já foi relatado por outros pesquisadores. Nichols *et al.* (2001) verificaram que 23.0% dos 738 tumores analisados não encontravam-se descritos como compondo o espectro tumoral clássico de SLF/LFL.

O fato de o câncer de mama ser o mais freqüentemente relatado pelas famílias com critérios clínicos para LFL está de acordo com os dados armazenados junto ao IARC (<http://www-p53.iarc.fr/Germline.html>). No entanto, observa-se um aumento de freqüência

de CCR, a qual é a terceira neoplasia mais freqüente em nossa amostra e décima em freqüência no banco de dados de mutações germinativas de *TP53*, com apenas 16 casos relatados (banco de dados de *TP53* do IARC, versão R11). Dados publicados por Achatz *et al.* (2007) também apontam para uma alta freqüência de casos de câncer colo-retal. Em estudo analisando 45 famílias brasileiras com critérios clínicos para SLF/LFL, os pesquisadores verificaram a presença de CCR em 15/45 (33.3%) das famílias, sendo que em 10 dessas famílias não foi detectada nenhuma mutação em *TP53*. Além disso, recente estudo realizado por Wong *et al.* (2006) relatou uma alta prevalência de casos de CCR em 397 pacientes de vários países analisados para a presença de mutações em *TP53*. Uma análise combinada dos casos de CCR em famílias brasileiras (incluindo algumas pacientes deste estudo) foi submetida para publicação (Achatz, MIW, anexo 12.2.12). A exemplo dos dados depositados junto ao banco de dados de *TP53*, a incidência de câncer de próstata e de tumores hematológicos foi consideravelmente alta na presente amostra. Uma hipótese a ser explorada é que o fenótipo LFL associado a CCR possa estar associado a mutações fora da região codificante de *TP53* e/ou em outros genes relacionados ao *TP53*. Esta hipótese poderia explicar parcialmente a observação de Achatz *et al.* e a ausência de mutações germinativas na grande maioria dos pacientes de nosso estudo.

Em 10 das 40 famílias analisadas o probando era não-afetado, ou seja, não apresentava história pessoal prévia de câncer. Em 4 das 10 famílias nas quais indivíduos assintomáticos foram testados, não havia familiar afetado vivo para teste e não conseguimos obter os blocos dos tumores mesmo após diversas tentativas. Em 3 famílias havia algum afetado vivo, porém não havia qualquer forma de contato entre nosso paciente e seu familiar. Em uma família (303) havia familiares vivos e próximos à paciente, porém os mesmos recusaram-se a participar do estudo e, considerando o fato de a mãe da paciente e seu filho apresentarem história pessoal de câncer, a paciente foi considerada portadora obrigatória caso uma mutação deletéria existisse na família. Na família 678 a situação foi similar, praticamente todos os familiares afetados estavam falecidos, exceto o filho da paciente, sendo este menor de 15 anos. Assim, optou-se por testar a paciente mesmo assintomática, já que caso uma mutação em *TP53* fosse a explicação para os casos de câncer da família, a paciente em questão seria uma portadora obrigatória da alteração. Ainda, na família 440, a coleta ocorreu após a paciente apresentar laudo médico atestando

presença de sarcoma, porém laudo anátomo-patológico obtido posteriormente à coleta contrariou laudo médico, afirmando tratar-se de um cisto ósseo e não um sarcoma.

Laudos anátomo-patológicos e/ou atestados de óbito foram obtidos para 65.8% das famílias com história indicativa de LFL, o que representa um percentual alto, dadas as dificuldades tanto na mobilização de outros membros da família para a obtenção de comprovantes de óbitos que muitas vezes ocorreram há mais de 20 anos, quanto pelas dificuldades relacionadas à obtenção dos comprovantes junto aos hospitais e laboratórios.

Dentre as 40 famílias testadas, mutação germinativa deletéria foi detectada em apenas uma delas (2.5%). Trata-se de uma mutação germinativa de ponto do tipo troca de sentido no códon 273 do gene *TP53* e que leva a substituição de uma arginina por uma cisteína (R273C). Essa alteração já havia sido verificada em vários indivíduos provenientes de 8 famílias procedentes da França, Reino Unido e Estados Unidos. A alteração está localizada no domínio central do gene *TP53*, região responsável pela ligação seqüência-específica ao DNA. A família na qual a mutação foi detectada (R729) foi inicialmente incluída no presente estudo por apresentar dois casos de câncer de ovário. Porém, durante as sessões de ARGC, verificamos que tratavam-se, na verdade, de um mioma uterino em uma paciente e de um câncer de colo de útero na outra. No entanto, a família paterna do caso índice apresentava critérios para LFL, com pai diagnosticado com tumor de SNC aos 61 anos, tio paterno com câncer de próstata em idade incerta e, o avô com tumor de SNC também em idade incerta. Com a presença de pelo menos dois tumores do espectro LFL na família foi indicado o teste (critérios de Eeles 1). Ressalta-se porém, que esta família não apresenta nenhum caso de câncer de mama e que os diagnósticos de câncer ocorreram em idade tardia. Famílias como esta poderiam não ser consideradas como de alto risco genético em muitos serviços clínicos e atestam o pouco conhecimento acerca do fenótipo associado a mutações germinativas em *TP53* no nosso meio. Para a realização do teste genético, DNA genômico foi extraído do tecido normal adjacente ao tumor de SNC emblocado em parafina do pai da paciente.

Apesar dos critérios de seleção para famílias LFL serem amplos, de em alguns casos não ser possível a confirmação dos tumores e de que em boa parte das famílias (25.0% da amostra) o probando era não-afetado, o baixo número de mutações germinativas detectado nos surpreendeu, dado o alto risco e o amplo espectro tumoral apresentado por algumas famílias, como, por exemplo, a família 290, a qual apresenta um indivíduo com

sarcoma diagnosticados antes dos 20 anos de idade (comprovado com laudo anátomo-patológicos), além de casos de câncer do SNC, CCR, próstata e mama todos previamente vinculados à SLF/LFL (Birch *et al.*, 1994; Eeles, 1995). Na literatura corrente a prevalência de mutações germinativas de *TP53* em famílias LFL varia de 22.0% a 61.5% das famílias com os critérios de Birch e de 8.0% a 30.8% das famílias com os critérios de Eeles (Varley *et al.* 1997b; Achatz *et al.*, 2007).

O baixo número de mutações encontradas motivou a realização de investigações adicionais, atualmente em planejamento ou já iniciadas, incluindo análise de rearranjos no gene *TP53*, seqüenciamento das regiões intrônicas de todo o gene, procura por alterações em outros genes funcionalmente relacionados a *TP53*, como *MDM2*, além de uma análise detalhada da possível influência que polimorfismos nesse gene podem exercer no risco de diversos tipos de câncer.

Ainda, dada a sobreposição de fenótipos entre as diferentes síndromes de predisposição ao câncer consideradas no presente estudo, diversas famílias foram analisadas quanto à presença de alterações germinativas em mais de um gene de predisposição. Tivemos, assim 8 famílias (6, 101, 186, 442, 520, 554, 590 e 736) analisadas para a presença de alterações nos genes *BRCA1/BRCA2* e *TP53*; 2 famílias (439 e 681) analisadas quanto à presença de mutações em *BRCA1/BRCA2* e *CHEK2*; 3 famílias (25, 103 e 284) investigadas para os genes *TP53* e *CHEK2* e uma família (552) investigada para mutações nos quatro genes de predisposição. A probanda da família 681, conforme já descrito apresenta a alteração 1100delC no gene *CHEK2*. Além disso, foi testada para alterações nos genes *BRCA*, dado que inicialmente apresentava probabilidade estimada de mutação em genes *BRCA* superior a 30.0%. Posteriormente a história sugestiva de HBOC não se confirmou. As demais famílias analisadas quanto à presença de alterações germinativas em mais de um gene de predisposição foram consideradas “normais”, isto é não apresentam mutações germinativas deletérias nos genes em questão, apenas polimorfismos no gene *TP53* e alterações possivelmente e/ou provavelmente deletérias nos genes *BRCA1/2*, mas que necessitam de investigações adicionais para comprovação da patogenicidade.

Ao longo do processo de ARGC e durante a realização do teste genético, as famílias em risco continuaram sendo acompanhadas pela equipe de genética. Com isso, tivemos a oportunidade de revisar a história familiar de muitas das 50 famílias e

observamos que houveram vários casos novos de câncer, reiterando a suspeita clínica de uma determinada síndrome de predisposição. Por outro lado, também tivemos acesso a laudos anátomo-patológicos, cópias de prontuários médicos e atestados de óbito adicionais em várias famílias e alguns casos relatados de câncer não foram comprovados. O exemplo mais marcante é de uma paciente jovem (família 440), que havia trazido cópia de relatório manuscrito de um médico e descrição de tratamento quimioterápico para um osteossarcoma e que posteriormente nos trouxe diversos laudos anatomo-patológicos de cirurgias e biópsias da região que não evidenciaram malignidade, apenas um cisto ósseo aneurismático.

Sendo assim, em 4 famílias o fenótipo para indicação do teste de um determinado gene de predisposição deixou de existir, incluindo uma família que deixou de ter critérios para HBOC; uma família que deixou de ter critério para HBCC e 2 famílias que deixaram de ter critérios para LFL. Sendo assim a prevalência de mutações reconhecidamente deletérias em nossa amostra foi de 1/38 famílias LFL (2.6%) (uma família positiva para a alteração R273C) e 1/6 famílias HBCC (16.7%). Como já mencionado anteriormente, nenhuma mutação sabidamente deletéria foi encontrada nos genes *BRCA* em 17 famílias que preenchem critérios HBOC pela história relatada, em alguns casos com confirmação dos diagnósticos de câncer na família, sendo necessários estudos adicionais para definir qual é a prevalência de mutações germinativas nesse grupo.

No artigo científico, portanto são apresentadas as análises moleculares realizadas de todas as pacientes, incluindo estas que posteriormente apresentaram uma modificação na sua história familiar, porém nas conclusões da tese, para fins de determinação da prevalência de mutações germinativas nos grupos com os diferentes fenótipos consideramos o número atual de famílias com critérios fenotípicos para cada uma das síndromes de acordo com a história relatada e/ou confirmação de diagnósticos de câncer obtidos até o momento.

Como resultado das observações relatadas acima, fica evidente que a história familiar de câncer é dinâmica e com a situação real que enfrentamos em nossos atendimentos diários, apesar de todas as dificuldades, um grande esforço deve ser feito para obter o máximo de confirmação dos diagnósticos de câncer em dada família antes da realização do teste genético. É fundamental que se estimule o acompanhamento prospectivo das famílias de maior risco para poder identificar estas mudanças e é preciso

transmitir aos pacientes e a seus “cuidadores” a importância de conhecer a própria história e guardar bons registros acerca das patologias que acometem a família.

Mesmo considerando o baixo índice de mutações germinativas detectadas, consideramos a abordagem múltipla e ampla aqui realizada como sendo fundamental na avaliação de famílias em risco para câncer de mama hereditário (Walsh *et al.*, 2006). Apesar da complexidade de tal avaliação (a qual foi muito além dos objetivos inicialmente propostos para o presente trabalho, os quais envolviam apenas a análise dos genes *BRCA1* e *CHEK2*), essa abordagem será necessária até que tenhamos uma idéia mais clara da prevalência, penetrância e efeito fenotípico de mutações em genes de predisposição em nosso meio. Assim, nossa estratégia é de investigar, de forma detalhada, o máximo número de possibilidades que estão ao nosso alcance no momento, antes de considerar uma família como sendo realmente negativa para alterações em genes de predisposição ao câncer de mama. Novas hipóteses que expliquem esta significativa ocorrência de histórias familiares de alto risco e não correlacionadas a mutações em genes de predisposição comumente analisados devem ser buscadas, inclusive para verificar a aplicabilidade dos critérios conhecidos para diagnóstico clínico das síndromes de predisposição hereditária ao câncer de mama.

8.3 Estudos adicionais: prevalência da mutação *TP53* R337H em mulheres assintomáticas participantes em programa de rastreamento mamográfico

Em 2001, estudo realizado em Curitiba, Paraná, pelos pesquisadores Ribeiro *et al.*, avaliou 36 crianças com história pessoal de carcinoma adrenocortical (CADC). Os autores investigaram essas crianças quanto à presença de mutações no gene *TP53*, já que alterações nesse gene levam a um aumento no risco de desenvolvimento de uma gama de tumores incluindo CADC, muitos deles ainda na infância e, detectaram, em 35 das 36 crianças uma mutação no códon 337 do gene *TP53*, no domínio de oligomerização da proteína p53. A ausência de outros tumores nas famílias e estudos funcionais posteriores levaram os autores a concluir que tratava-se de uma mutação tecido-específica, ou seja que a substituição de uma arginina (CGC) por uma histidina (CAC) no códon 337, exon 10 do gene *TP53* (R337H), levava exclusivamente ao desenvolvimento de carcinoma adreno-

cortical por mecanismo patogênico relacionado ao pH tecidual (DiGiammarino *et al.*, 2002).

Estudos posteriores realizados por Achatz *et al.* (2007) revelaram a presença da mesma alteração (R337H) em 6 de 45 famílias brasileiras com LFL. Ao contrário do proposto por Ribeiro *et al.*, a mutação R337H estava associada à um amplo espectro de tumores .

Considerando a importância dos dados até então encontrados, o grande número de famílias LFL em nossa amostra e, pelo fato de aparentemente haver algum efeito fundador associado a essa variante no Sul do Brasil, decidimos investigar sua frequência em um grupo de 750 mulheres assintomáticas, não selecionadas para história familiar de câncer, com 40 a 69 anos de idade e participantes do programa de rastreamento mamográfico junto ao NMPOA. As pacientes foram analisadas exclusivamente quanto à presença da alteração R337H no exon 10 de *TP53*. Das 750 mulheres analisadas, duas eram heterozigotas para R337H em DNA genômico obtido de sangue periférico. Análise do heredograma das pacientes revelou que pertenciam à mesma família. Investigações em outros familiares demonstraram a presença da mesma alteração na mãe de uma das pacientes e em sua irmã, previamente diagnosticada com câncer de mama aos 36 anos. A família em questão não apresenta critérios para a SLF/LFL, e, além disso, não há também quaisquer indícios ou informações sobre a presença de carcinoma adrenocortical na família, o que contradiz novamente a hipótese de Ribeiro *et al.*, de que esta é uma mutação de efeito tecido-específico. Os casos de câncer relatados nessa família incluem: dois tumores de cabeça e pescoço (um posterior aos 50 anos de idade e um em idade inferior a 30 anos), dois casos de carcinoma gástrico, um caso de câncer de pulmão e um caso de câncer de pâncreas em idade avançada, diagnosticado posteriormente à coleta de sangue e liberação do resultado (anexo 12.1.4). A presença da mutação germinativa em vários familiares não-afetados por câncer (tendo uma delas 80 anos de idade), a ausência de uma história familiar compatível com SLF/LFL e a ausência de tumores adrenocorticais sugerem ser esta uma variante comum de baixa penetrância. Não é possível descartar a hipótese de que R337H esteja em desequilíbrio de ligação com algum outro alelo e, talvez, a combinação de alelos variantes/normais seja responsável pelas diferenças observadas na expressão fenotípica associada. A família na qual detectamos a alteração foi avaliada devido à história familiar de câncer de mama abaixo dos 50 anos sendo considerada uma família de baixo risco por

não apresentar critérios para nenhuma síndrome de predisposição hereditária ao câncer. Atualmente a família está recebendo acompanhamento multidisciplinar e foi incluída em programas de rastreamento de diversos tumores. O teste foi disponibilizado a outros familiares em risco.

As investigações em relação a essa alteração germinativa continuam (projeto paralelo em desenvolvimento) e apontam para novas e interessantes descobertas, com a comprovação de efeito fundador associado à mutação R337H, além da descoberta de outra família (em Portugal) com a mesma alteração (Hainaut P dados não apresentados no presente estudo) e com presença de múltiplos tumores na família.

8.4 Estudos adicionais: polimorfismos no gene *TP53*

Identificamos em nossa amostra diversos polimorfismos no gene *TP53*. O polimorfismo 11827 (troca de G>C), no íntron 2 (Pleasant & Hansen, 1994) foi verificado em 10 das 22 famílias estudadas. Dezenove famílias foram analisadas a partir do exon 4 apenas, por material insuficiente ou falha na amplificação por PCR (no caso de blocos de parafina). Porém acreditamos que esse fato não apresente grande relevância no número de alterações polimórficas detectadas, já que a literatura aponta que em torno de 90.0 a 95.0% das alterações encontram-se distribuídas ao longo do domínio central do gene (exons 4 a 9), sítios considerados “*hot spots*” do gene *TP53* (Bougeard *et al.*, 2003). Além disso, analisamos todas as paciente até o exon 11, e não apenas até o exon 9. Outros polimorfismos encontrados foram uma inserção de 16 pb no íntron 3 (5' ACCTGGAGGGCTGGGG³), na posição 11951 (Lazar *et al.*, 1993), presente em 8 das 21 famílias estudadas; uma substituição de arginina (CGC) por prolina (CCC) no códon 72 do exon 4 (verificada em 15 das 40 famílias analisadas) (Cheng & Gartler, 1994); uma transição de G>A, que leva a uma substituição “sinônima” prolina/prolina no códon 36, também no exon 4 (em 2 pacientes) (Felix *et al.*, 1994); uma substituição intrônica T>G, intron 7, posição 14201 (Berggren *et al.*, 2001), em 3 das 40 pacientes analisadas e, ainda uma substituição de T>C no intron 9 (nucleotídeo 14766) verificado em 1 paciente investigada (Graziani *et al.*, 1999). Todos os polimorfismos detectados em nossa amostra já haviam sido descritos previamente e estavam depositados junto ao banco de dados de *TP53* (<http://www-p53.iarc.fr/PolymorphismsView.asp>).

Apesar de haver contradições na literatura, diversos estudos indicam um risco aumentado de câncer para portadores do polimorfismo Arg-Pro no códon 72 do exon 4 (PEX4), estando o alelo Pro72 associado a um risco aumentado de câncer de pulmão (Wu *et al.*, 2002). Além do PEX4, o polimorfismo no intron 3 (ins 16pb – PIN3) foi associado por alguns pesquisadores a um aumento no risco de câncer de mama, ovário e pulmão (Runnenbaum *et al.*, 1995; Wang-Gohrke *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2002).

Estudos realizados por Marcel (Marcel V) apontam para uma nova e interessante hipótese envolvendo os polimorfismos no intron 2 (PIN2), intron 3 (PIN3) e o polimorfismo no códon 72 do exon 4 (PEX4). Segundo essa hipótese, uma das isoformas do gene *TP53*, $\Delta Np53$, não apresenta a região N-terminal, sendo assim desprovida da sua região de transativação e, dessa forma, não seria ativada pela presença de algum estresse genotóxico (como ocorre com a isoforma “normal” de *TP53*). Essa isoforma surge a partir da retenção do intron 2 no transcrito final, e pela conseqüente iniciação da transcrição junto ao códon 40 (devido ao fato de o intron 2 apresentar vários códons de parada) (Courtois *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2002; Ghosh *et al.*, 2004). Considerando que os polimorfismos PIN2, PIN3 e PEX4 de *TP53* estão situados em uma região de 500 pb que se estende do intron 2 ao final do exon 4 e que contém o sítio alternativo de iniciação, no códon 40, Marcel realizou diversas análises moleculares e funcionais no intuito de verificar se o aumento no risco de várias neoplasias, muitas vezes associado ao polimorfismo no códon 72, não seria causado pelo polimorfismo no intron 2, o que levaria à sua retenção no transcrito final e à conseqüente formação de $\Delta Np53$. Os resultados de Marcel indicam que as combinações dos genótipos GG NN AA, CC DD PP e GC ND AP (representando cada uma em torno de 25.0% das combinações de genótipos) são produtos da associação dos alelos GNA e CDP, as demais combinações aparecem em uma freqüência inferior a 10.0%, sendo devidas aos alelos GDA ou CNP (extremamente raros). Em todos os casos observados, ocorre uma associação entre uma guanina (G) no intron 2 e uma Arginina no exon 4, ou uma citosina (C) no intron 2 e uma Prolina no exon 4, demonstrando um forte desequilíbrio de ligação entre os polimorfismos PIN2 e PEX4. O PIN3 parece ser independente dos outros dois e seu papel no risco aumentado de câncer sugerido por alguns pesquisadores parece estar relacionado às conseqüências funcionais que sua presença acarreta na estrutura da proteína p53, onde a presença da duplicação de 16 pb parece influenciar na estabilidade da estrutura conformacional da proteína.

Motivados pelos estudos de Marcel e pelo baixo número de mutações detectadas em nossa amostra, decidimos verificar a frequência com que os diferentes genótipos e haplótipos aparecem em nossa população, verificar também se os mesmos apresentam desequilíbrio de ligação e posteriormente realizar estudos de segregação entre a presença desses polimorfismos e história familiar de câncer (projeto paralelo, estudo em andamento). Além das 40 famílias com critérios para LFL, optamos por testar também (após preenchimento de TCLE) um grupo de 300 mulheres de 40 a 69 anos de idade, não-selecionadas pela história familiar. Resultados preliminares confirmam uma maior frequência dos haplótipos GNA/CDP (Palmero EI). Porém, verificamos em nosso grupo amostral a presença de novas “combinações alélicas” não-relatadas previamente e não detectadas no grupo de 122 pacientes investigadas por Marcel, apresentando esses alelos uma combinação entre a presença de uma guanina no intron 2 e uma Prolina no exon 4 e, uma citosina no intron 2 e uma arginina no exon 4. A relevância desse achado para a suscetibilidade aumentada ao câncer ainda é desconhecida. Porém acreditamos que a investigação aprofundada desses resultados e da frequência desses polimorfismos em nossa população poderá auxiliar na compreensão do risco aumentado de câncer nas famílias analisadas e da ausência de mutações em sua grande maioria. A presença de combinações alélicas não descritas previamente pode ser mais um indicativo de que o genótipo associado a um determinado fenótipo de predisposição hereditária ao câncer pode ser população-específico.

9. CONCLUSÕES

9. CONCLUSÕES

1) A prevalência de história familiar positiva de câncer de mama, ovário e/ou CCR em uma amostra de mulheres atendidas em unidades do Programa Saúde da Família de Porto Alegre foi de 13.9% (1286/9234).

2) Entre as mulheres com história familiar positiva de câncer de mama, ovário e/ou CCR, houve um bom índice de aceitação dos encaminhamentos para ARGC: das 1247 mulheres com idade igual ou superior a 18 anos encaminhadas, 902 (72.3%) compareceram efetivamente às sessões de ARGC;

3) Das 902 pacientes atendidas para ARGC, 214 (23.7%) provenientes de 183 famílias preenchiam critérios clínicos para inclusão em síndromes de predisposição hereditária ao câncer de mama, conforme a história pessoal e familiar relatada de câncer.

4) As famílias com critérios para predisposição hereditária ao câncer de mama se distribuíram da seguinte forma: 65 famílias (35.5%) com critérios para HBOC, 122 famílias (66.7%) com critérios para LFL e 22 famílias (12.0%) com os critérios para HBCC.

5) A proporção de famílias com critérios para LFL entre todas as famílias do grupo foi surpreendente, considerando a utilização de um instrumento de inclusão no estudo não delineado especificamente para detecção deste fenótipo.

6) Um número significativo de famílias com critérios para predisposição hereditária ao câncer de mama apresentou mais de um critério: 25/183 famílias (13.7%).

7) Utilizando um questionário para identificação de mulheres em risco para câncer de mama hereditário ao nível da comunidade, a maioria das pacientes avaliadas, após entrevista com geneticista clínico, não preenchia os critérios de inclusão para as síndromes de predisposição hereditária ao câncer mais comuns (688/902, 76.3%) e, 633 (92.0%) apresentavam um risco cumulativo vital de desenvolver câncer de mama baixo (< 20.0%).

8) Com a metodologia utilizada, um número considerável de mulheres (risco moderado, n= 55 e alto risco, n = 214 [total 269/902; 29.8%]) com alguma história familiar de câncer foi encaminhada para programas de rastreamento mais intensivos para detecção do câncer de mama e/ou outros tumores.

9) A probabilidade média de mutação em genes *BRCA*, entre as 65 famílias com critérios para a síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário (HBOC) utilizando dois modelos distintos (tabelas de prevalência de mutação e modelo Couch modificado) foi de 21.9% (SD 13.9%) e 25.7% (SD 14.8%), respectivamente.

10) O índice de aceitação do teste genético nas famílias com indicação para o teste foi de 27.3% (50/183 famílias), bem menor que a aceitação do processo de ARGV (aderência ao encaminhamento 72.3%). Os principais motivos de não-aderência à indicação do teste genético foram: a) dificuldade de contato com familiares afetados – ainda aguardando contato (36.5%); inexistência de familiares vivos afetados e disponíveis para teste (12.2%); impossibilidade de contato com familiares vivos afetados (5.3%); recusa do familiar afetado em participar (20.3%); desistência no decorrer do processo de ARGV (18.9%); opção pela não-realização do teste (0.7%).

11) Alteração germinativa deletéria em *TP53* foi identificada em somente 1 de 38 famílias com critérios para a síndrome Li-Fraumeni-like. Esta alteração, (R273C) já foi descrita em 9 famílias com o fenótipo SLF/LFL.

12) A análise de 17 famílias com critérios para a síndrome HBOC, quanto à presença de mutações germinativas ao longo de toda a seqüência codificante do gene *BRCA1* não evidenciou nenhuma alteração deletéria conhecida. Foram identificadas 12 alterações, sendo 3 delas intrônicas e as demais exônicas do tipo mutação de ponto de sentido trocado. Nove não estão associadas a fenótipo de doença possíveis efeitos clínicos; uma alteração (Q365R) já foi descrita, mas tem significado clínico desconhecido e duas alterações não foram descritas previamente estando seu significado clínico a definir.

13) A análise da região codificante do gene *BRCA2* nas 17 famílias com critérios clínicos para HBOC revelou a presença de 21 alterações, sendo que 9 delas não haviam sido descritas previamente na literatura. Das 13 variantes já descritas, 9 foram consideradas sem significado clínico e, 3 previamente classificadas como variantes de significado desconhecido.

14) Não foram encontrados grandes rearranjos gênicos em *BRCA1* nas 17 famílias HBOC estudadas pela técnica de PCR longo.

15) A análise de 6 famílias com critérios clínicos para HBCC quanto à presença da mutação germinativa *CHEK2* 1100delC demonstrou presença da mutação em uma das famílias (16.7%).

16) Limitações importantes identificadas no estudo de caracterização de uma amostra populacional de alta vulnerabilidade social quanto ao risco para câncer de mama hereditário incluem: a) potenciais barreiras sociais, culturais, educacionais e econômicas dos integrantes da amostra quanto à aceitação e aderência às medidas preconizadas; b) dificuldade em estabelecer com certeza os diagnósticos nos familiares afetados por câncer e, c) limitado tamanho amostral para realização dos estudos moleculares.

17) Apesar dos critérios relativamente estritos utilizados para inclusão no teste genético e da ampla metodologia utilizada na análise molecular de genes de predisposição, o alto risco de câncer atribuído à maioria das famílias em decorrência da história familiar relatada de câncer permanece inexplicado. Mesmo considerando as diversas limitações citadas anteriormente, o presente estudo origina diversos questionamentos sobre a importância dos fatores genéticos na determinação das altas taxas de incidência e mortalidade por câncer de mama verificadas no Sul do Brasil. Estudos adicionais devem ser realizados no intuito de investigar a prevalência de fatores de risco genéticos e não-genéticos que possam explicar a alta incidência de câncer de mama e o alto risco de câncer de determinadas famílias desta comunidade.

18) Estudos mais amplos a nível nacional, padronizados quanto aos critérios para indicação do teste genético, modelos de avaliação de risco utilizados e envolvendo grande número de indivíduos serão necessários para validar os diferentes modelos, verificar a aplicabilidade, sensibilidade e especificidade dos critérios de diagnóstico clínico/indicação do teste genético para as principais síndromes de predisposição hereditária ao câncer de mama em nosso meio e recomendar, dessa forma, a melhor estratégia de ARGC. Estudos moleculares adicionais tais como métodos alternativos para estudo de rearranjos em *BRCAl* e *TP53*, análise mais detalhada das regiões intrônicas do gene *TP53*, bem como de outros genes envolvidos na mesma rota molecular, e análise de segregação genótipo/fenótipo nas famílias HBOC com variantes de significado incerto e/ou desconhecido devem ser conduzidos.

19) Em uma amostra de 750 mulheres sem câncer de mama e não-selecionadas para história familiar com idades entre 40-69 anos foi verificada uma prevalência de 0.3% para a mutação germinativa R337H em *TP53*, em duas mulheres de uma mesma família com múltiplos tumores mas, inicialmente, sem critérios clínicos para o diagnóstico de LFS/LFL. A presença desta alteração em mulheres submetidas a rastreamento mamográfico e não-selecionadas para história familiar, indica que seja bem mais prevalente nessa comunidade do que o esperado para outras mutações germinativas em *TP53*. Além disso, a presença da mutação em uma família com múltiplos tumores e sem carcinoma adrenocortical reforça que esta é uma mutação associada a um amplo espectro tumoral. Por fim, a presença da mutação em indivíduos não-afetados por câncer já em idade avançada nessa família corrobora indicativos anteriores de que seja uma mutação associada a penetrância incompleta do fenótipo LFL.

20) A avaliação de risco é um processo complexo que envolve diferentes aspectos da história médica pessoal e familiar de cada paciente e requer análise criteriosa do heredograma. Por esse motivo, a utilização de múltiplos modelos de estimativa de risco deve ser preconizada para determinar uma faixa de risco dentro da qual a paciente se encontra e que auxiliará a equipe de saúde a definir a melhor estratégia de acompanhamento clínico da paciente e seus familiares em risco. Apesar dos modelos aqui

utilizados não estarem validados para uso no Brasil, eles são os únicos disponíveis e, em conjunto com a avaliação clínica, permitiram classificar a amostra em categorias de risco.

10. CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

10. CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

O presente estudo abrange, além de um enfoque científico, na tentativa de identificar novas alterações em genes de predisposição e aumentar a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento do câncer, também um enfoque social, ao possibilitar que uma população de baixa escolaridade e que vive em condições de extrema pobreza tenha acesso, não somente a medidas de prevenção de doenças (propiciadas pela coorte NMPOA) como também ao conhecimento de si própria, da sua história familiar, das conseqüências que essa história pode trazer para a sua vida, sua saúde e a de seus filhos. Tivemos como meta, em todas as etapas da presente investigação, respeitar o livre arbítrio das pacientes em optar, após receber informação o mais completa possível acerca do risco. As informações transmitidas incluíram explicações quanto ao que é o câncer de mama e o câncer de mama hereditário, qual o risco estimado de desenvolver câncer de mama ao longo da vida, como realizar o auto-exame das mamas (em oficinas de auto-exame da mama realizadas durante os mutirões de recrutamento) e qual a importância de realizar mamografias anuais a partir dos 40 anos de idade. A opção realizada pela paciente e por seus familiares, seja esta de participar ou não das sessões de ARGC e do teste genético foi em todo momento considerada prioridade, estando estes cientes das opções disponíveis caso decidissem prosseguir ou não com as investigações.

Procuramos, em todos os momentos respeitar as peculiaridades sociais e culturais da nossa amostra, seja adaptando a linguagem científica, de forma a torná-la mais “corriqueira”, seja fornecendo vale-transportes para que as pessoas interessadas, porém sem recursos financeiros para tal, pudessem deslocar-se de suas casas até o NMPOA, local onde as avaliações genéticas foram realizadas.

Além disso, buscamos uma interação entre diferentes setores da comunidade, realizando nossa pesquisa juntamente com a equipe da saúde da mama, com grupos voluntários (como o Instituto da Mama) e, principalmente, com o auxílio dos agentes comunitários de saúde que são membros da própria comunidade e, como tal, conhecedores da realidade das pacientes, dos seus anseios e limitações. Para auxiliá-los na tarefa de recrutamento das pacientes, bem como envolvê-los no estudo, realizamos os diversos treinamentos, não somente na estrutura física do NMPOA como também junto aos postos de saúde em que atuam. Conforme Smith *et al.* (2006), o elemento central para o

diagnóstico acurado e a detecção de pacientes em risco para o câncer de mama reside no conhecimento e preocupação com a saúde da mama por parte da população e dos profissionais que estão realmente envolvidos no cuidado primário à saúde. Portanto, a educação em relação à saúde da mama é um elemento chave de intervenção e deve ser oferecido a todos os níveis envolvidos nessa atividade.

Nos deparamos, ao longo do estudo, com diversas barreiras e limitações, tais como falta de motivação das pacientes para o estudo. Considerando as condições sócio-econômicas da maioria da população envolvida, as prioridades residem em satisfazer as necessidades básicas de sua família (alimentação, moradia, garantir o trabalho de cada dia), o que muitas vezes culminou num alto índice de desistências e não-comparecimento às consultas; dificuldades de deslocamento até o NMPOA; trocas constantes dos profissionais de saúde dos postos, além de outras barreiras, principalmente culturais, como religião, crenças e misticismos pessoais, a fatalidade a que é associada a palavra “câncer”, o fato de não poder ir às consultas sem a permissão do cônjuge, dentre outras.

Entre os benefícios do estudo, destacamos a importância de um maior conhecimento da comunidade em geral sobre os diferentes aspectos envolvidos na prevenção do câncer, a possibilidade de delineamento de medidas preventivas específicas para a população, baseadas não somente em dados da literatura, mas, principalmente em dados oriundos de seus próprios membros. Cabe destacar ainda que todas as famílias consideradas em risco, estão recebendo acompanhamento médico periódico (no mínimo semestral) com equipe especializada, recurso esse dificilmente disponibilizado à população de regiões consideradas de baixo desenvolvimento econômico.

Em relação ao aspecto molecular da presente investigação, cabe ressaltar a importância da detecção e investigação de famílias em risco para uma síndrome hereditária de predisposição ao câncer, considerando as variadas opções que podem ser oferecidas à maioria das pacientes e o benefício que estas medidas podem trazer na redução da morbimortalidade causada pelo câncer de mama. Além disso, conforme enfatizado por Couzin (2003), embora não possamos ainda oferecer aos pacientes estimativas precisas do risco conferido pelas diferentes mutações, sabemos, *a priori*, que o RCV conferido pelas mutações em genes *BRCA*, por exemplo, varia de 40.0% a 65.0% para câncer de mama e 15.0% a 40.0% para câncer de ovário, o que é extremamente elevado se comparado ao

risco populacional, que é de 10.0% para o câncer de mama e 1.0% a 2.0% para o câncer de ovário.

Como ocorre na maioria dos estudos científicos, um número grande de questões foram levantadas com este estudo. Estas incluem, entre muitas outras, questões acerca da aplicabilidade dos critérios atualmente aceitos internacionalmente para síndromes de predisposição ao câncer em nossa amostra, acerca da penetrância e prevalência de mutações germinativas em genes de predisposição e acerca das estratégias possíveis para melhorar os índices de confirmação dos diagnósticos de câncer nas famílias estudadas. Não há dúvida que deve haver continuidade para este estudo, com recrutamento de um número maior de famílias em risco, envolvendo um número maior de regiões além dos 18 postos de saúde já cadastrados e, ampliando o instrumento de inclusão, de forma a contemplar tumores característicos da SLF/LFL, tais como sarcomas, tumores hematológicos e de SNC e tumores diagnosticados na infância. Estudos moleculares adicionais tais como métodos alternativos para estudo de rearranjos em *BRCA1* e *TP53*, análise mais detalhada das regiões intrônicas do gene *TP53*, bem como de outros genes envolvidos na mesma rota bioquímica, e análise de segregação genótipo/fenótipo nas famílias HBOC com variantes de significado incerto e/ou desconhecido.

Diante disso as seguintes estratégias de continuidade estão sendo planejadas e/ou foram implementadas:

a) Em andamento:

- Estudos de associação e segregação genótipo/fenótipo nas famílias HBOC com variantes de significado incerto e/ou desconhecido detectadas nos genes *BRCA1/2*;
- Análise do maior número possível de familiares dos dois pacientes para os quais foram detectadas alterações germinativas (no gene *TP53* e *CHEK2*);
- Análise de rearranjos no gene *BRCA1* através da técnica MLPA, para complementação dos resultados obtidos com o PCR longo;
- Seqüenciamento das regiões intrônicas do gene *TP53*, inicialmente nas famílias consideradas de mais alto risco e, numa segunda etapa, nas 39 famílias negativas para mutações nas regiões codificadoras do gene *TP53*;

- Investigação detalhada da família positiva para R337H, no intuito de identificar a “origem” dessa alteração cujo efeito fundador já foi comprovado;
- Além disso, diversos projetos paralelos estão sendo desenvolvidos por outros membros do nosso grupo de pesquisa e foram brevemente descritos e/ou mencionados no decorrer do presente trabalho.

b) Em fase de planejamento:

- Análise de rearranjos no gene *TP53*, com a técnica MLPA, visando verificar sua frequência na nossa amostra;
- Análise de outros genes envolvidos na rota bioquímica de *TP53* (como por exemplo *MDM2*) e investigação quanto à alterações em outros genes que possam estar atuando como modeladores de *TP53*;
- Análise do equilíbrio de Hardy-Weinberg para verificar presença de desequilíbrio de ligação entre os diferentes haplótipos detectados para o gene *TP53*;
- Estudos de correlação entre os diferentes haplótipos encontrados para *TP53* e história familiar de câncer, história reprodutiva, exposição ambiental, dieta, dentre outros;
- Busca de fomento para expansão do presente estudo a outras regiões da cidade de Porto Alegre e, ampliação do questionário de inclusão, com a adição de aspectos que permitam detectar famílias com critérios clínicos para SLF/LFL.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abkevich V, Zharkikh A, Deffenbaugh AM, Frank D, Chen Y, Shattuck D, Skolnick MH, Gutin A and Tavtigian SV (2004) Analysis of missense variation in human BRCA1 in the context of interspecific sequence variation. *J Med Genet* 41:492–507.

Achatz MIW and Hainaut P (2005) TP53 gene and the Li-Fraumeni Syndrome. *Appl Cancer Res* 25:51-57.

Achatz MIW, Olivier M, Le Calvez F, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, Ashton-Prolla P, Giugliani R, Palmero EI, Vargas FR, Da Rocha JC, Vettore AL and Hainaut P (2007) The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett* 245(1-2):96-102.

Ahn SH, Son BH, Son BH, Yoon K, Noh D, Han W, Kim S, Lee ES, Park H, Hong YJ, Choi JJ, Moon SY, Kim MJ, Kim KH, Kwak BS and Cho D (2007) BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Korean breast cancer patients at high risk of carrying mutations. *Cancer Lett* 245(1-2): 90-95.

Amir E, Evans DG, Shenton A, Lalloo F, Moran A, Boggis C, Wilson M and Howell A (2003) Evaluation of breast cancer risk assessment packages in the family history evaluation and screening programme. *J Med Genet* 40(11):807-814.

Anderson DE (1976) Genetic predisposition to breast cancer. *Recent Results Cancer Res.* 57:10-20.

Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, Loman N, Olsson H, Johannsson O, Borg A, Pasini B, Radice P, Manoukian S, Eccles DM, Tang N, Olah E, Anton-Culver H, Warner E, Lubinski J, Gronwald J, Gorski B, tulinius H, Thorlacius S, Eerola H, Nevanlinna H, Syrjakoski K, Kallioniemi OP, thompson D, Evans C, Peto J, Lalloo F, Evans DG and Easton DF (2003) Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 222 studies. *Am J Hum Genet* 72:1117-1130.

Antoniou AC, Pharoah PD, Easton DF and Evans DG (2006) BRCA1 and BRCA2 cancer risks. *J Clin Oncol* 24(20):3312-3313.

Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, Loff S, Back W, Pagenstecher C, McLeod DR, Graham GE, Mangold E, Santer R, Propping P and Friedl W (2005) High proportion of large genomic STK11 deletions in Peutz-Jeghers syndrome. *Hum Mutat* 26:513-519.

Armstrong K, Weber B, Ubel PA, Guerra C and Schwartz JS (2002) Interest in BRCA1/2 testing in a primary care population. *Prev Med* 34(6):590-595.

Arnold K, Kim MK, Frerk K, Edler L, Savelyeva L, Schmezer P and Wiedemeyer R (2006) Lower level of BRCA2 protein in heterozygous mutation carriers is correlated with an increase in DNA double strand breaks and an impaired DSB repair. *Cancer Lett* 243(1):90-100.

ASCO: American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update (2003) Genetic testing for cancer susceptibility. *J Clin Oncol* 21:2397-2406.

ASHG Statement (1975) Ad hoc committee on genetic counseling: genetic counseling. *Am J Hum Genet* 27(2):240-242.

ASHG (1994) Statement of the American Society of Human Genetics on genetic testing for breast and ovarian cancer predisposition. *Am J Hum Genet* 55:1-4.

Athma P, Rappaport R and Swift M (1996) Molecular genotyping shows that ataxia-telangiectasia heterozygotes are predisposed to breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 92:130-134.

Bahassi el M, Penner CG, Robbins SB, Tichy E, Feliciano E, Yin M, Liang L, Deng L, Tischfield JA and Stambrook PJ (2007) The breast cancer susceptibility allele CHEK2*1100delC promotes genomic instability in a knock-in mouse model. *Mutat Res* 616(1-2):201-209.

Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Jessup JM, van Tuinen P, Ledbetter DH, Barker DF, Nakamura Y, White R and Vogelstein B (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 244:217-221.

Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK and Vogelstein B (1990) *Science* 249:912-915.

Barcnas CH, Hosain GM, Arun B, Zong J, Zhou XJ, Chen J, Cortada JM, Mills GB, Tomlinson GE, Miller AR, Strong LC and Amos CI (2006) Assessing BRCA Carrier Probabilities in Extended Families. *J Clin Oncol* 24(3):354-360.

Bartsocas CS, Weber AL and Crawford JD (1970) Acrocephalosyndactyly type III: Chotzen's syndrome. *J Pediatr* 77:267-272.

Bau DT, Mau YC and Shen CY (2006) The role of BRCA1 in non-homologous end-joining. *Cancer Lett* 240(1):1-8.

Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, Kang DH, Wahrer DC, Shannon KE, Lubratovich M, Verselis SJ, Isselbacher KJ, Fraumeni JF, Birch JM, Li FP, Garber JE and Haber DA (1999) Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Science* 286:2528-2531.

Belogianni I, Apeessos A, Mihalatos M, Razi E, Labropoulos S, Petounis A, Gaki V, Keramopoulos A, Pandis N, Kyriacou K, Hadjisavvas A, Kosmidis P, Yannoukakos D and Nasioulas G (2004) Characterization of a novel large deletion and single point mutations in the BRCA1 gene in a Greek cohort of families with suspected hereditary breast cancer. *BMC Cancer* 4:61.

Berggren P, Kumar R, Steineck G, Ichiba M and Hemminki K (2001) Ethnic variation in genotype frequencies of a p53 intron 7 polymorphism. *Mutagenesis* 16(6):475-478.

Bernstein JL, Teraoka S, Haile RW, Borresen-Dale AL, Rosenstein BS, Gatti RA, Diep AT, Jansen L, Atencio DP, Olsen JH, Bernstein L, Teitelbaum SL, Thompson WD and Concannon P (2003) Designing and implementing quality control for multi-center screening of mutations in the ATM gene among women with breast cancer. *Hum Mutat* 21:542-550.

Bernstein JL, Teraoka SN, John EM, Andrulis IL, Knight JA, Lapinski R, Olson ER, Wolitzer AL, Seminara D, Whittemore AS and Concannon P (2006) The CHEK2*1100delC allelic variant and risk of breast cancer: screening results from the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(2):348-352.

Berry DA, Iversen ES, Gudbjartsson DF, Hiller EH, Garber JE, Peshkin BN, Lerman C, Watson P, Lynch HT, Hilsenbeck SG, Rubinstein WS, Hughes KS and Parmigiani G (2002) BRCAPRO validation, sensitivity of genetic testing of BRCA1/BRCA2, and prevalence of other breast cancer susceptibility genes. *J Clin Oncol* 20(11):2701-2712.

Bertwistle D and Ashworth A (1999) The pathology of familial breast cancer: How do the functions of BRCA1 and BRCA2 relate to breast tumour pathology? *Breast Cancer Res* 1(1):41-47.

Birch JM and Blair V (1988) Increase in childhood carcinomas in Northwest England. *Lancet* 1 (8589):833.

Birch JM, Hartley AL, Marsden HB, Harris M and Swindell R (1984) Excess risk of breast cancer in the mothers of children with soft tissue sarcomas. *Br J Cancer* 49:325-331.

Birch JM, Hartley AL, Blair V, Kelsey AM, Harris M, Teare MD and Jones PH (1990) Cancer in the families of children with soft tissue sarcoma. *Cancer* 66:2339-2348.

Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Presser J, Condie A, Kelsey AM, Harris M, Morris Jones PM, Binchy A, Crowther D, Craft AW, Eden OB, Gareth D, Evans R, Thompson E, Mann JR, Martin J, Mitchell ELD and Santibanez-Koref MF (1994) Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 54:1298-1304.

Birch JM, Alston RD, McNally RJ, Evans DG, Kelsey AM, Harris M, Eden OB and Varley JM (2001) Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene* 20:4621-4628.

Boddy MN, Freemont PS and Borden KL (1994) The p53-associated protein MDM2 contains a newly characterized zinc-binding domain called the RING finger. *Trends Biochem Sci* 19:198-199.

Bonatti F, C. Pepe, Tancredi M, Lombardi G, Aretini P, Sensi E, Falaschi E, Cipollini G, Bevilacqua G and Caligo MA (2006) RNA-based analysis of BRCA1 and BRCA2 gene alterations. *Cancer Genet Cytogenet* 170(2): 93-101.

Borresen-Dale A (2003) TP53 and breast cancer. *Hum Mutat* 21:292-300.

Bougeard G, Brugières L, Chompret A, Gesta P, Charbonnier F, Valent A, Martin C, Raux G, Feunteun J, Bressac-de Paillerets B and Frébourg T (2003) Screening for TP53 rearrangements in families with the Li-Fraumeni syndrome reveals a complete deletion of the TP53 gene. *Oncogene* 22(6):840-846.

Brasil (2003) Ministério da Saúde. Programa Saúde da Família: ampliando a cobertura para consolidar a mudança do modelo de Atenção Básica. *Rev Bras Saúde Materno-Infantil* 3:113-125.

Bretsky P, Haiman CA, Gilad S, Yahalom J, Grossman A, Paglin S, Van Den Berg D, Kolonel LN, Skaliter R and Henderson BE (2003) The relationship between twenty missense ATM variants and breast cancer risk: the Multiethnic Cohort. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:733-738.

Britto AV (1997) Gastric cancer: risk factors. *Cad Saúde Pública* 13(Suppl 1):7-13.

Broca PP (1866) *Traite des Tumeurs*. P Asselin, Paris, 80 pp.

Bruner S, Frerichs O, Schirmer S, Cervelli A and Fansa H (2006) Patients' satisfaction and social reintegration after breast reconstruction with the DIEP/TRAM flap. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 38(6):417-425.

Cady B (1970) Familial bilateral cancer of the breast. *Ann Surg* 172:264-272.

Cantor SB, Bell DW, Ganesan S, Kass EM, Drapkin R, Grossman S, Wahrer DC, Sgroi DC, Lane WS, Haber DA and Livingston DM (2001) BACH1, a novel helicase-like protein, interacts directly with BRCA1 and contributes to its DNA repair function. *Cell* 105:149-160.

Caron de Fromental C and Soussi T (1992) TP53 tumor supressor gene : a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 4:1-15.

Carvalho CD and Manco AR (1992) Mortality among women of reproductive age in an urban area of the southeastern region of Brazil. Evolution in the past 20 years. *Rev Saúde Pública* 26(4):239-245.

Casey G, Lopez M, Ramos J, Plummer S, Arboleda M, Shaughnessy M, Karlan B and Slamon D (1996) DNA sequence analysis of exons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. *Oncogene* 13:1971-1981.

Cass I, Baldwin RL, Varkey T, Moslehi R, Narod SA and Karlan BY (2003) Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. *Cancer* 97:2187-2195.

Chang C, Simmons DT, Martin MA and Mora PT (1979) Identification and characterization of new antigens from simian virus 40-transformed mouse cells. *J Virol* 31:463-471.

Chenevix-Trench G, Healey S, Lakhani S, Waring P, Cummings M, Brinkworth R, Deffenbaugh AM, Burbidge LA, Pruss D, Judkins T, Scholl T, Bekessy A, Marsh A, Lovelock P, Wong M, Tesoriero A, Renard H, Southey M, Hopper JL, Yannoukakos K, Brown M, Easton D, Tavtigian SV, Goldgar D, Spurdle AB and kConFab Investigators (2006) Genetic and Histopathologic Evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA Sequence Variants of Unknown Clinical Significance. *Cancer Res* 66(4):2019-2027.

Cheng YE and Gartler SM (1994) A fluorescent in situ hybridization analysis of X chromosome pairing in early human female meiosis. *Hum Genet* 94(4):389-394.

Chin TM, Tan SH, Lim SE, Iau P, Yong WP, Wong SW and Lee SC (2005) Acceptance, motivators, and barriers in attending breast cancer genetic counseling in Asians. *Cancer Detect Prev* 29(5):412-418.

Choi DH, Lee MH and Haffty BG (2006) Double heterozygotes for non-Caucasian families with mutations in BRCA-1 and BRCA-2 genes. *Breast J* 12(3):216-220.

Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D, Brugieres L, Pages S, Feunteun J and Bonaiti-Pellie C (2001) Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *J Med Genet* 38:43-47.

Cipollini G, Tommasi S, Paradiso A, Aretini P, Bonatti F, Brunetti I, Bruno M, Lombardi G, Schittulli F, Sensi E, Tancredi M, Bevilacqua G and Caligo MA (2004) Genetic alterations in hereditary breast cancer. *Ann Oncol* 15(Suppl 1):I7-I13.

Claus EB, Risch N and Thompson D (1994) Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. *Cancer* 73:643-651.

Clore GM, Omichinski JG, Sakaguchi K, Zambrano N, Sakamoto H, Appella E and Gronenborn AM (1994) High-resolution structure of the oligomerization domain of p53 by multidimensional NMR. *Science* 265:386-391.

Clore GM, Omichinski JG, Sakaguchi K, Zambrano N, Sakamoto H, Appella E and Gronenborn AM (1995) Interhelical angles in the solution structure of the oligomerization domain of p53: correction. *Science* 267:1515-1516.

Cocco P (2002) On the rumors about the silent spring. Review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. *Cad Saude Pública* 18(2):379-402.

Collins SP, Reoma JL, Gamm DM and Uhler MD (2000) LKB1, a novel serine/threonine protein kinase and potential tumour suppressor, is phosphorylated by cAMP-dependent protein kinase (PKA) and prenylated in vivo. *Biochem J* 345[Part 3]:673-680.

Copson ER, White HE, Blaydes JP, Robinson DO, Johnson PW and Eccles DM (2006) Influence of the MDM2 single nucleotide polymorphism SNP309 on tumour development in BRCA1 mutation carriers. *BMC Cancer* 6:80.

Couch FJ, Farid LM, DeShano ML, Tavtigian SV, Calzone K, Campeau L, Peng Y, Bogden B, Chen Q, Neuhausen S, Shattuck-Eidens D, Godwin AK, Daly M, Radford DM, Sedlacek S, Rommens J, Simard J, Garber J, Merajver S and Weber BL (1996) BRCA2 germline mutations in male breast cancer cases and breast cancer families. *Nat Genet* 13:123-125.

Courtois S, Verhaegh G, North S, Luciani MG, Lassus P, Hibner U, Oren M and Hainaut P (2002) DeltaN-p53, a natural isoform of p53 lacking the first transactivation domain, counteracts growth suppression by wild-type p53. *Oncogene* 21:6722-6728.

Couzin J (2003) Choices--and uncertainties--for women with BRCA mutations. *Science* 302(5645):592.

Cybulski C, Gorski B, Huzarski T, Masojc B, Mierzejewski M, Debniak T, Teodorczyk U, Byrski T, Gronwald J, Matyjasik J, Zlowocka E, Lenner M, Grabowska E, Nej K, Castaneda J, Medrek K, Szymanska A, Szymanska J, Kurzawski G, Suchy J, Oszurek O, Witek A, Narod AS and Lubinski J (2004) CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. *Am J Hum Genet* 75:1131-1135.

Damin AP, Frazzon AP, Damin DC, Roehe A, Hermes V, Zettler C and Alexandre CO (2006) Evidence for an association of TP53 codon 72 polymorphism with breast cancer risk. *Cancer Detect Prev* 30(6):523-529.

de Jong MM, Nolte IM, Te Meerman GJ, van der Graaf WT, Mulder MJ, van der Steege G, Bruinenberg M, Schaapveld M, Niessen RC, Berends MJ, Sijmons RH, Hofstra RM, de Vries EG and Kleibeuker JH (2005) Colorectal cancer and the CHEK2 1100delC mutation. *Genes Chromosomes Cancer* 43(4):377-382.

Deleo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW and Old LJ (1979) Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci* 76:2420-2424.

del Giglio A, Bendit I and Barros A (2000) Cânceres associados a alterações nos genes BRCA1 e BRCA2. In: Louro ID, Llerena Jr JC, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Schwartzmann G, Conforti-Froes N (eds) *Genética Molecular do Câncer*, MSG Produção Editorial, São Paulo, pp.133-140.

Deng CX and Brodie SG (2000) Roles of BRCA1 and its interacting proteins. *Bioessays* 22:728-737.

- DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, Zambetti G and Kriwacki RW (2002) A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol* 9:12–16.
- Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore AM, Finlay C and Levine AJ (1993) Gain of function mutations in p53. *Nat Genet* 4:42-46.
- Dufloth RM, Carvalho S, Heinrich JK, Shinzato JY, Santos CC, Zeferino LC and Schmitt F (2005) Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. *São Paulo Med J* 123(4):192-197.
- Domchek SM, Eisen A, Calzone K, Stopfer J, Blackwood A and Weber BL (2003) Application of breast cancer risk prediction models in clinical practice. *J Clin Oncol* 21(4):593-601
- Domchek SM, Blackwood MA, Tweed AJ, Greshock J, Stopfer J, Stratton M, Easton D, Jablon L, Olopade O and Weber BL (2004) University of Pennsylvania BRCA1/BRCA2 prediction model. In: Abstract of the Cancer Risk Prediction Models: A Workshop on Development, Evaluation, and Application, Washington, D.C. 20-21 May 2004
- Durocher F, Tonin P, Shattuck-Eidens D, Skolnick M, Narod SA, Simard J (1996) Mutation analysis of the BRCA1 gene in 23 families with cases of cancer of the breast, ovary, and multiple other sites. *J Med Genet* 33(10):814-819
- Easton DF, Ford D and Bishop DT (1995) Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 56:265-271.
- Easton DF (2002) Familial risks of breast cancer. *Breast Cancer Res* 4(5):179–181.
- Eeles RA (1995) Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv* 25:101-124.
- Eisen A, Rebbeck TR, Wood WC and Weber BL (2000) Prophylactic surgery in women with a hereditary predisposition to breast and ovarian cancer. *J Clin Oncol* 18(9):1980-1895.
- Eisen A, Lubinski J, Klijn J, Moller P, Lynch HT, Offit K, Weber B, Rebbeck T, Neuhausen SL, Ghadirian P, Foulkes WD, Gershoni-Baruch R, Friedman E, Rennert G, Wagner T, Isaacs C, Kim-Sing C, Ainsworth P, Sun P and Narod SA (2005) Breast cancer risk following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case-control study. *J Clin Oncol* 23(30):7491-7496.
- Eisinger F, Sobol H, Serin D and Whorton JC (1998) Hereditary breast cancer, circa 1750. *Lancet* 351:1366.
- El Ghouzzi V, Le Merrer M, Perrin-Schmitt F, Lajeunie E, Benit P, Renier D, Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Munnich A and Bonaventure J (1997) Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 15:42–46.

Eng C (1997) Cowden syndrome. *J Genet Counsel* 6:181.

Eng C (2000) Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria. *J Med Genet* 37(11):828-30.

Euhus DM (2001) Understanding mathematical models for breast cancer risk assessment and counseling. *Breast J* 7(4):224-232.

Fasching PA, Bani MR, Nestle-Kramling C, Goecke TO, Niederacher D, Beckmann MW and Lux MP (2007) Evaluation of mathematical models for breast cancer risk assessment in routine clinical use. *Eur J Cancer Prev* (3):216-224.

Felix CA, Brown DL, Mitsudomi T, Ikagaki N, Wong A, Wasserman R, Womer RB and Biegel JA (1994) Polymorphism at codon 36 of the p53 gene. *Oncogene* 9(1):327-328.

Fodde R and Losekoot M (1994) Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Hum Mutat* 3:83-94.

Fortin J, Moisan AM, Dumont M, Leblanc G, Labrie Y, Durocher F, Bessette P, Bridge P, Chiquette J, Laframboise R, Lépine J, Lespérance B, Pichette R, Plante M, Provencher L, Voyer P and Simard J (2005) A new alternative splice variant of BRCA1 containing an additional in-frame exon. *Biochim Biophys Acta* 1731(1):57-65.

Frank TS, Manley SA, Olopade OI, Cummings S, Garber JE, Bernhardt B, Antman K, Russo D, Wood ME, Mullineau L, Isaacs C, Peshkin B, Buys S, Venne V, Rowley PT, Loader S, Offit K, Robson M, Hampel H, Brener D, Winer EP, Clark S, Weber B, Strong LC, Rieger P, McClure M, Ward BE, Shattuck-Eidens D, Oliphant A, Skolnick MA and Thomas A (1998) Sequence analysis of BRCA1 and BRCA2: Correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *J Clin Oncol* 16:2417-2425.

Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, Hulick M, Ward BE, Lingenfelter B, Gumpfer KL, Scholl T, Tavtigian SV, Pruss DR and Critchfield GC (2002) Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10,000 individuals. *J Clin Oncol* 20(6):1480-1490.

Friedman JM, Hanson JW, Graham CB and Smith DW (1977) Saethre-Chotzen syndrome: A broad and variable pattern of skeletal malformations. *J Pediatr* 91:929-933.

Gad S, Scheuner MT, Pages-Berhout S, Caux-Moncoutier V, Bensimon A, Aurias A, Pinto M and Stoppa-Lyonnet D (2001) Identification of a large rearrangement of the BRCA1 gene using colour bar code on combed DNA in American breast/ovarian cancer family previously studied by direct sequencing. *J Med Genet* 38:388-392.

Gail MH, Brinton LA, Byar DP and Corle DK (1989) Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* 81:1879-1886.

Gallo CVM, Mendonça GAS, Moraes E, Olivier M and Hainaut P (2005) TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. *Mutat Res* 589:192-207.

Gasco M, Yulug IG and Crook T (2003) TP53 mutations in familial breast cancer: functional aspects. *Hum Mutat* 21:301-306.

Geller G, Botkin JR, Green MJ, Press N, Biesecker BB, Wilfond B, Grana G, Daly MB, Schneider K and Kahn MJ (1997) Genetic testing for susceptibility to adult-onset cancer. The process and content of informed consent. *JAMA* 277(18):1467-1474.

Gerhardus A, Schleberger H, Schlegelberger B and Gadzicki G (2007) Diagnostic accuracy of methods for the detection of BRCA1 and BRCA2 mutations: a systematic review. *Eur J Hum Genet* 15(6):619-627.

Ghosh A, Stewart D and Matlashewski G (2004) Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol Cell Biol* 24:7987-7997.

Giardiello FM, Welsh SB, Hamilton SR, Offerhaus GJ, Gittelsohn AM, Booker SV, Krush AJ, Yardley JH and Luk GD (1987) Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N Engl J Med* 316:1511-1514.

Godinho ER and Koch HA (2002) O perfil da mulher que se submete a mamografia em Goiânia - uma contribuição a "Bases para um programa de detecção precoce do câncer de mama". *Radiol Bras* 35(3):139-145.

Godinho ER and Koch HA (2004) Rastreamento do câncer de mama: aspectos relacionados ao médico. *Radiol Bras*, 37:91-99.

Goldgar DE, Easton DF, Deffenbaugh AM, Monteiro ANA, Tavtigian SV, Couch FJ and the Breast Cancer Information Core (BIC) Steering Committee (2004) Integrated Evaluation of DNA Sequence Variants of Unknown Clinical Significance: Application to BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 75:535-544.

Gomes MC, Costa MM, Borojevic R, Monteiro AN, Vieira R, Koifman S, Koifman RJ, Li S, Royer R, Zhang S and Narod SA (2007) Prevalence of BRCA1 and BRCA2 mutations in breast cancer patients from Brazil. *Breast Cancer Res Treat* 103(3):349-353.

Gowen LC, Johnson BL, Latour AM and Sulik KK (1996) Brca1 deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. *Nat Genet* 12:191-194.

Graziani D, Romagnoli S, Cassani B, Alfano RM, Roncalli M and Coggi G (1999) An Ava I polymorphism in the TP53 gene. *Mol Cell Probes* 13(5):393-395

Gruber SB, Entius MM, Petersen GM, Laken SJ, Longo PA, Boyer R, Levin AM, Mujumdar UJ, Trent JM, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR, Polymeropoulos MH, Offerhaus GJ and Giardiello FM (1998) Pathogenesis of adenocarcinoma in Peutz-Jeghers syndrome. *Cancer Res* 58(23): 5267-5270.

Grusenmeyer PA and Wong YN (2007) Interpreting the economic literature in oncology. *J Clin Oncol* 25(2):196-202.

Haddad N and Silva MB (2000) Female mortality in reproductive age in the State of São Paulo, Brazil, 1991-1995: underlying causes of death and maternal mortality. *Rev Saúde Pública* 34(1):64-70.

Hainaut P (1995) The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. *Curr Opin Oncol* 7:76-82.

Hakem R, de la Pompa JL, Sirard C and Mo R (1996) The tumor suppressor gene *Brcal* is required for embryonic proliferation in the mouse. *Cell* 85:1009-1023.

Hakem R, de la Pompa JL, Elia A and Potter J (1997) Partial rescue of *Brcal*(5-6) early embryonic lethality by p53 null mutation. *Nat Genet* 16:298-302.

Hall MJ and Olopade OI (2006) Disparities in genetic testing: thinking outside the BRCA box. *J Clin Oncol* 24(14):2197-2203.

Hartley AL, Birch JM, Kelsey AM, Marsden HB, Harris M and Teare MD (1989) Are germ cell tumors part of the Li-Fraumeni cancer family syndrome? *Cancer Genet Cytogenet* 42:221-226.

Hartmann LC, Schaid DJ, Woods JE, Crotty TP, Myers JL, Arnold PG, Petty PM, Sellers TA, Johnson JL, McDonnell SK, Frost MH and Jenkins RB (1999) Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. *N Engl J Med* 340(2):77-84.

Hartmann LC, Sellers TA, Schaid DJ, Frank TS, Soderberg CL, Sitta DL, Frost MH, Grant CS, Donohue JH, Woods JE, McDonnell SK, Vockley CW, Deffenbaugh A, Couch FJ and Jenkins RB (2001) Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 93(21):1633-1637.

Harvey M, Vogel H, Morris D, Bradley A, Bernstein A and Donehower LA (1995) *Nat Genet* 9:305-311.

Harzheim E, Duncan BB, Stein AT, Cunha CR, Goncalves MR, Trindade TG, Oliveira MM and Pinto ME (2006) Quality and effectiveness of different approaches to primary care delivery in Brazil. *BMC Health Serv Res* 6:156.

Hauser AR, Lerner IJ and King RA (1992) Familial breast cancer. *Am J Med Genet* 44:839-840.

Hearle N, Schumacher V, Menko FH, Olschwang S, Boardman LA, Gille JJJ, Keller, JJ, Westerman AM, Scott RJ, Lim W, Trimbath JD, Giardiello FM, Gruber SB, Offerhaus GJ, de Rooij FW, Wilson JHP, Hansmann A, Moslein G, Royer-Pokora B, Vogel T, Phillips RKS, Spigelman AD and Houlston RS (2006a) Frequency and Spectrum of Cancers in the Peutz-Jeghers Syndrome. *Clin Cancer Res* 12:3209-3215.

Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Hoglund P, Jarvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpaa M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, de la Chapelle A and Aaltonen LA (1998) A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature* 391:184-187.

Hemminki K and Eng C (2004) Clinical genetic counselling for familial cancers requires reliable data on familial cancer risks and general action plans. *J Med Genet* 41(11):801-807.

Hendrickson BC, Judkins T, Ward BD, Eliason K, Deffenbaugh AE, Burbidge LA, Pyne K, Leclair B, Ward BE and Scholl T (2005) Prevalence of five previously reported and recurrent BRCA1 genetic rearrangement mutations in 20,000 patients from hereditary breast/ovarian cancer families. *Genes Chromosomes Cancer* 43:309–313.

Hodgson SV, Foulkes WD, Eng C and Maher ER (2007) *A Practical Guide to Human Cancer Genetics*. 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge, 410 pp.

Hogervorst FB, Cornelis RS, Bout M, van Vliet M, Oosterwijk JC, Olmer R, Bakker B, Klijn JGM, Vasen HFA, Meijers-Heijboer H, Menko FH, Cornelisse CJ, den Dunnen JT, Devilee P and van Ommen GJB (1995) Rapid detection of BRCA1 mutations by the protein truncation test. *Nat Genet* 10:208–212.

Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, McElgunn CJ, Grippeling M, Pruntel R, Regnerus R, van Welsem T, van Spaendonk R, Menko FH, Kluijdt I, Dommering C, Verhoef S, Schouten JP, vant Veer LJ and Pals G (2003) Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Res* 63:1449–1153.

Hollstein M, Rice K, Greenblatt MS, Soussi T, Fuchs R, Sorlie T, Hovig E, Smithsorensen B, Montesano R and Harris CC (1994) *Nucleic Acids Res* 22:3551-3555.

Horio Y, Suzuki H, Ueda R, Koshikawa T, Sugiura T, Ariyoshi Y, Shimokata K, Takahashi T and Takahashi T (1994) Predominantly tumor-limited expression of a mutant allele in a Japanese family carrying a germline p53 mutation. *Oncogene* 9:1231-1235.

Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI, Garcia Delgado C, Gonzalez-Ramos M, Kline AD and Jabs EW (1997) Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome. *Nat Genet* 15:36–41.

Howlett NG, Taniguchi T, Olson S, Cox B, Waisfisz Q, de Die-Smulders C, Persky N, Grompe M, Joenje H, Pals G, Ikeda H, Fox EA and D'Andrea AD (2002) Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 297(5581):606-609.

Huang J, Domchek SM, Brose MS, Rebbeck TR, Nathanson KL and Weber BL (2004) Germline CHEK21100delC mutations in breast cancer patients with multiple primary cancers. *J Med Genet* 41(11):e120.

Hughes C, Peterson SK, Ramirez A, Gallion KJ, McDonald PG, Skinner CS and Bowen D (2004) Minority Recruitment in Hereditary Breast Cancer Research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13(7):1146-1155.

Ingvarsson S, Sigbjornsdottir BI, Huiping C, Hafsteinsdottir SH, Ragnarsson G, Barkardottir RB, Arason A, Egilsson V and Bergthorsson JT (2002) Mutation analysis of the *CHK2* gene in breast carcinoma and other cancers. *Breast Cancer Res* 4(3):R4.

James PA, Doherty R, Harris M, Mukesh BN, Milner A, Young M and Scott C (2006) Optimal Selection of Individuals for BRCA Mutation Testing: A Comparison of Available Methods. *J Clin Oncol* 24(4):707-715.

Jenne DE, Reimann H, Nezu J, Friedel W, Loff S, Jeschke R, Muller O, Back W and Zimmer M (1998) Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* 18:38-43.

Johnson D, Horsley SW, Moloney DM, Oldridge M, Twigg SR, Walsh S, Barrow M, Njolstad PR, Kunz J, Ashworth GJ, Wall SA, Kearney L and Wilkie AO (1998) A comprehensive screen for *TWIST* mutations in patients with craniosynostosis identifies a new microdeletion syndrome of chromosome band 7p21.1. *Am J Hum Genet* 63:1282-1293.

Kaczmarek L, Oren M and Baserga R (1986) Co-operation between the p53 protein tumor antigen and platelet-poor plasma in the induction of cellular DNA synthesis. *Exp Cell Res* 162:268-272.

Kamangar F, Dores GM and Anderson WF (2006) Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 24(14):2137-2150.

Karhu R, Laurila E, Kallioniemi A and Syrjäkoski K (2006) Large genomic *BRCA2* rearrangements and male breast cancer. *Cancer Detect Prev* 30(6):530-534.

Karuman P, Gozani O, Odze RD, Zhou XC, Zhu H, Shaw R, Brien TP, Bozzuto CD, Ooi D, Cantley LC and Yuan J (2001) The Peutz-Jegher gene product *LKB1* is a mediator of p53-dependent cell death. *Mol Cell* 7:1307-1319.

Kauff ND, Satagopan JM, Robson ME, Scheuer L, Hensley M, Hudis CA, Ellis NA, Boyd J, Borgen PI, Barakat RR, Norton L and Offit K (2002) Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a *BRCA1* or *BRCA2* mutation. *N Engl J Med* 346:1609-1615.

Kessler S (1979) *Genetic Counseling. Psychological Dimensions.* Academic Press, New York, 248 pp.

Knudson AG Jr (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:820-823.

Knudsen AB, McMahon PM and Gazelle GS (2007) Use of modeling to evaluate the cost-effectiveness of cancer screening programs. *J Clin Oncol* 25(2):203-208.

Koifman S and Koifman RJ (2003) Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. *Mutat Res* 544(2-3):305-311.

Koliren L, Micone P, Otero S, Bianconi M, Benavente C, Rafailovici L, Zoricomba A, Filomia M, Perez D and Jankilevich G (2005) Changes in the age of breast cancer diagnosis along the last century in Argentina. *J Clin Oncol* 23(16S):875

Koonin EV, Altschul SF and Bork P (1996) BRCA1 protein products ... Functional motifs... *Nat Genet* 13:266-268.

Kozak FK, Hall JG and Baird PA (1986) Familial breast cancer in males: a case report and review of the literature. *Cancer* 58:2736-2739.

Kraiss S, Quaiser A, Oren M and Montenarh M (1988) Oligomerization of oncoprotein p53. *J Virol* 62:4737-4744.

Kreiborg S, Pruzansky S and Pashayan H (1972) The Saethre-Chotzen syndrome. *Teratology* 6:287-294.

Kress M, May E, Cassingena R and May P (1979) Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol* 31:472-483.

Lacerda LL, Serrano SV, Mathes A, Rey JA, Bello MJ and Casartelli C (2005) An intronic variant in the TP53 gene in a Brazilian woman with breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 160(2):160-163.

Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, Gusterson BA, Anderson TJ, van de Vijver MJ, Farid LM, Venter D, Antoniou A, Storer-Isser A, Smyth E, Steel CM, Haites N, Scott RJ, Goldgar D, Neuhausen S, Daly PA, Ormiston W, McManus R, Scherneck S, Ponder BA, Ford D, Peto J, Stoppa-Lyonnet D, Bignon YJ, Struewing JP, Spurr NK, Bishop DT, Klijn JG, Devilee P, Cornelisse CJ, Lasset C, Lenoir G, Barkardottir RB, Egilsson V, Hamann U, Chang-Claude J, Sobol H, Weber B, Stratton MR and Easton DF (1998) Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst* 90(15):1138-1145.

Lakhani SR, Van de Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PO, McGuffog L and Easton DF (2002) The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol* 20:2310-2318.

Lane DP (1992) Cancer p53, guardian of the genome. *Nature* 358:15-16.

Lane D and Crawford L (1979) T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278:261-263.

- Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso M, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM and Mendonca BB (2001) An inherited mutation outside the highly conserved dna-binding domain of the TP53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol* 86:4970-4973.
- Lazar V, Hazard F, Bertin F, Janin N, Bellet D and Bressac B (1993) Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene. *Oncogene* 8(6):1703-1705.
- Lehman TA, Haffty BG, Carbone CJ, Bishop LR, Gumbs AA, Krishnan S, Shields PG, Modali R and Turner BC (2000) Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. *Cancer Res* 60:1062-1069.
- Lerman C, Daly M, Masny M and Balshem A (1994) Attitudes about genetic testing for breast-ovarian cancer susceptibility. *J Clin Oncol* 12:843-850.
- Lerman C, Seay J, Balshem A and Audrain J (1995) Interest in genetic testing among first-degree relatives of breast cancer patients. *Am J Med Genet* 57:385-392.
- Lerman C, Narod S, Schulman K, Hughes C, Gomez-Caminero A, Bonney G, Gold K, Trock B, Main D, Lynch J, Fulmore C, Snyder C, Lemon SJ, Conway T, Tonin P, Lenoir G and Lynch H (1996) BRCA1 testing in families with hereditary breast-ovarian cancer: a prospective study of patient decision making and outcomes. *JAMA* 275(24):1885-1892.
- Leventhal H and Leventhal EA (1999) Population risk, actual risk, perceived risk, and cancer control: a discussion. *J Natl Cancer Inst* 25:81-85.
- Li FP and Fraumeni JF Jr (1969) Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 71(4):747-752.
- Li FP and Fraumeni Jr JF (1982) Prospective study of a family cancer syndrome. *JAMA* 247:2692-2694.
- Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA and Miller RW (1988) A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 48:5358-5362.
- Liede A, Karlan BY and Narod SA (2004) Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. *J Clin Oncol* 22:735-742.
- Lim W, Olschwang S, Keller JJ, Westerman AM, Menko FH, Boardman LA, Scott RJ, Trimbath J, Giardiello FM, Gruber SB, Gille JJ, Offerhaus GJ, de Rooij FW, Wilson JH, Spigelman AD, Phillips RK and Houlston RS (2004) Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers. *Gastroenterol* 126:1788-1794.
- Linzer DIH and Levine AJ (1979) Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17:43-52.

Lipkus IM, Iden D, Terrenoire J and Feaganes JR (1999) Relationships among Breast Cancer Concern, Risk Perceptions, and Interest in Genetic Testing for Breast Cancer Susceptibility among African-American Women with and without a Family History of Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:533-539.

Liu CY, Flesken-Nikitin A, Li S and Zeng Y (1996) Inactivation of the mouse *Brca1* gene leads to failure in the morphogenesis of the egg cylinder in early postimplantation development. *Genes Dev* 10:1835-1843.

Lourenço JJ, Vargas FR, Bines J, Santos EM, Lasmar CAP, Costa CH, Teixeira EMB, Maia MCM, Coura F, Silva CHD and Moreira MAM (2004) BRCA1 mutations in Brazilian patients. *Genet Mol Biol* 4:500-504.

Ludwig T, Chapman DL, Papaioannou VE and Efstratiadis A (1997) Targeted mutations of breast cancer susceptibility gene homologs in mice: lethal phenotypes of *Brca1*, *Brca2*, *Brca1/Brca2*, *Brca1/p53*, and *Brca2/p53* nullizygous embryos. *Genes Dev* 11:1226-1241.

Lux MP, Fashing PA and Beckmann MW (2006) Hereditary breast and ovarian cancer : review and future perspectives. *J Mol Med* 84(1):16-28.

Lynch ED, Ostermeyer EA, Lee MK, Arena JF, Ji H, Dann J, Swisshelm K, Suchard D, MacLeod PM, Kvinnsland S, Gjertsen BT, Heimdal K, Lubs H, Moller P and King MC (1997) Inherited mutations in PTEN that are associated with breast cancer, cowden disease, and juvenile polyposis. *Am J Hum Genet* 61(6):1254-1260.

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ and Tainsky MA (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250:1233-1238.

Maltzman W and Czyzyk L (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* 4:1689-1694.

Markoff A, Savov A, Vladimirov V, Bogdanova N, Kremensky I and Ganev V (1997) Optimization of single-strand conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol. *Clin Chem* 43:30-33.

Marrero AR, Das Neves Leite FP, De Almeida Carvalho B, Peres LM, Kommers TC, Da Cruz JM, Salzano FM, Ruiz-Linares A, Da Silva Júnior WA and Bortolini MC (2005) Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Hum Biol* 17(4):496-506.

Marsh DJ, Coulon V, Lunetta KL, Rocca-Serra P, Dahia PL, Zheng Z, Liaw D, Caron S, Duboue B, Lin AY, Richardson AL, Bonnetblanc JM, Bressieux JM, Cabarrot-Moreau A, Chompert A, Demange L, Eeles RA, Yahanda AM, Fearon ER, Fricker JP, Gorlin RJ, Hodgson SV, Huson S, Lacombe D, LePrat F, Odent S, Toulouse C, Olopade OI, Sobol H, Tishler S, Woods G, Robinson BG, Weber HC, Parsons R, Peacocke M, Longy M and Eng C (1998) Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and

Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation. *Hum Mol Genet* 7:507-15.

Marshall CJ (1991) Tumor suppressor genes. *Cell* 64:313-326.

May P and May E (1999) Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 18:7621-7636.

Meek DM (1999) Mechanisms of switching on p53: a role for covalent modification? *Oncogene* 18:7666-7675.

Meijers-Heijboer H, Van Geel B, Van Putten WLJ, Henzen-Logmans SC, Seyaev C, Menke-Pluymers MBE, Bartels CCM, Verhoog LC, Van Den Ouweland AMW, Niermeijer MF, Brekelmans CTM and Klijn JGM (2001) Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 345:159-164.

Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H, Wasielewski M, Wagner A, Hollestelle A, Elstrodt F, van den Bos R, de Snoo A, Fat GT, Brekelmans C, Jagmohan S, Franken P, Verkuijlen P, van den Ouweland A, Chapman P, Tops C, Möslein G, Burn J, Lynch H, Klijn J, Fodde R and Schutte M (2003) The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. *Am J Hum Genet* 72:1308-1314.

Mercer WE, Nelson D, Deleo AB, Old LJ and Baserga R (1982) Microinjection of monoclonal antibody to protein p53 inhibits serum-induced DNA synthesis in 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:6309-6312.

Meropol NJ and Schulman KA (2007) Cost of cancer care: issues and implications. *J Clin Oncol* 25(2):180-186.

Miki Y, Swenson J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harsman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W, Bell R, Rosenthal J, Hussey C, Tran T, McClure M, Frye C, Hattier T, Phelps R, Haugen-Strano A, Katcher H, Yakumo K, Gholami Z, Shaffer D, Stone S, Bayer S, Wray C, Bogden R, Dayananth P, Ward J, Tonin P, Narod S, Bristow PK, Norris FH, Helvering L, Morrison P, Rosteck P, Lai M, Barrett JC, Lewis C, Neuhausen S, Cannon-Albright L, Goldgar D, Wiseman R, Kamb A and Skolnick MH (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266:66-71.

Milner J and Milner S (1981) SV40-53K antigen: a possible role for 53K in normal cells. *Virology* 112:785-788.

Milner J (1984) Different forms of p53 detected by monoclonal antibodies in non-dividing and dividing lymphocytes. *Nature* 310:143-145.

Mironchik Y, Winnard PT Jr, Vesuna F, Kato Y, Wildes F, Pathak AP, Kominsky S, Artemov D, Bhujwala Z, Van Diest P, Burger H, Glackin C and Raman V (2005) Twist

overexpression induces in vivo angiogenesis and correlates with chromosomal instability in breast cancer. *Cancer Res* 65:10801–10809.

Montagna M, Dalla Palma M, Menin C, Agata S, De Nicolo A, Chieco-Bianchi L and D'Andrea E (2003) Genomic rearrangements account for more than one-third of the BRCA1 mutations in northern Italian breast/ovarian cancer families. *Hum Mol Genet* 12(9):1055-1061.

Mora PT, Chandrasekaran K and McFarland VW (1980) An embryo protein induced by SV40 virus transformation of mouse cells. *Nature* 288:722-724.

Nathanson KL, Wooster R and Weber BL (2001) Breast cancer genetics: What we know and what we need. *Nat Med* 7:552-556.

National Advisory Council for Human Genome Research (1994) Statement on use of DNA testing for presymptomatic detection of cancer risk. *JAMA* 271:785.

Nelen MR, Padberg GW, Peeters EA, Lin AY, van den Helm B, Frants RR, Coulon V, Goldstein AM, van Reen MM, Easton DF, Eeles RA, Hodgson S, Mulvihill JJ, Murday VA, Tucker MA, Mariman EC, Starink TM, Ponder BA, Ropers HH, Kremer H, Longy M and Eng C (1996) Localization of the gene for Cowden disease to chromosome 10q22-23. *Nat Genet* 13:114-116.

Nelson HD, Huffman LH, Fu R and Harris EL (2005) Genetic risk assessment and BRCA mutation testing for breast and ovarian cancer susceptibility: systematic evidence review for the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 143(5):362-379.

Neuhausen S, Dunning A, Steele L, Yakumo K, Hoffman M, Szabo C, Tee L, Baines C, Pharoah P, Goldgar D and Easton D (2004) Role of CHEK2*1100delC in unselected series of non-BRCA1/2 male breast cancers. *Int J Cancer* 108(3):477-478.

Nichols KE, Malkin D, Garber JE, Fraumeni JF Jr and Li FP (2001) Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:83-87.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S and Devilee P (1989) Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342:705-708.

Nussbaum RL, McInnes RR and Willard HF (2002) Thompson e Thompson genética médica. 6th edition. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 400 pp.

Oefner PJ and Underhill PA (1995) Comparative DNA sequencing by denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). *Am J Hum Genet* 57:A266.

Oefner PJ and Underhill PA (1998) DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). In: Dracopoli NC, Haines J, Korf BR,

Morton C, Seidman CE, Seidman JG, Moir DT and Smith DR (eds) Current protocols in human genetics. Wiley & Sons, New York, (Suppl 19) pp 7.10.1–7.10.12.

Oefner PJ and Underhill PA (1999) DNA mutation detection using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC). In: Dracopoli NC, Haines J, Korf BR, Morton C, Seidman CE, Seidman JG, Moir DT and Smith DR (eds) Current protocols in human genetics. Wiley-Interscience, New York, (Suppl 19) pp 7.10.1–7.10.12.

Offit K (1998) The common hereditary cancers. In: Clinical Cancer Genetics: Risk Counseling and Management. Wiley-Liss, New York, 440 pp.

Olopade OI and Weber BL (1998) Breast cancer genetics: toward molecular characterization of individuals at increased risk for breast cancer: part I. Cancer: Principles and Practice of Oncology Updates 12(10):1-12.

Osório A, Rodriguez-Lopez R, Diez O, de la Hoya M, Martínez JI, Vega A, Esteban-Cardenosa E, Alonso C, Caldés T and Benítez J (2004) The breast cancer low-penetrance allele 1100delc in the CHEK2 gene is not present in spanish familial breast cancer population. *Int J Cancer* 108:54-56.

Ottman R, Pike MC, King MC and Henderson BE (1983) Practical guide for estimating risk for familial breast cancer. *Lancet* II:556-558.

Page DL, Schuyler PA, Dupont WD, Jensen RA, Plummer WD and Simpson JF (2003) Atypical lobular hyperplasia as a unilateral predictor of breast cancer risk: a retrospective cohort study. *Lancet* 361:125–129

Palmero EI, Kalakun L, Schuler-Faccini L, Giugliani R, Vargas FR, Rocha JC and Ashton-Prolla P (2007a) Cancer genetic counseling in public health care hospitals: the experience of three Brazilian services. *Community Genet* 10(2):110-119.

Palmero EI, Schuler-Faccini L, Rocha JC, Vargas FR, Kalakun L, Giugliani R and Ashton-Prolla P Cancer-related worry and risk perception in individuals seeking genetic counselling for hereditary breast cancer in Brazil. *Patient Educ Couns* “no prelo”

Palomba G, Pisano M, Cossu A, Budroni M, Dedola MF, Farris A, Contu A, Balduin P, Tanda F, Palmieri G (2005) Spectrum and prevalence of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in Sardinian patients with breast carcinoma through hospital-based screening. *Cancer* 104(6):1172-1179.

Pantke OA, Cohen MM Jr, Witkop CJ Jr, Feingold M, Schaumann B, Pantke HC and Gorlin RJ (1975) The Saethre-Chotzen syndrome. *Birth Defects Orig Artic Ser* 11:190-225.

Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J, Raymond L and Young J (1997) Cancer in Five Continents, WHO-IARC scientific publications, Lyon, 194 pp.

Parkin DM, Bray FI and Devesa SS (2001) Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 37(Suppl 8):S4-66.

Paznekas WA, Cunningham ML, Howard TD, Korf BR, Lipson MH, Grix AW, Feingold M, Goldberg R, Borochowitz Z, Aleck K, Mulliken J, Yin M and Jabs EW (1998) Genetic heterogeneity of Saethre-Chotzen syndrome, due to TWIST and FGFR mutations. *Am J Hum Genet* 62:1370-1380.

Payne SR, Newman B and King MC (2000) Complex Germline Rearrangement of BRCA1 associated with breast and ovarian cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 29:58–62.

Peelen T, van Vliet M, Bosch A, Bignell G, Vasen HF, Klijn JG, Meijers-Heijboer H, Stratton M, van Ommen GJ, Cornelisse CJ and Devilee P (2000) Screening for BRCA2 mutations in 81 Dutch breast-ovarian cancer families. *Br J Cancer* 82(1):151-156.

Penchaszadeh VB (2000) Community genetics in Latin America: challenges and perspectives. *Community Genet* 3:124-127.

Petrakis NL (1977) Genetic factors in the etiology of breast cancer. *Cancer* 39:2709-2715.

Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, van Eijk R, Olmer R, Drusedau M, Hogervorst FBL, Hageman S, Arts PJW, Ligtenberg MJL, Meijers-Heijboer H, Klijn JGM, Vasen HFA, Cornelisse CJ, van't Veer LJ, Egbert-Bakker D, van Ommen G-JB and Devilee P (1997) BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat Genet* 17:341–345.

Phelan CM, Dapic V, Tice B, Favis R, Kwan E, Barany F, Manoukian S, Radice P, van der Luijt RB, van Nesselrooij BP, Chenevix-Trench G, kConFab, Caldes T, de la Hoya M, Lindquist S, Tavtigian SV, Goldgar D, Borg A, Narod SA and Monteiro AN (2007) Classification of BRCA1 missense variants of unknown clinical significance. *J Med Genet* 44(5):e78.

Pleasant LM and Hansen MF (1994) Identification of a polymorphism in intron 2 of the p53 gene. *Hum Genet* 93(5):607-608.

Porto Alegre (2004) Mapas da inclusão e exclusão social de Porto Alegre. Prefeitura Municipal. Gabinete do prefeito. Secretaria do Planejamento Municipal. Porto Alegre, 100 pp.

Preisler-Adams S, Schönbuchner I, Fiebig B, Welling B, Dworniczak B and Weber BH (2006) Gross rearrangements in BRCA1 but not BRCA2 play a notable role in predisposition to breast and ovarian cancer in high-risk families of German origin. *Cancer Genet Cytogenet* 168(1):44-49.

Puget N, Torchard D, Serova-Sinilkova OM, Lynch HT, Feunteun J, Lenoir GM and Mazoyer S (1997) A 1-kb Alu-mediated germ-line deletion removing BRCA1 exon 17. *Cancer Res* 57: 828–831.

Puget N, Stoppa-Lyonnet D, Sinilkova OM, Pages S, Lynch HT, Lenoir GM and Mazoyer S (1999a) Screening for germ-line rearrangements and regulatory mutations in BRCA1 led to the identification of four new deletions. *Cancer Res* 59:455–461.

Puget N, Sinilkova OM, Stoppa-Lyonnet D, Audoynaud C, Pages S, Lynch HT, Goldgar D, Lenoir GM and Mazoyer S (1999b) An Alu mediated 6-kb duplication in the BRCA1 gene: a new founder mutation? *Am J Hum Genet* 64:300–302.

Quaresima B, Faniello MC, Baudi F, Crugliano T, Cuda G, Costanzo F and Venuta S (2006) In vitro analysis of genomic instability triggered by BRCA1 missense mutations. *Hum Mutat* 27(7):715.

Ramalho AS and Silva RB (2000) Community genetics: a new discipline and its application in Brazil. *Cad Saúde Pública* 16(1):261-263.

Rebbeck TR (1999) Inherited genetic predisposition in breast cancer – a population-based perspective. *Cancer* 25:1673-1681.

Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, Narod SA, Vant Veer L, Garber JE, Evans G, Isaacs C, Daly MB, Matloff E, Olopade OI and Weber B (2002) Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 346:1616-1622.

Reich NC and Levine AJ (1984) Growth regulation of a cellular tumour antigen, p53, in nontransformed cells. *Nature* 308:199- 201.

Reilly PR, Boshar MF and Holtzman SH (1997) Ethical issues in genetic research: disclosure and informed consent. *Nat Genet* 15(1)16-20.

Reznikov MV, Fidler R, Rubtsov PM, Skriabin KG, Chumakov PM, Prasolov VS and Baev AA (1989) Expression of human growth hormone in cultured mouse fibroblasts. *Mol Biol (Mosk)* 23:1692-1699.

Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G, Cat I, Stratakis CA and Sandrini R (2001) An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:9330-9335.

Risch HA, McLaughlin JR, Cole DE, Rosen B, Bradley L, Fan I, Tang J, Li S, Zhang S, Shaw PA and Narod SA (2006) Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. *J Natl Cancer Inst* 98(23):1694-1706.

Rocha JCC, Vargas FR, Aschton-Prolla P (2001) Câncer familiar. Disponível em: <URL: http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/027.pdf.

Rose CS, Patel P, Reardon W, Malcolm S and Winter RM (1997) The TWIST gene, although not disrupted in Saethre-Chotzen patients with apparently balanced translocations of 7p21, is mutated in familial and sporadic cases. *Hum Mol Genet* 6:1369–1373.

Rosen EM, Fan S and Isaacs C (2005) BRCA1 in hormonal carcinogenesis: basic and clinical research. *Endocr Relat Cancer* 12(3):533-548.

Rosen EM, Fan S and Ma Y (2006) BRCA1 regulation of transcription. *Cancer Lett* 236(2):175-185.

Runnebaum IB, Tong XW, Konig R, Zhao H, Korner K, Atkinson EN, Kreienberg R, Kieback D, and Hong Z (1995) p53-based blood test for PIN3 and risk for sporadic ovarian cancer. *Lancet* 345: 994.

Sahlin P, Windh P, Lauritzen C, Emanuelsson M, Grönberg H and Stenman G (2007) Women with Saethre-Chotzen syndrome are at increased risk of breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 46(7):656-660.

Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, Tagle DA, Smith S, Uziel T, Sfez S, Ashkenazi M, Pecker I, Frydman M, Harnik R, Patanjali SR, Simmons A, Clines GA, Sartiel A, Gatti RA, Chessa L, Sanal O, Lavin MF, Jaspers NG, Taylor AM, Arlett CF, Miki T, Weissman SM, Lovett M, Collins FS and Shiloh Y (1995) A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* 268(5218):1749-1753.

Schmidt MK, Tollenaar RA, de Kemp SR, Broeks A, Cornelisse CJ, Smit VT, Peterse JL, van Leeuwen FE and Van't Veer LJ (2007) Breast cancer survival and tumor characteristics in premenopausal women carrying the CHEK2*1100delC germline mutation. *J Clin Oncol* 25:64-69.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F and Pals G (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30(12):e57.

Schutte M, Seal S, Barfoot R, Meijers-Heijboer H, Wasielewski M, Evans DG, Eccles D, Meijers C, Lohman F, Klijn J, van den Ouweland A, Futreal PA, Nathanson KL, Weber BL, Easton DF, Stratton MR, Rahman N and Breast Cancer Linkage Consortium (2003) Variants in CHEK2 other than 1100delC do not make a major contribution to breast cancer susceptibility. *Am J Hum Genet* 72(4):1023-1028.

Scott CL, Jenkins MA, Southey MC, Davis TA, Leary JA, Easton DF, Phillips KA and Hopper JL (2003) Average age-specific cumulative risk of breast cancer according to type and site of germline mutations in BRCA1 and BRCA2 estimated from multiple-case breast cancer families attending Australian family cancer clinics. *Hum Genet* 112:542-551.

Seemann S, Maurici D, Olivier M, de Fromental CC and Hainaut P (2004) The Tumor Suppressor Gene TP53: Implications for Cancer Management and Therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 41(5-6):551-583.

Sevilla C, Moatti JP, Julian-Reynier C, Eisinger F, Stoppa-Lyonnet D, Bressac-de Paillerets B and Sobol H (2002) Testing for BRCA1 mutations: a cost-effectiveness analysis. *Eur J Hum Genet* 10:599-606.

Shattuck-Eidens D, Oliphant A, McClure M, McBride C, Gupte J, Rubano T, Pruss D, Tavtigian SV, Teng D, Adey N, Staebell M, Gumpper K, Lundstrom R, Hulick M, Kelly

M, Holmen J, Lingenfelter B, Manley S, Fujimura F, Luce M, Ward B, Cannon-Albright L, Steele L, Offit K, Gilewski T, Norton L, Brown K, Schulz C, Hampel H, Schluger A, Giulotto E, Zoli W, Ravaioli A, Nevanlinna H, Pырhonen S, Rowley P, Loader S, Osborne M, Daly M, Tepler I, Weinstein PL, Scalia JL, Michaelson R, Scott RJ, Radice P, Pierotti MA, Garber JE, Isaacs C, Peshkin B, Lippman ME, Dosik MH, Caligo MA, Greenstein RM, Pilarski R, Weber B, Burgemeister R, Frank TS, Skolnick MH and Thomas A (1997) BRCA1 sequence analysis in women at high risk for susceptibility mutations: risk factors analysis and implications for genetic testing. *JAMA* 278:1242-1250.

Shih JH and Chatterjee N (2002) Analysis of survival data from case-control family studies. *Biometrics* 58(3):502-509.

Shohat O, Greenberg M, Reisman D, Oren M and Rotter V (1987) Inhibition of cell growth mediated by plasmids encoding p53 anti-sense. *Oncogene* 1:277-283.

Skilling J, Sood A, Niemann T, Lager D and Buller R (1996) An abundance of p53 null mutations in ovarian carcinoma. *Oncogene* 13:117-123.

Siddiqui R, Onel K, Facio F, Nafa K, Diaz LR, Kauff N, Huang H, Robson M, Ellis N and Offit K (2005) The TP53 mutational spectrum and frequency of CHEK2*1100delC in Li-Fraumeni-like kindreds. *Fam Cancer* 4:177-181.

Silveira GPG, Motta NW and Lago S (2000) Câncer de mama. *Revista Médica da Santa Casa* 11:1928-1930.

Simão TA, Ribeiro FS, Amorim LMF, Albano RM, Andrada-Serpa MJ, Cardoso LEB, Mendonça GAS and Gallo CVM (2002) TP53 mutations in breast cancer tumors of patients from Rio de Janeiro, Brazil: association with risk factors and tumor characteristics. *Int J Cancer*: 101:69-73.

Simon SD, Molina A and Moreira-Filho CA (2003) Mutations of BRCA1/2 genes in Brazil. *ASCO Annual Meeting, New Orleans, USA.*

Sivakumaran, TA, Kucheria k and Oefner PJ (2003). Denaturing high performance liquid chromatography in the molecular diagnosis of genetic disorders. *Current Science* 84(3):291-296.

Smith RA, Caleffi M, Albert U-S, Chen THH, Duffy SW, Franceschi D and Nyström L (2006) Breast cancer in limited-resource countries: early detection and access to care. *Breast J* 12(Suppl 1):S16-S26.

Sodha N, Houlston RS, Bullock S, Yuille MA, Chu C, Turner G and Eeles RA (2002) Increasing evidence that germline mutations in CHEK2 do not cause Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* 20:460-462.

Southern EM (1974) An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Anal Biochem* 62(1):317-318.

Stankovic T, Kidd AM, Sutcliffe A, McGuire GM, Robinson P, Weber P, Bedenham T, Bradwell AR, Easton DF, Lennox GG, Haites N, Byrd PJ and Taylor AM (1998) ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am J Hum Genet* 62:334-3345.

Struewing JP, Brody LC, Erdos MR, Kase RG, Giambarresi TR, Smith SA, Collins FS and Tucker MA (1995) Detection of 8 BRCA1 mutations in 10 breast/ovarian cancer families including one family with male breast cancer. *Am J Hum Genet* 51:1-7.

Sunyaev S, Ramensky V, Koch I, Lathe W, Kondrashov AS and Bork P (2001) Prediction of deleterious human alleles. *Hum Mol Genet* 10(6):591-597.

Sweet KM, Bradley TL and Westman JA (2002) Identification and Referral of Families at High Risk for Cancer Susceptibility. *J Clin Oncol* 20(2):528-537.

Swensen J, Hoffman M, Skolnick MH and Neuhausen SL (1997) Identification of a 14 kb deletion involving the promoter region of BRCA1 in a breast cancer family. *Hum Mol Genet* 6:1513-1515.

Szabo C, Masiello A, Ryan JF and Brody LC (2000) The breast cancer information core: database design, structure, and scope. *Hum Mutat* 16(2):123-131.

Szymanska K and Hainaut P (2003) TP53 and mutations in human cancer. *Acta Biochim Polon* 50:231-238.

The Breast Cancer Linkage Consortium (1999) Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 91(15):1310-1316.

The CHEK2 Breast Cancer Consortium (2002) Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK21100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *Nat Genet* 31:55-59.

Thompson D and Easton DF (2002) Cancer Incidence in BRCA1 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 94(18):1358-1365.

Thorstenson YR, Roxas A, Kroiss R, Jenkins MA, Yu KM, Bachrich T, Muhr D, Wayne TL, Chu G, Davis RW, Wagner TM and Oefner PJ (2003) Contributions of ATM mutations to familial breast and ovarian cancer. *Cancer Res* 63:3325-3333.

Tsou HC, Teng DH, Ping XL, Brancolini V, Davis T, Hu R, Xie XX, Gruener AC, Schragr CA, Christiano AM, Eng C, Steck P, Ott J, Tavtigian SV and Peacocke M (1997) The role of MMAC1 mutations in early-onset breast cancer: causative in association with Cowden syndrome and excluded in BRCA1-negative cases. *Am J Hum Genet* 61(5):1036-1043.

Tutt A and Ashworth A (2002) The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends Mol Med* 8(12):571-576.

- Tyrer J, Duffy SW and Cuzick J (2004) A breast cancer prediction model incorporating familial and personal risk factors. *Stat Med* 23:1111-1130.
- Underhill PA, Jin L, Lin AA, Mehdi SQ, Jenkins T, Vollrath D, Davis RW, Cavalli-Sforza LL and Oefner PJ (1997) Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res* 7:996-1005.
- Uhrhammer N, Bay JO and Bignon YJ (1998) Seventh International Workshop on Ataxia-Telangiectasia. *Cancer Res* 58 (15):3480-3485.
- Vahteristo P, Tamminen A, Karvinen P, Eerola H, Eklund C, Aaltonen LA, Blomqvist C, Aittomäki K and Nevanlinna H (2001) p53, CHK2, and CHK1 genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition. *Cancer Res* 61:5718-5722.
- Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H, Syrjäkoski K, Ojala S, Kilpivaara O, Tamminen A, Kononen J, Aittomäki K, Heikkilä P, Holli K, Blomqvist C, Bartek J, Kallioniemi O and Nevanlinna HA (2002) CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. *Am J Hum Genet* 71:432-438.
- Van Dijk S, Otten W, Zoetewij MW, Timmermans DRM, van Asperen CJ, Breuning MH, Tollenaar RAEM and Kievit J (2003) Genetic counselling and the intention to undergo prophylactic mastectomy: effects of a breast cancer risk assessment. *Br J Cancer* 88:1675-1681.
- Vargas FR (2000) Aconselhamento Genético no Câncer Hereditário pré-teste e pós-teste. In: Louro ID, Llerena Jr JC, Melo MSV, Ashton-Prolla P, Schwartzmann G and Conforti-Froes N (eds) *Genética Molecular do Câncer* MSG Produção Editorial, São Paulo, pp:252-255.
- Varley JM, Evans DG and Birch JM (1997a) Li-Fraumeni syndrome: a molecular and clinical review. *Br J Cancer* 76:1-14.
- Varley JM, McGown G, Thorncroft M, Santibanez-Koref MF, Kelsey AM, Tricker KJ, Evans DG and Birch JM (1997b) Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. *Cancer Res* 57:3245-3252.
- Varley J (2003b) TP53, hChk2, and the Li-Fraumeni syndrome. *Methods Mol Biol* 222:117-129.
- Venkitaraman AR (2001) Functions of BRCA1 and BRCA2 in the biological response to DNA damage. *J Cell Sci* 114:3591-3598.
- Yin Y, Stephen CW, Luciani MG and Fahraeus R (2002) p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nat Cell Biol* 4:462-467.

Yong MC, Zhou XJ and Lee SC (2003) The importance of paternal family history in hereditary breast cancer is underappreciated by health care professionals. *Oncology* 64(3):220-226.

Walsh T, Casadei S, Coats KH, Swisher E, Stray SM, Higgins J, Roach KC, Mandell J, Lee MK, Ciernikova S, Foretova L, Soucek P and King MC (2006) Spectrum of Mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2, and TP53 in Families at High Risk of Breast Cancer. *JAMA*, 295(12):1379-1388.

Wang Y, Cortez D, Yazdi P, Neff N, Elledge SJ and Qin J (2000) BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14:927-939.

Wang Q, Zhang H, Guerrette S, Chen J, Mazurek A, Wilson T, Slupianek A, Skorski T, Fishel R and Greene MI (2001) Adenosine nucleotide modulates the physical interaction between hMSH2 and BRCA1. *Oncogene* 20:4640-4649.

Wang-Gohrke, Becher H, Kreienberg R, Runnebaum IB and Chang-Claude J (2002) Intron 3 16 bp duplication polymorphism of p53 is associated with an increased risk for breast cancer by the age of 50 years. *Pharmacogenetics* 12:269-272.

Weischer M, Bojesen SE, Tybjaerg-Hansen A, Axelsson CK and Nordestgaard BG (2007) Increased risk of breast cancer associated with CHEK21100delC. *J Clin Oncol* 25(1):57-63.

Weitzel JN, Lagos VI, Cullinane CA, GambolPJ, Culver JO, Blazer KR, Palomares MR, Lowstuter KJ and MacDonald DJ (2007) Limited Family Structure and BRCA Gene Mutation Status in Single Cases of Breast Cancer. *JAMA* 297(23):2587-2595.

Wilcox CB, Baysal BE, Gallion HH, Strange MA and de Loia JA (2005) High-resolution methylation analysis of the BRCA1 promoter in ovarian tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 159:114-122.

Wong P, Verselis SJ, Garber JE, Schneider K, DiGianni L, Stockwell DH, Li FP and Syngal S (2006) Prevalence of early onset colorectal cancer in 397 patients with classic Li-Fraumeni syndrome. *Gastroenterology* 130:73-79.

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, Fields P, Marshall G, Narod S, Lenoir GM, Lynch H, Feunteun J, Devilee P, Cornelisse CJ, Menko FH, Daly PA, Ormiston W, McManus R, Pye C, Lewis CM, Cannon-Albright LA, Peto J, Ponder B, Skolnick M, Easton DF, Goldgar DE and Stratton and Michael R (1994) Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2 to chromosome 13q12-13. *Science* 265:2088-2090.

Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MC, Hwang LY, Bowcock AM and Baer R (1996) Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet* 14:430-440.

Wu X, Zhao H, Amos CI, Shete S, Maman N, Hong WK, Kadlubar FF and Spitz MR (2002) p53 Genotypes and Haplotypes Associated With Lung Cancer Susceptibility and Ethnicity. *J Natl Cancer Inst* 94:681-690.

Zhou XP, Marsh DJ, Morrison CD, Chaudhury AR, Maxwell M, Reifenger G and Eng C (2003) Germline Inactivation of PTEN and Dysregulation of the Phosphoinositol-3-Kinase/Akt Pathway Cause Human Lhermitte-Duclos Disease in Adults. *Am J Hum Genet* 73:1191-1198.

Banco de dados BIC (Breast Cancer Information Core database) <http://research.nhgri.nih.gov/bic> (junho, 2007)

Banco de dados de TP53, International Agency for Research on Cancer <http://www-p53.iarc.fr/Germline.html> (outubro, 2006)

Banco de dados de TP53, International Agency for Research on Cancer <http://www-p53.iarc.fr/PolymorphismsView.asp> (outubro, 2006)

Software que possibilita predição da patogenicidade de variantes de sequência in silico: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/> (junho, 2007)

Website contendo dados gerais referentes ao município de Porto Alegre <http://www2.portoalegre.rs.gov.br/observatorio> (maio, 2007)

Website contendo informações relacionadas ao Programa de Saúde da Família <http://www.saude.gov.br/psf> (abril, 2007)

Website contendo informações sobre as diferentes síndromes de predisposição hereditária ao câncer. <http://www.genetests.org> (abril, 2007)

Website contendo informações sobre incidência de câncer de mama nos EUA: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html> (julho, 2007)

Website contendo informações sobre incidência do câncer de mama: http://www.health.nsw.gov.au/public-health/chorep97/can_brstage.htm (julho, 2007)

Website da Organização Pan-americana de Saúde <http://www.paho.org/english/dd/ais/coredata.htm> (junho, 2007)

Website do Sistema Único de Saúde Brasileiro <http://www.datasus.gov.br> (maio, 2007)

Website do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística <http://www.ibge.gov.br> (maio, 2007)

Website do Instituto Nacional do Câncer <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006> (junho, 2007)

12. ANEXOS

12.1 ANEXOS REFERENTES AO CAPITULO 1

12.1.1 Questionário de inclusão no estudo

12.1.2 Questionário de conhecimento

12.1.4 Critérios clínicos

CRITÉRIOS PARA INCLUSÃO EM SÍNDROMES DE PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER DE MAMA:

1. HBCC – SÍNDROME DE PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER DE MAMA E CÂNCER COLORRETAL:

1. 3 casos de CCR e 1 de ca de mama (qquer idade);
2. 3 casos de ca de mama e 1 de CCR (qquer idade);
3. 2 casos de ca de mama (1 < 60 anos) e 1 caso de ca de mama + CCR;
4. 2 casos de ca de mama e 1 caso de CCR (< 50 anos);
5. 2 casos de ca de mama e 2 casos de CCR em qquer idade.

2. HBOC – SÍNDROME DE PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO CRITÉRIOS DA ASCO:

1. 3 ou + casos de ca de mama e 1 ou + de ca de ovário em qquer idade;
2. Mais de 3 casos de ca de mama com dx antes dos 50 anos;
3. 3 casos de ca de mama com dx antes dos 50 anos;
4. Pares de irmãs (ou mãe-filha) com 2 dos seguintes antes dos 50 anos:
 - 4A) 2 casos de câncer de mama
 - 4B) 2 casos de câncer de ovário
 - 4C) 1 caso de câncer mama e 1 caso de câncer de ovário

3. SÍNDROME DE LI-FRAUMENI

- Sarcoma na infância ou em idade jovem (antes dos 45 anos) E
- Parente de 1º grau com qquer ca em idade jovem (antes dos 45 anos) E
- Parente de 1º ou 2º graus que tenha o dx de ca em idade jovem (antes dos 45 anos) ou sarcoma em qquer idade.

4. SÍNDROME DE LI-FRAUMENI *like*

- Ca na infância (qquer tipo) OU tumor de SNC ou adreno-cortical antes dos 45 anos E
- Familiar de 1º ou 2º graus com ca típico de SLF (sarcoma, ca de mama, SNC, adreno-cortical, leucemia, melanoma, de células germinativas, gástrico, de pâncreas, pulmão, laringe, próstata, linfoma, CCR, Wilms) em qquer idade E
- Familiar de 1º ou 2º graus com qquer ca antes dos 60 anos de idade.

5. SÍNDROME DE LI-FRAUMENI - CRITÉRIOS DE EELES

- 2 familiares de 1º ou 2º graus com cas típicos de SLF em qquer idade.
- Eeles 1 – 2 tumores diferentes incluindo sarcoma, ca mama, tumor de SNC, adrenocortical, melanoma, ca próstata, pâncreas, leucemia em familiares de 1º ou 2º grau em qualquer idade.
 - Eeles 2 – Sarcoma em qualquer idade no probando mais 2 tumores podendo ser de ca mama < 50, tumor SNC, leucemia, adrenocortical, melanoma, próstata, pâncreas ou sarcoma em qualquer idade.

7. SÍNDROME DE COWDEN

Critérios Patognomônicos : Doença de Lhermitte-Duclos disease (gangliocitoma cerebelar displásicos); Lesões mucocutâneas: triquilemomas (faciais), queratoses acrais, lesões papilomatosas e lesões de mucosa

Critérios Maiores: Câncer de mama; Câncer de tireóide não-medular, geralmente folicular; Macrocefalia (PC > p97); Câncer de endométrio.

Critérios menores: Outras lesões de tireóide; Deficiência mental (QI \leq 75); Pólipos hamartomatosos intestinais; Doença fibrocística da mama; Lipomas; Fibromas, fibróides uterinos; Tumores do trato GU ou malformações do trato GU

- **O diagnóstico de Síndrome de Cowden é feito se:**

I) Considerando somente os critérios patognomônicos o paciente tiver:

- Seis ou + pápulas faciais, das quais 3 ou + são triquilemomas ou
- Pápulas faciais cutâneas e papilomatose mucosa oral ou
- Papilomatose da mucosa oral e ceratoses acrais ou
- Seis ou + ceratoses palmo-plantares

II) Dois ou mais critérios maiores

III) Um critério maior e pelo menos três critérios menores

IV) Pelo menos 4 critérios menores

12.1.5 Questionário de motivação para teste genético

MOTIVAÇÃO PARA TESTE GENETICO

Atualmente, é possível usar um teste de sangue para determinar quais pessoas de uma família com vários casos de câncer de mama, têm uma alteração genética que dará maior risco de ter câncer. Uma mulher que herdar essa alteração genética terá um alto risco de ter câncer de mama ao longo da vida. Uma mulher que não herdar essa alteração genética terá um risco de ter câncer de mama ao longo da vida igual ao de qualquer outra mulher de sua idade. Se esse teste de sangue estivesse à disposição e pudesse lhe dizer se você herdou ou não uma alteração genética desse tipo, você faria o teste?

sim

não

não sei

RAZÕES PARA QUERER FAZER UM TESTE QUE PODERÁ LHE DIZER O RISCO DE TER CÂNCER DE MAMA:

	Concorda	Não concorda
Planejar o futuro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tomar decisões sobre casamento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tomar decisões sobre ter ou não filhos	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Saber se os filhos estão em risco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tomar mais cuidados consigo mesma	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fazer exames de prevenção do câncer com maior frequência	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

RAZÕES PARA NÃO QUERER FAZER UM TESTE QUE PODERÁ LHE DIZER O RISCO DE TER CÂNCER DE MAMA:

	Concorda	Não concorda
Preocupação com reações emocionais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Preocupação com reações do companheiro	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Preocupação com reações da família	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Saber se os filhos estão em risco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Preocupação com reações do sistema de saúde	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Incertezas sobre a capacidade do teste realmente determinar o resultado correto	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

IMPACTO ANTECIPADO DE UM RESULTADO POSITIVO

Se você decidir fazer o teste e ele mostrar que você tem uma alteração genética relacionada ao câncer de mama, como você reagiria durante o primeiro ano após o teste?

	Não é muito provável	É provável	É muito provável
Eu ficaria muito deprimida	()	()	()
Eu ficaria muito ansiosa	()	()	()
Eu me sentiria mais em controle	()	()	()
Teria efeito negativo no meu casamento	()	()	()
Teria efeito negativo na minha qualidade de vida	()	()	()

IMPACTO ANTECIPADO DE UM RESULTADO NEGATIVO

Se você decidir fazer o teste e ele mostrar que você NÃO tem uma alteração genética relacionada ao câncer de mama, como você reagiria durante o primeiro ano após o teste?

	Não é muito provável	É provável	É muito provável
Eu ficaria menos deprimida	()	()	()
Eu ficaria menos ansiosa	()	()	()
Eu continuaria preocupada	()	()	()
Teria efeito negativo no meu casamento	()	()	()
Teria efeito negativo na minha qualidade de vida	()	()	()
Eu me sentiria culpada se mais alguém na família tivesse essa alteração	()	()	()

Você acha que a chance de encontrar uma alteração genética que dá maior risco de câncer em sua família é:

() muito pequena () pequena () moderada () alta () muito alta

12.1.6 Laudo para paciente alto risco I (pacientes de 15 a 39 anos)

Relatório de Avaliação Genética Realizada no Núcleo Mama Porto Alegre
Projeto de Pesquisa: “Identificação e Caracterização de Pacientes em Risco para Câncer de
Mama Hereditário no Sul do Brasil”

Porto Alegre, xx de xxxxxxx de 2007.

Prezada Sra. _____
Endereço: _____
Posto: _____

Estamos escrevendo esse relatório para que a Sra. tenha um resumo por escrito da avaliação genética que realizou no Núcleo Mama Porto Alegre (NMPOA). A senhora foi encaminhada para participar deste projeto de pesquisa porque faz parte dos postos participantes do Programa Saúde da Mama e porque informou que há casos de câncer em sua família. O objetivo deste projeto é identificar pessoas e famílias com risco aumentado para as formas genéticas de câncer de mama e assim tentar auxiliar na identificação precoce e prevenção do câncer de mama.

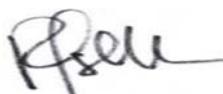
Quando a senhora consultou conosco em XX/XX/XXXX (GXXX), estava com XX anos e conversamos sobre a sua história médica e sobre a sua história familiar. Com a história que a Sra. relatou *verificamos que há vários casos de câncer em sua família com características sugestivas para uma tendência genética ao desenvolvimento de tumores*. Pela história que a Sra. relatou verificamos uma suspeita de que sua família possa ter uma predisposição à síndrome XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX. Conversamos sobre o significado deste diagnóstico, se fosse confirmado por um teste de DNA e após aconselhamento a Sra. e/ou seus familiares decidiram prosseguir e realizar esse teste genético para tentar confirmar ou não se há uma tendência genética ao câncer em sua família. Explicamos que esse teste genético é feito dentro de um projeto de pesquisa e que não há prazo exato para que tenhamos um resultado. Além disso, é possível que o teste não identifique uma alteração genética ou que pode significar que sua família não tem essa tendência ou que o teste realizado não conseguiu com 100% de certeza “achar” uma alteração genética que explique os casos de câncer em sua família. Quando o resultado do teste estiver disponível faremos contato telefônico ou por carta, chamando-a para nova consulta na qual será transmitido o resultado.

Enquanto aguardamos o resultado do teste genético recomendamos que você faça acompanhamento com mastologista no NMPOA a cada 6 meses. Essa consulta deve ser preferencialmente marcada pelo seu posto de saúde, ou a Sra. pode ligar diretamente para o NMPOA para marcação da sua consulta. Havendo qualquer mudança na história de sua família (por exemplo, aparecimento de um novo caso de câncer), esta deve ser comunicada à equipe.

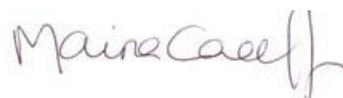
Como qualquer mulher, a senhora deve continuar realizando as medidas para detecção precoce do câncer: auto-exame das mamas a cada mês (logo após

o período menstrual) e exame preventivo do câncer de colo de útero (no posto de saúde) a cada ano. É importante também que a Sra. tente introduzir e manter em sua rotina o exercício físico (pelo menos 4h por semana) e uma dieta rica em fibras com baixas quantidades de gordura animal pois esses são fatores reconhecidamente protetores para a ocorrência de câncer de mama. Além disso, é importante que evite exposição desnecessária a hormônios, o que pode aumentar o risco para câncer de mama. A partir dos 40 anos de idade (ou antes, se indicado pelo mastologista), deve realizar uma mamografia anualmente.

Agradecemos a participação da Sra. em nossa pesquisa e nos colocamos à disposição para eventuais esclarecimentos pelo telefone (51) 3315-8641. Cordialmente,



Dra. Patricia Ashton-Prolla
Coordenadora da Pesquisa em Genética
Mama Porto Alegre



Dra. Maira Caleffi
Coordenadora do Núcleo

12.1.7 Laudo para paciente alto risco II (pacientes de 40 a 69 anos)

Relatório de Avaliação Genética Realizada no Núcleo Mama Porto Alegre

Projeto de Pesquisa: “Identificação e Caracterização de Pacientes em Risco para Câncer de Mama Hereditário no Sul do Brasil”

Porto Alegre, xx de xxxxxxx de 2007.

Prezada Sra. _____
Endereço: _____
Posto: _____

Estamos escrevendo esse relatório para que a Sra. tenha um resumo por escrito da avaliação genética que realizou no Núcleo Mama Porto Alegre (NMPOA). A senhora foi encaminhada para participar deste projeto de pesquisa porque faz parte dos postos participantes do Programa Saúde da Mama e porque informou que há casos de câncer em sua família. O objetivo deste projeto é identificar pessoas e famílias com risco aumentado para as formas genéticas de câncer de mama e assim tentar auxiliar na identificação precoce e prevenção do câncer de mama.

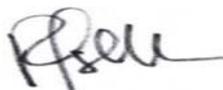
Quando a senhora consultou conosco em XX/XX/XXXX (GXXX), estava com XX anos e conversamos sobre a sua história médica e sobre a sua história familiar. Com a história que a Sra. relatou *verificamos que há vários casos de câncer em sua família com características sugestivas para uma tendência genética ao desenvolvimento de tumores*. Pela história que a Sra. relatou verificamos uma suspeita de que sua família possa ter uma predisposição à síndrome XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX. Conversamos sobre o significado deste diagnóstico, se fosse confirmado por um teste de DNA e após aconselhamento a Sra. e/ou seus familiares decidiram prosseguir e realizar esse teste genético para tentar confirmar ou não se há uma tendência genética ao câncer em sua família. Explicamos que esse teste genético é feito dentro de um projeto de pesquisa e que não há prazo exato para que tenhamos um resultado. Além disso, é possível que o teste não identifique uma alteração genética ou que pode significar que sua família não tem essa tendência ou que o teste realizado não conseguiu com 100% de certeza “achar” uma alteração genética que explique os casos de câncer em sua família. Quando o resultado do teste estiver disponível faremos contato telefônico ou por carta, chamando-a para nova consulta na qual será transmitido o resultado.

Enquanto aguardamos o resultado do teste genético recomendamos que você faça acompanhamento com mastologista no NMPOA a cada 6 meses. Essa consulta deve ser preferencialmente marcada pelo seu posto de saúde, ou a Sra. pode ligar diretamente para o NMPOA para marcação da sua consulta. Havendo qualquer mudança na história de sua família (por exemplo, aparecimento de um novo caso de câncer), esta deve ser comunicada à equipe.

Como qualquer mulher entre os 40 e 69 anos de idade, a senhora deve continuar realizando as medidas para a detecção precoce do câncer: auto-exame das mamas a cada mês, exame preventivo do câncer de colo de útero e

mamografia (esta última no NMPOA) a cada ano. É importante também que a Sra. tente introduzir e manter em sua rotina o exercício físico (pelo menos 4h por semana) e uma dieta rica em fibras com baixas quantidades de gordura animal pois esses são fatores reconhecidamente protetores para a ocorrência de câncer de mama. Além disso, é importante que evite exposição desnecessária a hormônios, o que pode aumentar o risco para câncer de mama.

Agradecemos a participação da Sra. em nossa pesquisa e nos colocamos à disposição para eventuais esclarecimentos pelo telefone (51) 3315-8641. Cordialmente,



Dra. Patricia Ashton-Prolla
Coordenadora da Pesquisa em Genética
Mama Porto Alegre



Dra. Maira Caleffi
Coordenadora do Núcleo

Lembre-se que todos os anos:

Você deve marcar uma consulta de revisão no NMPOA para os meses _____ e _____. Sua mamografia deve ser realizada no mês de _____.

12.1.8 Laudo para paciente risco moderado

Relatório de Avaliação Genética Realizada no Núcleo Mama Porto Alegre **Projeto de Pesquisa: “Identificação e Caracterização de Pacientes em Risco para** **Câncer de Mama Hereditário no Sul do Brasil”**

Porto Alegre, xx de xxxxxx de 2007.

Prezada Sra. _____
Endereço: _____
Posto: _____

Estamos escrevendo esse relatório para que a Sra. tenha um resumo por escrito da avaliação genética que realizou no Núcleo Mama Porto Alegre (NMPOA). A senhora foi encaminhada para participar deste projeto de pesquisa porque faz parte dos postos participantes do Programa Saúde da Mama e porque informou que há casos de câncer em sua família. O objetivo deste projeto é identificar pessoas e famílias com risco aumentado para as formas genéticas de câncer de mama e assim tentar auxiliar na identificação precoce e prevenção do câncer de mama.

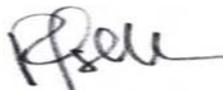
Quando a senhora consultou conosco em XX/XX/XXXX (GXXX), estava com XX anos e conversamos sobre a sua história médica e sobre a sua história familiar. Com a história que a Sra. relatou *não há indicativos de uma predisposição hereditária ao câncer de mama em sua família* (considerando as síndromes comuns de predisposição, chamadas: “câncer de mama/ovário hereditário”, “câncer de mama/intestino hereditário”, “síndrome de Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-like” e “síndrome de Cowden”). Isso significa que no momento, as informações confirmadas sobre o número de casos de câncer, os tipos de câncer e as idades ao aparecimento dos tumores em sua família **não são** suficientes para dizer que a senhora ou sua família tenham maior risco para as formas genéticas de câncer. Sendo assim, não há, nesse momento, motivo para realizar uma investigação genética adicional. Qualquer mudança na história de sua família (por exemplo, aparecimento de um novo caso de câncer) pode mudar essa avaliação e deve ser comunicada à equipe do NMPOA.

Por outro lado, a avaliação de outros fatores de risco para câncer de mama além da história da sua família, indicou que *a sua chance de desenvolver câncer de mama ao longo da vida é um pouco maior que a chance média das mulheres de sua idade*. Por este motivo, recomendamos que a Sra. consulte a cada seis meses com a equipe do NMPOA para uma avaliação das mamas e para realização de exames se necessário. Essa consulta deve ser preferencialmente marcada pelo seu posto de saúde, ou a Sra. pode ligar diretamente para o NMPOA para marcação da sua consulta.

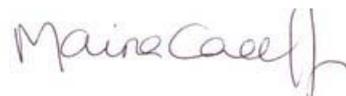
Como qualquer mulher entre os 40 e 69 anos de idade, a senhora deve continuar realizando as medidas para a detecção precoce do câncer: auto-exame das mamas a cada mês, exame preventivo do câncer de colo de útero e mamografia (esta última no NMPOA) a cada ano.

É importante também que a Sra. tente introduzir e manter em sua rotina o exercício físico (pelo menos 4h por semana) e uma dieta rica em fibras com baixas quantidades de gordura animal pois esses são fatores reconhecidamente protetores para a ocorrência de câncer de mama. Além disso, é importante que evite exposição desnecessária a hormônios, o que pode aumentar o risco para câncer de mama.

Agradecemos a participação da Sra. em nossa pesquisa e nos colocamos à disposição para eventuais esclarecimentos pelo telefone (51) 3315-8641. Cordialmente,



Dra. Patricia Ashton-Prolla
Coordenadora da Pesquisa em Genética
Mama Porto Alegre



Dra. Maira Caleffi
Coordenadora do Núcleo

Lembre-se que todos os anos:

Você deve marcar uma consulta de revisão no NMPOA para os meses _____ e _____. Sua mamografia deve ser realizada no mês de _____.

12.1.9 Laudo para paciente baixo risco

Relatório de Avaliação Genética Realizada no Núcleo Mama Porto Alegre
Projeto de Pesquisa: “Identificação e Caracterização de Pacientes em Risco para
Câncer de Mama Hereditário no Sul do Brasil”

Porto Alegre, xx de xxxxxxx de 2007.

Prezada Sra. _____
Endereço: _____
Posto: _____

Estamos escrevendo esse relatório para que a Sra. tenha um resumo por escrito da avaliação genética que realizou no Núcleo Mama Porto Alegre (NMPOA). A senhora foi encaminhada para participar deste projeto de pesquisa porque faz parte dos postos participantes do Programa Saúde da Mama e porque informou que há casos de câncer em sua família. O objetivo deste projeto é identificar pessoas e famílias com risco aumentado para as formas genéticas de câncer de mama e assim tentar auxiliar na identificação precoce e prevenção do câncer de mama.

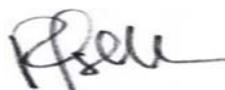
Quando a senhora consultou conosco em XX/XX/XXXX (GXXX), estava com XX anos e conversamos sobre a sua história médica e sobre a sua história familiar. Com a história que a Sra. relatou *não há indicativos de uma predisposição hereditária ao câncer de mama em sua família* (considerando as síndromes comuns de predisposição, chamadas: “câncer de mama/ovário hereditário”, “câncer de mama/intestino hereditário”, “síndrome de Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-like” e “síndrome de Cowden”). Isso significa que no momento, as informações confirmadas sobre o número de casos de câncer, os tipos de câncer e as idades ao aparecimento dos tumores em sua família **não são** suficientes para dizer que a senhora ou sua família tenham maior risco para as formas genéticas de câncer. Sendo assim, não há, nesse momento, motivo para realizar uma investigação genética adicional. Qualquer mudança na história de sua família (por exemplo, aparecimento de um novo caso de câncer) pode mudar essa avaliação e deve ser comunicada à equipe do NMPOA.

Além disso, a avaliação de outros fatores de risco além do genético indicou que *o seu risco de ter câncer de mama ao longo da vida não é significativamente diferente do risco médio de mulheres de sua idade*. Qualquer mudança na história de sua família (por exemplo, aparecimento de um novo caso de câncer) pode mudar essa avaliação e deve ser comunicada à equipe do NMPOA.

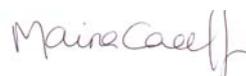
Entre os 40 e 69 anos, como qualquer mulher nessa faixa de idade, a senhora deve continuar realizando as medidas para a detecção precoce do câncer: auto-exame das mamas a cada mês, exame preventivo do câncer de colo de útero e mamografia (esta última no NMPOA) a cada ano.

É importante também que a Sra. tente introduzir e manter em sua rotina o exercício físico (pelo menos 4h por semana) e uma dieta rica em fibras com baixas quantidades de gordura animal pois esses são fatores reconhecidamente protetores para a ocorrência de câncer de mama. Além disso, é importante que evite exposição desnecessária a hormônios, o que pode aumentar o risco para câncer de mama.

Agradecemos a participação da Sra. em nossa pesquisa e nos colocamos à disposição para eventuais esclarecimentos pelo telefone (51) 3315-8641. Cordialmente,



Dra. Patricia Ashton-Prolla
Coordenadora da Pesquisa em Genética
Mama Porto Alegre



Dra. Maira Caleffi
Coordenadora do Núcleo

Lembre-se que todos os anos:

Você deve marcar uma consulta de revisão no NMPOA para o mês de

_____.
Sua mamografia deve ser realizada no mês de _____.

12.1.10 Folder educativo

Você sabia que...

- Cerca de uma em cada dez mulheres, no Rio Grande do Sul, poderá desenvolver câncer de mama ao longo da vida;
- **O câncer de mama tem cura. Descobrir o câncer em seus estágios iniciais aumenta em muito a chance de sobreviver a esta doença;**
- O câncer de mama é o tumor mais freqüente em mulheres de todas as idades e é primeira causa de morte por câncer em mulheres entre 30 e 49 anos;
- **O auto-exame das mamas é uma das ferramentas mais importantes para descobrir cedo a existência do câncer de mama em uma mulher;**
- O câncer de mama pode acontecer em qualquer idade, mas é mais freqüente depois dos 50 anos de idade;
- **A partir dos 18 anos de idade toda a mulher deve fazer mensalmente o auto-exame das mamas. De preferência, logo após o seu ciclo menstrual;**
- Além do auto-exame das mamas, é importante que cada mulher, todos os anos, faça o exame preventivo do colo do útero. A partir dos 40 anos o exame de mamografia deve ser feito por todas as mulheres, anualmente;

Sabemos que algumas medidas podem reduzir a chance de uma mulher ter câncer de mama:

- *Amamentar os filhos ao seio;*
- *Fazer exercícios regularmente;*
- *Manter dieta balanceada evitando a obesidade.*

Grupo de Genética
Núcleo Mama Porto Alegre

Projeto Saúde da Mama
Porto Alegre

HOSPITAL MOINHOS DE VENTO

INSTITUTO DA MAMA
DO RIO GRANDE DO SUL

Prefeitura de
Porto Alegre
RS - Brasil
Secretaria Municipal de Saúde

Grupo de Genética
Núcleo Mama Porto Alegre

Conhecer a história de sua família pode ser importante para a saúde da mama

A chance de ter câncer de mama é igual para todos?

A maioria dos tumores de mama ocorre em pessoas que não têm familiares com a doença;

Entretanto, um pequeno grupo de mulheres tem uma tendência hereditária ao câncer de mama;

Estas mulheres devem ser acompanhadas de maneira especial.

Por que as mulheres que têm uma tendência hereditária ao câncer de mama devem ser acompanhadas de forma especial?

Porque algumas medidas podem ser tomadas para diminuir a chance do câncer se desenvolver nessas mulheres.

Quando se suspeita que uma pessoa possa ter tendência hereditária ao câncer de mama?

Quando ela tem familiares que tiveram câncer de mama antes dos 50 anos;

Quando ela tem familiares que tiveram câncer nas duas mamas;

Quando ela tem um familiar do sexo masculino com câncer de mama;

Quando ela tem familiares com câncer de mama, ovário e/ou intestino;

Quando ela tem vários familiares jovens com câncer, em mais de uma geração da família.

SE VOCÊ TEM HISTÓRIA DE CâNCER NA FAMÍLIA, CONVERSE COM SEU MÉDICO A RESPEITO!

HÁ MUITAS MANEIRAS DE PREVENIR O CâNCER, MESMO NAS PESSOAS DE MAIOR RISCO!

Conhecer a história de sua família, pode ser importante para a saúde da mama.

TELEFONES UTEIS

NMPOA
Núcleo Mama Porto Alegre
(51) 3315-8136

IMAMA
Instituto da Mama do Rio Grande do Sul
(51) 3264-3000

Disque Saúde Mulher
Secretaria Especial de Políticas para as mulheres -
Presidência da República e Ministério da Saúde
0800-644-0803

ANOTE SEUS EXAMES

Exame	Data
.....
.....
.....
.....
.....

12.1.11 – TERMO DE CONSENTIMENTO PARA AVALIAÇÃO DE RISCO GENÉTICO

O Núcleo Mama Porto Alegre, em colaboração com a Secretaria Municipal da Saúde e o Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, estão realizando um estudo sobre fatores genéticos no câncer de mama. Em uma fase inicial, estamos tentando identificar qual a frequência de fatores de risco genético para o câncer de mama em um grupo de mulheres de Porto Alegre.

Você está sendo convidado a participar deste estudo que envolve participar de uma consulta para descrever a história de sua família e responder a questionários de conhecimento sobre câncer de mama e sobre sua percepção do risco de câncer de mama. Se for confirmado um risco maior para câncer de mama hereditário, você e possivelmente seus familiares serão convidados para realizar uma avaliação genética no Núcleo Mama Porto Alegre.

Você pode escolher se quer ou não participar do estudo. Se você decidir que não quer participar, isso não vai afetar de maneira nenhuma o seu atendimento. Se você quiser participar, uma pessoa da equipe de saúde estará à sua disposição para esclarecer dúvidas. O resultado desse estudo será importante para que possamos entender melhor se nesse grupo de mulheres de Porto Alegre há um risco maior para câncer de mama hereditário. Essa informação poderá nos ajudar a acompanhar e tratar melhor as mulheres em risco.

Se você quer participar do estudo, por favor assine este documento. As informações dessa pesquisa serão utilizadas somente pela equipe de saúde. Em caso de publicação, os dados desse estudo serão utilizados de forma anônima.

Muito obrigada por sua atenção

Nome e assinatura do paciente

Nome e assinatura do entrevistador

Local e Data: Porto Alegre, ____ / ____ / ____.

Pesquisadores responsáveis:

Dra. Patrícia Ashton-Prolla

Dra. Lavinia Schuler-Faccini

Dra. Maira Caleffi

Dr. Roberto Giugliani

Telefone para contato: (51) 3315-8641

TCLE PARA TESTE GENÉTICO

12.1.12 TCLE para teste genético

IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE MUTAÇÕES NOS GENES *BRCA1* E *BRCA2* E OUTROS GENES DE PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER DE MAMA E/OU CÂNCER DE OVÁRIO POR DHPLC/MLPA

INVESTIGADORES:

**Patricia Ashton-Prolla, Lavínia Schüler-Faccini, Luciane Kalakun,
Edenir Inêz Palmero, Maira Caleffi, Roberto Giugliani.**

CONSENTIMENTO INFORMADO – CASOS-ÍNDICE

OBJETIVO:

Você está sendo convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pacientes com câncer de mama. O objetivo deste estudo é analisar a contribuição de uma causa genética (alterações nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e outros genes de predisposição) para a ocorrência de câncer de mama e ovário na nossa população. Mulheres que herdaram uma mutação em gene de predisposição em um destes genes têm risco aumentado de desenvolver câncer de mama e ovário ao longo da vida e também podem ter risco maior para outros tumores. Homens afetados em uma família com mais casos de câncer de mama e ovário podem ter risco maior de certos tipos de câncer.

PROCEDIMENTO DA INVESTIGAÇÃO:

Esse é um estudo observacional e sua participação não vai influenciar ou modificar seu acesso a tratamento médico agora ou no futuro. A sua participação nesse estudo é voluntária. Você tem o direito a se recusar a participar do estudo e você pode desistir da participação em qualquer momento do estudo, sem que isso influencie o seu acesso a tratamento médico. Você também tem a opção de participar desse estudo anonimamente, situação em que seu DNA será estudado para alterações em genes de predisposição ao câncer de mama e ovário, mas não lhe será dito o resultado. Nesse caso você receberá recomendações sobre condutas de prevenção de câncer de acordo com seu risco.

O estudo envolve participar de pelo menos duas sessões de aconselhamento genético antes da coleta de sangue. Nessas consultas, você terá a oportunidade de discutir os possíveis benefícios, limitações e riscos da análise genética dos genes de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário em seu caso. Vão lhe explicar que este teste não tem uma precisão de 100% e que há limitações sobre o que o teste pode lhe revelar. O teste pode lhe proporcionar uma estimativa mais precisa do risco de desenvolver um segundo câncer de mama e/ou ovário e outros cânceres ao longo de sua vida. Este teste também permite determinar se você tem uma alteração nesses genes que pode ser transmitida para seus filhos. Este teste não vai lhe trazer informações sobre o seu atual estado de saúde.

Para participar do estudo você terá que fornecer informações detalhadas sobre sua história familiar, inclusive informações sobre parentes que tiveram câncer de mama e/ou ovário, bem como outros tumores. Será sugerido que você forneça informações sobre esta avaliação que vem realizando e o teste genético a outros familiares que precisem ser contactados. Quando você receber o resultado de seu teste, poderá ter que transmitir esse resultado a outros familiares. Isso não significa que você está dando consentimento para que outros membros da sua família participem deste teste genético. Nenhum familiar seu será contactado pela equipe médica antes

de receber, de você, informações sobre esse projeto. Se outros familiares decidirem participar, eles serão atendidos pela equipe para conhecer melhor o estudo e então assinar formulário de consentimento. Nenhuma informação médica a seu respeito será fornecida a outros familiares durante o processo de entrevistas sem o seu consentimento.

Quando a análise estiver concluída, você será contactado(a) e convidado(a) a marcar uma consulta para receber o resultado do exame pessoalmente. Nenhuma informação será fornecida por telefone ou carta, independente do resultado. Você também será contactada no futuro por membros desta equipe para obter informações sobre sua saúde ou sobre a saúde de outros familiares.

Este projeto de pesquisa é possibilitado por uma colaboração entre várias Instituições, incluindo Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Núcleo Mama Porto Alegre, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Secretaria Municipal de Saúde. Todas etapas da investigação serão realizadas em Porto Alegre: as consultas e a avaliação genética no Núcleo Mama Porto Alegre e parte da investigação laboratorial no Departamento de Genética da UFRGS e no Serviço de Genética Médica do HCPA. Em raras situações é necessário coletar mais de uma amostra de sangue para realizar teste genético. Caso a primeira amostra não seja suficiente ou adequada, você será chamado(a) para realizar nova coleta.

Como esse é um projeto de pesquisa e o exame não será realizado em um laboratório comercial, não há prazo exato para liberação do resultado e este será liberado vários meses após a coleta (em geral 48 a 36 meses). Além disso, em alguns casos, a informação obtida com o teste poderá ser inconclusiva.

PROCEDIMENTO DA COLETA DO SANGUE:

O teste genético normalmente requer 10 ml de sangue. Antes de seu sangue ser coletado, certifique-se que seu nome está corretamente escrito em todos tubos de sangue vazios e depois da coleta você vai assinar um formulário indicando que confirmou a identificação de todos tubos. Você tem a opção de não querer receber ou querer retardar o recebimento dos resultados da análise genética durante qualquer momento do processo de testagem.

RESULTADOS:

- 1) Quando o resultado do teste laboratorial estiver disponível, você poderá adiar ou recusar o recebimento destes resultados. Se você quiser saber qual é o resultado, este será fornecido durante uma sessão pessoal de aconselhamento genético no Núcleo Mama Porto Alegre. A princípio, esse aconselhamento é realizado individualmente mas você poderá trazer um familiar ou outra pessoa para acompanhar a consulta. O resultado jamais será fornecido por telefone, fax ou carta. Excepcionalmente, o resultado poderá ser fornecido a um de seus familiares, se autorizado previamente por você e se esta pessoa estiver acompanhando a investigação e também tiver realizado aconselhamento genético prévio.

Durante o aconselhamento, vão lhe explicar que há três possíveis resultados para o teste genético:

- 2) Você pode ter herdado um gene de predisposição ao câncer de mama e ovário alterado (mutado). Mulheres com uma alteração destas podem ter um risco muito aumentado de desenvolver câncer de mama e/ou ovário e outros tumores. Você poderá descobrir que tem um risco aumentado de ter um segundo câncer, do mesmo tipo ou de um tipo diferente do que já teve. Homens com uma alteração destas também podem ter risco maior para certos tipos de câncer.
- 3) Você pode não ter herdado um gene de predisposição alterado. Com isso, podemos chegar à conclusão que uma alteração nos genes até agora associados ao câncer de mama e ovário não explica sua história pessoal e familiar de câncer. Ainda assim, é possível que você tenha

herdado um outro gene de predisposição ao câncer de mama para o qual ainda não há testes disponíveis.

- 4) Pode ser impossível de determinar se você herdou ou não um gene de predisposição alterado (teste inconclusivo). Se o teste laboratorial for inconclusivo, você terá a opção de repetir o teste em outra data. Nesta hipótese, você poderia ter herdado uma alteração em outro gene de susceptibilidade ao câncer, para o qual não foi testado(a).

Em caso de um teste inconclusivo, o laboratório continuará estudando sua amostra de sangue (DNA) à procura de outros genes alterados que possam estar contribuindo para a ocorrência de câncer. Porém, se esse for o caso, não há prazo ou promessa de um resultado conclusivo para essa segunda investigação.

RISCOS E DESCONFORTO:

Normalmente há riscos mínimos e infreqüentes envolvidos na coleta de uma amostra de sangue. Estes riscos incluem: dor no local da coleta, sangramento, hematoma (uma marca roxa na pele) e infecção.

Os riscos desse estudo são primariamente de origem psicológica para aqueles participantes que desejarem ser informados do resultado. Saber que você tem um gene de predisposição ao câncer alterado, poderia causar depressão, ansiedade, raiva e medo do futuro. Este resultado poderia afetar as suas relações com familiares e entes queridos. Se você descobrir que tem um gene de predisposição alterado, poderia haver algum tipo de discriminação por companhias de seguro médico, empregadores e até mesmo familiares. Algumas pessoas podem ter um sentimento de culpa muito forte ou outras formas de ansiedade ao descobrirem que não herdaram um gene de predisposição alterado, enquanto que outros membros da família herdaram o gene alterado. O aconselhamento genético tem o objetivo de ajudá-lo(a) a ajustar e lidar com a informação recebida. Além disso, avaliação psicológica estará disponível no Núcleo Mama Porto Alegre como parte do projeto para pacientes de alto risco genético que estejam em processo de aconselhamento genético e que assim o desejarem. Este acompanhamento será realizado ao longo do projeto.

Pode acontecer do resultado ser inconclusivo (o laboratório não consegue determinar se você tem um gene de predisposição alterado ou não). Nesse caso, você teria passado por todo processo da análise sem obter nenhuma informação nova sobre seu risco pessoal de desenvolver câncer ou transmitir essa suscetibilidade.

BENEFÍCIOS DA INFORMAÇÃO:

Este teste pode fornecer uma informação que torna possível calcular com maior precisão se você ou seus parentes, inclusive seus filhos, têm um risco alto de desenvolver certos tipos de câncer. Se este for o caso, vocês serão aconselhados quanto às opções de prevenção do câncer e seguimento a longo prazo existentes e quais dessas medidas são comprovadamente eficazes.

Uma informação mais precisa sobre seu risco de desenvolver câncer poderá lhe ajudar a tomar decisões quanto à sua saúde e sobre a prevenção do câncer. Se você tiver um gene de predisposição alterado, esta informação pode lhe ajudar a tomar decisões sobre métodos de detecção precoce ou cirurgias preventivas para câncer, o que pode diminuir o seu risco de ter câncer e/ou morrer de câncer. Atualmente, no entanto, você verá que há pouca informação disponível sobre a eficácia de métodos de detecção precoce para quem herdou uma alteração em gene de predisposição. Se você descobrir que não herdou um gene alterado, você poderá evitar testes de detecção precoce ou cirurgias preventivas desnecessárias. Se você descobrir que não herdou um gene alterado, você não vai transmitir essa alteração para os seus filhos. O fato de descobrir que você não tem uma predisposição maior ao câncer de mama e/ou ovário poderá lhe trazer uma grande sensação de alívio ao descobrir o resultado do teste.

USO DA AMOSTRA DE SANGUE:

Qualquer amostra de sangue obtida com a finalidade de realizar este estudo ficará armazenada nas Instituições participantes. Estas instituições poderão utilizar futuramente estas amostras para pesquisas de alterações genéticas associadas ao câncer de mama e ovário e outros tumores associados. Porém, o uso destas amostras para outros fins que não o desta pesquisa somente poderá ser feito com consentimento informado, expresso e por escrito de sua parte, após projeto específico ter sido submetido a apreciação por comitê(s) de ética em pesquisa da(s) instituição(ões) participantes.

ALTERNATIVA À PARTICIPAÇÃO:

A sua participação neste projeto e na realização destes testes é completamente voluntária e não afetará seu acesso a tratamento médico agora ou no futuro. Você pode optar em não fazer o teste ou fazê-lo de forma anônima. Nesse caso você não irá descobrir se tem um gene de predisposição alterado ou não. Esta decisão é perfeitamente aceitável.

CONFIDENCIALIDADE:

A informação médica que virá com o resultado deste teste torna-se parte de seu prontuário médico. O resultado final do teste genético será mantido unicamente em arquivos da equipe de pesquisa. Somente será registrada no prontuário a sua participação no estudo de pesquisa e realização do teste, mas não o resultado. O resultado somente poderá ser fornecido a qualquer outra pessoa, instituição, empresa, seguro de saúde, etc com sua autorização por escrito. Os dados usados para pesquisa ou publicações científicas não terão informação identificando os participantes.

Por meio dos testes de DNA realizados nesse estudo é possível identificar não-paternidade (ou seja, que seus pais, ou um deles, podem não ser realmente seus pais biológicos). Se a análise genética revelar que você não é biologicamente filho(a) de um ou ambos de seus pais, esta informação não será revelada a você ou qualquer outra pessoa fora da equipe de estudo.

PEDIDO DE MAIS INFORMAÇÕES:

Você pode fazer mais perguntas sobre o andamento do estudo a qualquer momento para qualquer pessoa da equipe de pesquisa. Nossos telefones de contato são 3315-8641 (Núcleo Mama Porto Alegre) e 2101-8011 (Serviço de Genética Médica/HCPA).

ACOMPANHAMENTO MÉDICO

Você e seus familiares em risco para câncer de mama serão acompanhados periodicamente pela equipe de aconselhamento genético durante duração do projeto de pesquisa, se assim o desejarem. Após término do projeto, você poderá continuar sendo acompanhada pela equipe de aconselhamento genético se assim o desejar. Esclarecemos também que toda mulher em atendimento no Núcleo Mama Porto Alegre que for diagnosticada com câncer de mama receberá todo o tratamento necessário, incluindo cirurgia, quimioterapia, acompanhamento clínico em relação a este diagnóstico. Familiares de pacientes de alto risco que forem identificados por este estudo serão encaminhados para acompanhamento em ambulatórios de risco de hospitais públicos de Porto Alegre.

DOCUMENTAÇÃO DE CONSENTIMENTO:

Eu receberei uma cópia deste formulário de consentimento para manter comigo. Uma outra cópia deste consentimento será mantida pela equipe desta pesquisa e uma terceira cópia deste consentimento será mantida no laboratório.

1. Eu gostaria de saber os resultados de meu teste genético, os quais poderão me dar informações sobre o risco de ter um gene alterado que aumenta o risco de câncer de mama/ovário e outros tipos de câncer.

Marque com um X:

Sim _____ Não _____

2. Eu dou permissão para que minha amostra seja estocada para futuras pesquisas na área de genética e câncer. Porém, esta amostra não poderá ser utilizada sem meu consentimento prévio para o fim específico.

Marque com um X:

Sim _____ Não _____

3. No caso de novas informações sobre o risco de mama/ovário e outros tipos de câncer, ou de novas pesquisas nessa área das quais eu poderia participar, gostaria que a equipe de pesquisa entrasse em contato comigo.

Marque com um X:

Sim _____ Não _____

4. Em caso de impossibilidade de receber o resultado do teste genético, autorizo a seguinte pessoa a recebê-lo por mim (pessoalmente):

5. Consentimento:

Eu expliquei a _____ os objetivos e procedimentos necessários para este teste genético e os possíveis riscos e benefícios na minha melhor capacidade.

Assinatura

Nome por extenso

Data

Eu li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Eu concordo em realizar a análise genética e aceito os riscos. Eu entendo a informação fornecida por este documento e eu tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer dúvidas que eu tinha sobre o teste, o procedimento, os riscos associados e as alternativas.

Participante

Data

Data de Nascimento

Testemunha

Data

12.2 ANEXOS REFERENTES AO CAPITULO 2

12.2.1 Protocolo PCR *BRCA1/2*

Reagentes	Volumes		Programa	
H2O	Variável	Variável	94°C 3 min	1X
10x buffer	3 µL	5 µL	94°C 1 min 45 seg	35X
dNTP(B)	1,2 µL	1 µL	Segundo tabela (1 min)	
<i>Primer F</i> (25µM)	0,3 µL	1 µL	72°C 1 min	
<i>Primer R</i> (25µM)	0,3 µL	1 µL	72°C 10 min	1X
Taq Amersham	0,2 µL		10°C HOLD	1X
Discoverase		0,25 µL		
DNA	Variável	Variável		
Total	30 µL	50 µL		

12.2.2 Primers BRCA1/2 e temperaturas DHPLC

	Amplicon	Tamanho (pb)	Primer forward	Primer reverse	PCR (temperatura de anelamento)	DHPLC 1	DHPLC 2	DHPLC 3	DHPLC 4
BRCA1	BRCA1EX2	425	gtt ctt tgg ttt gta tta ttc t	aga ggc aga gtg gat gga	52°C	52°C	55°C	56°C	
	BRCA1EX3	339	tcc tga cac agc aga cat tta	ttg gat ttt cgt tct cac tta	55°C	56°C	58°C		
	BRCA1EX5	333	ctc tta agg gca gtt gtg ag	gat gaa tgg ttt tat agg aac gc	55°C	54°C	55°C	56°C	
	BRCA1EX6	206	ctt att tta gtg tcc tta aaa gg	ttt cat gga cag cac ttg agt t	52°C	57°C	58°C		
	BRCA1EX7	228	cac aac aaa gag cat aca tag gg	tcg ggt tca ctc tgt aga ag	55°C	56°C	58°C		
	BRCA1EX8	409	att ttt tcc agg cat cat aca t	gga act gcg tct ttt aca ttt t	55°C	55°C	58°C	58°C	
	BRCA1EX9	211	cca cag tag atg ctc agt aaa ta	tag gaa aat acc agc ttc ata ga	55°C	55°C	56°C		
	BRCA1EX10	241	tgg tca gct ttc tgt aat cg	gta tct acc cac tct ctt ttc ag	55°C	57°C	58°C		
	BRCA1EX11A	394	tag cca gtt ggt tga ttt cc	ccc atc tgt tat gtt ggc tc	55°C	56°C	57°C	59°C	
	BRCA1EX11B	399	cca tgt ggc aca aat act ca	tga ttc aga ctc ccc atc at	52°C	57°C	57°C	58°C	
	BRCA1EX11C	437	gaa act gcc atg ctc aga ga	att tat ttg tga ggg gac gc	52°C	56°C	57°C		
	BRCA1EX11D	437	tcc cca act taa gcc atg ta	aga aga ctt cct cct cag cc	55°C	55°C	57°C		
	BRCA1EX11E	445	ttc aaa acg aaa gct gaa cc	ttg gaa ggc tag gat tga ca	52°C	55°C	57°C	58°C	
	BRCA1EX11F	416	ggt aaa gaa cct gca act gg	tca aat gct gca cac tga ct	52°C	57°C			
	BRCA1EX11G	381	gaa agg gtt ttg caa act ga	ttc ctc ttc tgc att tcc tg	55°C	56°C	57°C		
	BRCA1EX11H	345	tga act tga tgc tca gta ttt gc	agt cca gtt tcg ttg cct ct	55°C	56°C	57°C	58°C	
	BRCA1EX11I	430	taa gcc agt tga taa tgc ca	ttt tgg ccc tct gtt tct ac	52°C	56°C			
	BRCA1EX11J	309	act aat gaa gtg ggc tcc ag	cag gtc atc agg tgt ctc ag	55°C	55°C	56°C		
	BRCA1EX11K	313	ttc ctg gaa gta att gta agc a	taa ccc tga gcc aaa tgt gta t	58°C	55°C	57°C	58°C	
	BRCA1EX11L	329	gac att aag gaa agt tct gct g	ttt gcc aat att acc tgg tta c	55°C	58°C	59°C		
BRCA1EX11M	438	acc gtt gct acc gag tgt ct	gtg ctc ccc aaa agc ata aa	55°C	56°C	57°C	58°C		
BRCA1EX12	265	gtc ctg cca atg aga aga aa	tgt cag caa acc taa gaa tgt	55°C	58°C	60°C			
BRCA1EX13	320	aat gga aag ctt ctc aaa gta	atg ttg gag cta ggt cct tac	55°C	58°C	59°C			
BRCA1EX14	312	cta acc tga att atc act atc a	gtg tat aaa tgc ctg tat gca	55°C	55°C	56°C	58°C		
BRCA1EX15	229	ctt cca ttt atc ttt cta gg	aca gca gat gaa ata tta cc	50°C	57°C	59°C	60°C		
BRCA1EX16	450	aat tct taa cag aga cca gaa c	aaa act ctt tcc aga atg ttg t	55°C	58°C	59°C			
BRCA1EX17	263	gtg tag aac gtg cag gat tg	tcg cct cat gtg gtt tta	55°C	57°C				
BRCA1EX18	352	ggc tct tta gct tct tag gac	gag acc cat ttt ccc agc atc	55°C	56°C	57°C			
BRCA1EX19	249	ctg tca ttc ttc ctg tgc tc	cat tgt taa gga aag tgg tgc	58°C	56°C	57°C	59°C		

BRCA2	BRCA1EX20	401	ata tga cgt gtc tgc tcc ac	ggg aat cca aat tac aca gc	60°C	58°C	59°C		
	BRCA1EX21	298	aag ctc ttc ctt ttt gaa agt c	gta gag aaa tag aat agc ctc t	55°C	60°C	61°C		
	BRCA1EX22	297	tcc cat tga gag gtc ttg ct	gag aag act tct gag gct ac	55°C	58°C	60°C		
	BRCA1EX23	264	atg atg aag tga cag ttc cag	gac att tta gcc att cat tca ac	55°C	59°C	61°C		
	BRCA1EX24	280	atg aat tga cac taa tct ctg c	gta gcc agg aca gta gaa gga	60°C	61°C	62°C		
	BR2EX2	311	cca gga gat ggg act gaa tta g	ctg tga cgt act ggg ttt tta gc	52°C	55°C	57°C		
	BR2EX3	423	gat ctt taa ctg ttc tgg gtc aca	ccc agc atg aca caa tta atg a	55°C	55°C	56°C	59°C	
	BR2EX4	249	aga atg caa att tat aat cca gag ta	aat cag att cat ctt tat aga aca aa	50°C	55°C	57°C		
	BR2EX5/6	453	tgt gtt ggc att tta aac atc a	cag ggc aaa ggt ata acg ct	52°C	53°C	54°C		
	BR2EX7	214	cct taa tga tca ggg cat ttc	caa cct cat ctg ctc ttt ctt g	55°C	55°C	59°C		
	BR2EX8	406	gcc ata tct tac cac ctt gtg a	agg ttt aga gac ttt ctc aaa ggc	62°C	54°C			
	BR2EX9	262	cag ata act gaa atc acc aaa agt g	aca aca aca aaa aaa cct gta gtt c	55°C	55°C	57°C		
	BR2EX10A	374	tat aaa ata tta atg tgc ttc tgt t	aaa ggg ctt ctg att tgc tac	55°C	53°C	55°C		
	BR2EX10B	490	gca aac gct gat gaa tgt g	gaa atg aag aag cca ctg ga	55°C	54°C	56°C	57°C	
	BR2EX10C	503	agc agc atc ttg aat ctc at	ggg acc tga atc agc att tg	55°C	54°C	55°C	56°C	57°C
	BR2EX11A	446	aag cag tct tcc tgc ctc ag	gca gcc aag acc tct tct ttt	55°C	55°C	55°C		
	BR2EX11B	405	ccc cag aag ctg att ctc tgt	ttt cag gtg gca aca gct c	55°C	55°C	56°C	57°C	
	BR2EX11C	422	tcc cat gga aaa gaa tca ag	cct ctg caa gaa cat aaa cca	52°C	53°C	55°C		
	BR2EX11D	432	cga acc cat ttt caa gaa ct	ggc ttg ctc agt ttc ttt tg	52°C	55°C	56°C		
	BR2EX11E	500	gga aat caa gct ctc tga aca	att gct tgc tgc tgt cta cc	58°C	54°C	55°C	56°C	57°C
	BR2EX11F	492	aag tgc ctg aaa acc aga tg	caa caa aag tgc cag tag tca	55°C	55°C	57°C	57°C	
	BR2EX11G	532	gtc atg att ctg tgg ttt ca	gac tct ttg gcg aca cta at	55°C	53°C	54°C	55°C	
	BR2EX11H	497	tgc tac taa aac gga gca aa	ggg ctt tac agg cct ctc tg	55°C	54°C	57°C	57°C	
	BR2EX11I	498	gga atc ttt gga caa agt ga	ggg tga cca tca aat att cc	52°C	55°C	55°C	57°C	
	BR2EX11J	492	tca gtc ccc tta ttc agt ca	tgc agg tgt aag agc tag t	55°C	54°C	55°C		
	BR2EX11K	479	ctt gga ttc tgg tat tga gc	cac tct gaa tgt cag caa aa	52°C	55°C			
	BR2EX11L	507	aac gaa aat tat ggc agg ttg tta c	gct ttc cac ttg ctg tac taa atc c	65°C	55°C	56°C		
	BR2EX11M	500	att cag acc agc tca caa ga	agg tga agc ctg ttc ttt tc	55°C	55°C	56°C		
	BR2EX11N	480	tgt tga agg tgg ttc ttc ag	act tta aaa ata gtg att ggc aac	55°C	55°C	56°C		
	BRCA12	391	agt ggt gtt tta aag tgg tca aaa	gga tcc acc tga ggt cag aat a	60°C	53°C	54°C		
	BRCA13	310	gca tcc gtt aca ttc act gaa a	acg gga agt gtt aac ttc tta acg	58°C	53°C	54°C	56°C	
	BRCA14	633	acc atg tag caa atg agg gtc t	ggg ctt taa aat tac cac cac c	58°C	55°C	56°C		
BRCA15	314	ggc cag ggg ttg tgc ttt tt	agg ata cta gtt aat gaa ata	50°C	53°C	56°C	60°C		
BRCA16	395	ttt ggt aaa ttc agt ttt ggt ttg	agc caa ctt ttt agt tgc aga g	52°C	55°C	56°C	57°C		

BRCA17	306	cag aga ata gtt gta gtt gtt gaa	aga aac ctt aac cca tac tgc	55°C	55°C	57°C		
BRCA18A	457	gat cca cta ttt ggg gat tgc	gat cta act ggg cct taa cag c	55°C	55°C	56°C		
BRCA18B	384	gca gat acc caa aaa gtg gc	tct gga cct ccc aaa aac tg	55°C	54°C	55°C	58°C	59°C
BRCA19	389	ctt att tac tgt ctt act aat ctt cct	gac cga aac tcc atc tca aac	55°C	52°C	54°C	56°C	58°C
BRCA20	451	ggg gat cca cta atc tca gcc tc	gtc cct tgt tgc tat tct ttg tct	60°C	53°C	54°C	56°C	58°C
BRCA21	304	ggg tgt ttt atg ctt ggt tct	cat ttc aac ata ttc ctt cct g	50°C	54°C	57°C	59°C	
BRCA22	455	aac cac acc ctt aag atg agc	ggg cat tag tag tgg att ttg c	60°C	53°C	54°C	56°C	57°C
BRCA23	290	act tct tcc att gca tct ttc tca	aaa aca aaa caa aaa ttc aac ata	52°C	56°C			
BRCA24	365	gca gcg aca aaa aaa act ca	att tgc caa ctg tga gct cc	55°C	55°C	57°C	58°C	
BRCA25	426	gct ttc gcc aaa ttc agc ta	tac caa aat gtg tgg tga tgc	52°C	53°C	56°C	56°C	58°C
BRCA26	378	gtc cca aac ttt tca ttt ctg c	gga gcc aça taa caa cca ca	55°C	53°C	54°C	56°C	58°C
BRCA27A	495	ctg tgt gta ata ttt gcg tgc t	gca agt tct tcg tca gct att g	60°C	54°C	55°C	57°C	58°C
BRCA27B	432	acc cat aaa gaa aaa aga ac	ctc att tgt caa cat aag ta	52°C	53°C	54°C	56°C	58°C

Nota: As temperaturas do DHPLC referem-se às temperaturas de corrida.

12.2.3 Amplicons *BRC1* (baseado no Gen Bank Entry U14680)

AMPLICON 1: EXON 2

gtcttttggtttgtattattctaaaacctccaatctaaatttactttattttaaaatgataaaatgaagttgcatttataaacctttaaaagatatatatatgttttc
taatgtgtaag**TTCATTGGAACAGAAAGAAATGGATTATCTGCTCTTCGCGTTGAAGAAGTACA**
AAATGTCATTAATGCTATGCAGAAAATCTTAGAGTGTCCCATCTGgtaagtcagcacaagagtgattaatt
gggattcctatgattatctctatgcaaatgaacagaattgacctacatactagggaagaaaagacatgtctagtaagattaggctattgtaattgctgattccta
actgaagaactttaaaatatagaaatgattcctgttctccatccactctgcctct

AMPLICON 2: EXON 3

tctgacacagcagacatttaataaatgaaacgaactgaggcctatgttgactcagtcataacagctcaaagttgaaactattcactaagaatagctttat
aaataaattattgagcctcatttttttctccccctaccctgtag**TCTGGAGTTGATCAAGGAACCTGTCTCCACAA**
AGTGTGACCACATATTTGCAAgtaagttgaaatgttatgtgctccatttagctttgtttgtcctcataaccaggaaaccta
actttatagaagctttactttctcaataaagtgagaacgaaaaatccaa

AMPLICON 3: EXON 5

ctctaaggcagttgtagattatctttcatggctatttgcctttgagattctttctcaaaaaggaagtaaattaaattgttctttctttataattatag**ATT**
TTGCATGCTGAAACTTCTCAACCAGAAGAAAGGGCCTTCACAGTGTCTTTATGTAAGAAT
GATATAACCAAAAGgtatataattgtaaatgatgctaggttgaagcaaccacagtaggaaaagtagaatttttaataacatagcttccat
aaaaccattcatc

AMPLICON 4: EXON 6

cttattttagtgiccttaaaaggttataatcactgctgagtggtttctcaacaatttaatttcag**GAGCCTACAAGAAAGTACGAGAT**
TTAGTCAACTTGTGGAAGAGCTATTGAAAATCATTGTGCTTTTCAGCTTGACACAGGTTT
GGAGTgtaagttgaaatccaagaatgcaactcaagtgctgctcatgaaa

AMPLICON 5: EXON 7

cacaacaaagagcatacataggggttctctgttctttgattataattcatacattttctctaactgcaacataatgtttccctgtattttacag**ATGCAA**
ACAGCTATAATTTGCAAAAAAGGAAAATAACTCTCCTGAACATCTAAAAGATGAAGTTTC
TATCATCAAAGTATGGGCTACAGAAACCGTGCCAAAAGActtctacagagtgaaaccca

AMPLICON 6: EXON 8

atttttccaggcatatacatgttagctgactgatgatggcaatttatttgcctatggtgcaagtttcttctcaggaggaaaagcacagaactggccaataatg
ctgactgttctttaccatactgttag**CAGGAAACCAGTCTCAGTGTCCAACCTCTTAACCTTGGAAGTGTGA**
GAACTCTGAGGACAAAGCAGCGGATACAACCTCAAAAGACGTCTGTCTACATTGAATTGG
gtaagggtctcaggttttaagtatttaataataattgctggatccttatcttagtttgcacaaaatctgtgcatattgtattgtgtaggcagctttgggaag
tgaattttatgagccctatggtgattataaaaatgtaaaagacgcagttcc

AMPLICON 7: EXON 9

ccacagtagatgctcagtaaaatttctagttgaatatctgttttcaacaagtacatttttaacccttttaattagaaaactttattgattttttgggggaaat
tttttag**GATCTGATTCTTCTGAAGATACCGTTAATAAGGCAACTTATTGCAG**gtgagtcagaagaaccttt
gtctatgaagctggtattttccta

AMPLICON 8: EXON 10

tgtcagctttctgaatcgaagagctaaaatgttgatcttggtcatttgacagttctgcatacatgtaactagtttcttattaggactgtctttccctatag**T**
GTGGGAGATCAAGAATTGTTACAAATCACCCCTCAAGGAACCAGGGATGAAATCAGTTTG
GATTCTGCAAAAAAGGgtaatggcaagtttccaacttaacaggcactgaaaagagagtggttagatac

AMPLICON 9: EXON 11A

tagccagttggtgatttcaacctccaaggtgatgaagtagtatttttaatagacaattcagttttgagtacctgttattttgtatatttcag**CTGCTTGT**
GAATTTTCTGAGACGGATGTAACAAATACTGAACATCATCAACCCAGTAATAATGATTTGA
ACACCACTGAGAAGCGTGCAGCTGAGAGGCATCCAGAAAAGTATCAGGGTAGTTCTGTTT
CAAACCTGCAATGTGGAGCCATGTGGCACAATACTCATGCCAGCTCATTACAGCATGAGAAC
AGCAGTTTATTACTCACTAAAGACAGAATGAATGTAGAAAAGGCTGAATTCTGTAATAAAA
GCAACAGCCTGGCTTAGCAAGGAGCCAACATAACAGATGGG

AMPLICON 10: EXON 11B

CCATGTGGCACAAATACTCAT TGCCAGCTCATTACAGCATGAGAACAGCAGTTTATTACTCACT
AAAGACAGAATGAATGTAGAAAAGGCTGAATTCTGTAATAAAAAGCAAACAGCCTGGCTTA
GCAAGGAGCCAACATAACAGATGGGCTGGAAGTAAGGAAACATGTAATGATAGGCGGACTC
CCAGCACAGAAAAAAGGTAGATCTGAATGCTGATCCCCTGTGTGAGAGAAAAGAATGGA
ATAAGCAGAACTGCCATGCTCAGAGAATCCTAGAGATACTGAAGATGTTCCCTTGGATAACA
CTAAATAGCAGCATTGAGAAAGTTAATGAGTGGTTTTCCAGAAGTGATGAACTGTTAGGTT
CTGATGACTCACATGATGGGGAGTCTGAATCA

AMPLICON 11: EXON 11C

GAACTGCCATGCTCAGAGA ATCCTAGAGATACTGAAGATGTTCCCTTGGATAACACTAAATAG
CAGCATTGAGAAAGTTAATGAGTGGTTTTCCAGAAGTGATGAACTGTTAGGTTCTGATGAC
TCACATGATGGGGAGTCTGAATCAAATGCCAAAGTAGCTGATGTATTGGACGTTCTAAATGA
GGTAGATGAATATTCTGGTTCTTCAGAGAAAATAGACTTACTGGCCAGTGATCCTCATGAG
GCTTTAATATGTAAGAGTGAAAGAGTTCCTCCAAATCAGTAGAGAGTAATATTGAAGACA
AAATATTTGGGAAAACCTATCGGAAGAAGGCAAGCCTCCCCAACTTAAGCCATGTAAC TGAA
AATCTAATTATAGGAGCATTGTTACTGAGCCACAGATAATACAAGAGCGTCCCCTCACAAAT
AAAT

AMPLICON 12: EXON 11D

TCCCCAACTTAAGCCATGTA ACTGAAAATCTAATTATAGGAGCATTGTTACTGAGCCACAGA
TAATACAAGAGCGTCCCCTCACAAATAAATTAAGCGTAAAAGGAGACCTACATCAGGCCTT
CATCCTGAGGATTTTATCAAGAAAGCAGATTTGGCAGTTCAAAAAGACTCCTGAAATGATAA
ATCAGGGAAC TAACCAACGGAGCAGAATGGTCAAGTGATGAATATTACTAATAGTGGTC
ATGAGAATAAAAACAAAAGGTGATTCTATTGAGAATGAGAAAAATCCTAACCCAATAGAATC
ACTCGAAAAAGAATCTGCTTTCAAACGAAAGCTGAACCTATAAGCAGCAGTATAAGCAATA
TGGAACTCGAATTAATATCCACAATTCAAAGCACCTAAAAAGAATAGGCTGAGGAGGAAG
TCTTCT

AMPLICON 13: EXON 11E

TTCAAAACGAAAGCTGAAC CTATAAGCAGCAGTATAAGCAATATGGAACCTCGAATTAATATC
CACAAATCAAAGCACCTAAAAAGAATAGGCTGAGGAGGAAGTCTTACCAGGCATATTCA
TGCGCTTGAAC TAGTAGTCAGTAGAAATCTAAGCCCACCTAATTGTAAGTGAATGCAAAT
GATAGTTGTTCTAGCAGTGAAGAGATAAAGAAAAAAGTACAACCAAATGCCAGTCAGG
CACAGCAGAAACCTACAACCTCATGGAAGGTAAAGAACCTGCAACTGGAGCCAAGAAGAGTA
ACAAGCCAAATGAACAGACAAGTAAAGACATGACAGCGATACTTTCCAGAGCTGAAGT
TAACAAATGCACCTGGTTCTTTACTAAGTGTTCAAATACCAGTGAACCTAAAGAATTTGTC
AATCCTAGCCTTCAA

AMPLICON 14: EXON 11F

GGTAAAGAACCTGCAACT GGAGCCAAGAAGAGTAACAAGCCAAATGAACAGACAAGTAAAAG
ACATGACAGCGATACTTTCCAGAGCTGAAGTTAACAAATGCACCTGGTTCTTTTACTAAG
TGTTCAAATACCAGTGAACCTTAAAGAATTTGTCAATCCTAGCCTTCCAAGAGAAGAAAAAGA
AGAGAAACTAGAAACAGTTAAAGTGTCTAATAATGCTGAAGACCCCAAAGATCTCATGTTA
AGTGGAGAAAAGGGTTTTGCAACTGAAAGATCTGTAGAGAGTAGCAGTATTTCAATTGGTACC
TGGTACTGATTATGGCACTCAGGAAAGTATCTCGTTACTGGAAGTTAGCACTCTAGGGAA
GGCAAAAACAGAACCAAATAAATGTGTGAGTCAGTGTGCAGCATTGA

AMPLICON 15: EXON 11G

GAAAGGGTTTTGCAACT GAAAGATCTGTAGAGAGTAGCAGTATTTTCATTGGTACCTGGTACT
GATTATGGCACTCAGGAAAGTATCTCGTTACTGGAAGTTAGCACTCTAGGGAAGGCAAAA
ACAGAACCAAATAAATGTGTGAGTCAGTGTGCAGCATTGAAAACCCCAAGGGACTAATTCA
TGTTTGTCCAAAGATAATAGAAATGACACAGAAGGCTTTAAGTATCCATTGGGACATGA
AGTTAACCACAGTCGGGAAACAAGCATAGAAATGGAAGAAAAGTGAACCTTGATGCTCAGTATT
TGCAGAATACATTC AAGGTTCAAAGCGCCAGTCATTTGCTCCGTTTTCAAATCCAGGAAAT
GCAGAAGAGGAA

AMPLICON 16: EXON 11H

TGAACTTGATGCTCAGTATTTGCAGAATACATTCAAGGTTTCAAAGCGCCAGTCATTTGCTCCG
TTTTCAAATCCAGGAAATGCAGAAGAGGAATGTGCAACATTCTCTGCCACTCTGGGTCCTT
AAAGAAACAAAGTCCAAAAGTCACTTTTGAATGTGAACAAAAGGAAGAAAATCAAGGAAA
GAATGAGTCTAATATCAAGCCTGTACAGACAGTTAATATCACTGCAGGCTTTCCTGTGGTT
GGTCAGAAAGATAAGCCAGTTGATAATGCCAAATGTAGTATCAAAGGAGGCTCTAGGTTTTG
TCTATCATCTCAGTTCAGAGGCAACGAAACTGGACT

AMPLICON 17: EXON 11I

TAAGCCAGTTGATAATGCCAAATGTAGTATCAAAGGAGGCTCTAGGTTTTGTCTATCATCTCA
GTTTCAGAGGCAACGAAACTGGACTCATTACTCCAAATAAACATGGACTTTTACAAAACCCAT
ATCGTATACCACCTTTTTCCCATCAAGTCATTTGTTAAAATAAATGTAAAGAAAAATCT
GCTAGAGGAAAACCTTTGAGGAACATTCAATGTACCTGAAAGAGAAAATGGGAAATGAGAA
CATTCCAAGTACAGTGAGCACAATTAGCCGTAATAACATTAGAGAAAATGTTTTTAAAGAA
GCCAGCTCAAGCAATATTAATGAAGTAGGTTCCAGTACTAATGAAGTGGGCTCCAGTATTAA
TGAAATAGGTTCCAGTGATGAAAACATTCAAGCAGAACTAGGTAGAAACAGAGGGCCAAAA

AMPLICON 18: EXON 11J

ACTAATGAAGTGGGCTCCAGTATTAATGAAATAGGTTCCAGTGATGAAAACATTCAAGCAGAA
CTAGGTAGAAACAGAGGGCCAAAATTGAATGCTATGCTTAGATTAGGGGTTTTGCAACCTGA
GGTCTATAAACAAAGTCTTCCTGGAAGTAATTGTAAGCATCCTGAAATAAAAAAGCAAGAAT
ATGAAGAAGTAGTTCAGACTGTTAATACAGATTTCTCTCCATATCTGATTTTCAGATAACTT
AGAACAGCCTATGGGAAGTAGTCATGCATCTCAGGTTTGTTCAGAGACCTGATGACCTG

AMPLICON 19: EXON 11K

TTCTGGAAGTAATTGTAAGCATCCTGAAATAAAAAAGCAAGAATATGAAGAAGTAGTTCAGA
CTGTTAATACAGATTTCTCTCCATATCTGATTTTCAGATAACTTAGAACAGCCTATGGGAAG
TAGTCATGCATCTCAGGTTTGTTCAGAGACCTGATGACCTGTTAGATGATGGTGAATAA
AGGAAGATACTAGTTTTGCTGAAAATGACATTAAGGAAAGTTCTGCTGTTTTTAGCAAAAGC
GTCCAGAAAGGAGAGCTTAGCAGGAGTCCAGCCCTTACCCATACACATTTGGCTCAGGGT
TA

AMPLICON 20: EXON 11L

GACATTAAGGAAAGTTCTGCTGTTTTTAGCAAAAGCGTCCAGAAAGGAGAGCTTAGCAGGAGT
CCTAGCCCTTTCACCCATACACATTTGGCTCAGGGTTACCGAAGAGGGGGCCAAAGAAATTAGA
GTCCTCAGAAGAGAACTTATCTAGTGAGGATGAAGAGCTTCCCTGCTTCCAACACTTGTTA
TTTTGGTAAAGTAAACAATATACCTTCTCAGTCTACTAGGCATAGCACCGTTGCTACCGAGTG
TCTGTCTAAGAACACAGAGGAGAATTTATTATCATTGAAGAATAGCTTAAATGACTGCAGT
AACCAGGTAATATTGGCAAA

AMPLICON 21: EXON 11M

ACCGTTGCTACCGAGTGTCTGCTAAGAACACAGAGGAGAATTTATTATCATTGAAGAATAGC
TTAAATGACTGCAGTAACAGGTAATATTGGCAAAAGGCATCTCAGGAACATCACCTTAGTGA
GAAAACAAAATGTTCTGCTAGCTTGTCTTTCACAGTGCAGTGAATTGGAAGACTTGACT
GCAAAATACAAACACCCAGGATCCTTCTTGATTGGTTCTTCCAAACAAATGAGGCATCAGT
CTGAAAGCCAGGGAGTTGGTCTGAGTGACAAGGAATGGTTTCAGATGATGAAGAAAGAG
GAACGGGCTTGGAAGAAAATAATCAAGAAGAGCAAAGCATGGATTCAAACCTTAGgtattggaacc
aggttttgtgtttccccagtctattatagaagtgagctaaatgjttagcttttggggagcac

AMPLICON 22: EXON 12

gtcctgccaatgagaagaaaagacacagcaagtgacgctttatagtctgttttacatctgaacctgttttatttaagGTGAAGCAGCA
TCTGGGTGTGAGAGTGAACAAGCGTCTCTGAAGACTGCTCAGGGCTATCCTCTCAGAGT
GACATTTTAACTACTCAGgtaaaaagcgtgtgtgtgtgcatcgctgtgtgtgtgtcctttgcattcagtagtatgtatccacatttta
ggtttgctgaca

AMPLICON 23: EXON 13

aatggaagctctcaagtatttcattttcttggtgccattatcgTTTTgaagcAGAGGGATACCATGCAACATAACCTGATA
AAGCTCCAGCAGGAAATGGCTGAACTAGAAGCTGTGTTAGAACAGCATGGGAGCCAGCCT
TCTAACAGCTACCCTTCCATCATAAGTGACTCTTCTGCCCTTGAGGACCTGCGAAATCCAG
AACAAAGCACATCAGAAAAAGGtggtattgttgccaacactgatatcttaagcaaaattcttctccctttatctccttctgaagagf
aaggacctagctccaacat

AMPLICON 24: EXON 14

ctaacctgaattatcaatcagaacaagcagtaagtagattgtttctcattccatttaaagcAGTATTAACCTCACAGAAAAGTA
GTGAATACCCTATAAGCCAGAATCCAGAAGGCCTTTCTGCTGACAAGTTTGAGGTGTCTG
CAGATAGTTCTACCAGTAAAAATAAAGAACCAGGAGTGGAAGGtaagaacatcaatgtaaagatgctgtg
gatctgcacatctttattatgaactctgattgtaattttttaccatactttctccagtttttgcatacaggeattatacac

AMPLICON 25: EXON 15

cttcatttatcttaggTCATCCCCTTCTAAATGCCCATCATTAGATGATAGGTGGTACATGCACAG
TTGCTCTGGGAGTCTTCAAGAACTACCCATCTCAAGAGGAGCTCATTAAAGGTTGTT
GATGTGGAGGAGCAACAGCTGGAAGAGTCTGGCCACACGATTTGACGGAAACATCTTAC
TTGCCAAGGCAAGATCTAGGtaatattcatctgctgt

AMPLICON 26: EXON 16

aatcttaacagagaccagaactttgtaattcaacattcatcggtgtgtaataaacttctccattccttcagaGGGAACCCCTTACCTGGA
ATCTGGAATCAGCCTCTTCTCTGATGACCCTGAATCTGATCCTTCTGAAGACAGAGCCCCA
GAGTCAGCTCGTGTGGCAACATAACCATCTTCAACCTCTGCATTGAAAGTTCCCAATTGA
AAGTTGCAGAATCTGCCAGAGTCCAGCTGCTGCTCATACTACTGATACTGCTGGGTATA
ATGCAATGGAAGAAAGTGTGAGCAGGGAGAAGCCAGAATTGACAGCTTCAACAGAAAGG
GTCAACAAAAGAATGTCCATGGTGGTGTCTGGCCTGACCCCAAGAATAATTTGtgagtgtatccatg
gatctccctaatgactaagacttaacaacattctggaagagtttt

AMPLICON 27: EXON 17

ggtagaacgtgcaggattgctacataggtaaacatagccatggtggaataactagattctgagctgtgtgctagaggttaactcatgataatggaatattgatt
taattcagaTGCTCGTGTACAAGTTTGCCAGAAAACACCACATCACTTAACTAATCTAATTACT
GAAGAGACTACTCATGTTGTTATGAAAACAGGtataccaagaacctttacagaataacctgcatctgctgcataaaaccaca
tgaggcga

AMPLICON 28: EXON 18

ggctcttagctcttaggacagcaactctgattttgtttcaacttaactccttgagtgttttcattctgcagaTGCTGAGTTTGTGTGTGAA
CGGACACTGAAATATTTCTAGGAATTGCGGGAGGAAAATGGGTAGTTAGCTATTTCTGtaa
gtataactatttctccctctcccttcaacacctcagaattgcattttacactaacgttttaacacctaaggttttgctgatgctgagttacaaaaggt
ctttaattgtaactaaacttttatcttaataactctttggtcagataagctggtgatctggtgggaaaatgggtctc

AMPLICON 29: EXON 19

ctgtcattctctgtgctcttttgtgaatcgctgacctctatctccgtgaaaagacagcttctctgctgatgtaacctgtctttctatgatctcttaggGGT
GACCCAGTCTATTAAGAAAAGAAAATGCTGAATGAGGtaagtacttgatgttacaactaaccagagatattcattca
gctatagttaaaaatgatttgcctcctccatcaatgcaccactttccttaacaatg

AMPLICON 30: EXON 20

atatgacgtgtctgctccacttccattgaaggaagcttctcttcttctctgatgggtgtgtttggtttcttcagcATGATTTTGAAGTCAGA
GGAGATGTGGTCAATGGAAGAAACCACCAAGGTCCAAGCGAGCAAGAGAATCCCAGGA
CAGAAAGGtaagctccctccctcaagttgacaaaaatctcaccaccactctgtattccactccctttgcagagatggccgcttctttgtaagac
ttattacatacacagctgtagatactttcacacaggtctttttcactcttccatcccaaccacataataagattgtctctactttatgaataaactaaga
gatttagagaggctgtgtaatttgattccc

AMPLICON 31: EXON 21

aagctcttcttttgaagctcgtttttgaaataaagccaatattctttataactagattttccttctctccattccccgtccctctctctctctcttccagaTC
TTCAGGGGGCTAGAAATCTGTTGCTATGGGCCCTTACCAACATGCCACAGGtaagagcctggg
agaacccagagttccagcaccagcctttgtctacatagtgagattataagcaagatccacgatgggggttctcagattgctgaaatgttctagaggcta
ttctattctctac

AMPLICON 32: EXON 22

tccattgagaggctctgctataagccttcacccggagagtgtagggtagagggcctgggtaagatgcagattactgcagtgattttacatctaataatgtccattt
aga**TCAACTGGAATGGATGGTACAGCTGTGTGGTGCTTCTGTGGTGAAGGAGCTTTCATCA**
TTCACCCTTGGCACAGtaagtattgggtgccctgtcagagagggaggacacaatattctctcctgtgagcaagactggcacctgtcagtcct
atggatgccctacttagcctcagaagtcttc

AMPLICON 33: EXON 23

atgatgaagtacagttccagtagtcctactttgacactttgaatgctcttctctctggggatccagg**GTGTCCACCCAATTGTGGTTG**
TGCAGCCAGATGCCTGGACAGAGGACAATGGCTTCCATGGtaagggtcctgcatgtacctgtgctatatggggtc
ctttgcatggggttggttatcactcattacctgggtgcttgagtagcacagttcttggcacattttaaatattgtgaatgaatggctaaaatgic

AMPLICON 34: EXON 24

atgaattgacactaatctctgcttgtgtctctgtctccagc**AATTGGGCAGATGTGTGAGGCACCTGTGGTGACCCGA**
GAGTGGGTGTTGGACAGTGTAGCACTCTACCAGTGCCAGGAGCTGGACACCTACCTGATA
CCCCAGATCCCCCACAGCCACTACTGACTGCAGCCAGCCACAGGTACAGAGCCACAGGAC
CCCAAGAATGAGCTTACAAAGTGGCCTTCCAGGCCCTGGGAGCTCCTCTCACTCTTCAGT
CCTTCTACTGTCCTGGCTAC

12.2.4 Amplicons BRCA2 (baseado no Gen Bank (Entry NM 000059))

AMPLICOM 1 EXON 2:

ccagagatgggactgaattagaattcaacaaatftccagcgcttctgagtttacctcagtcacataataaggaatgcatccctgtgtaagtgcattttggtctt
ctgttttgcagACTTATTTACCAAGCATTGGAGGAATATCGTAGGTA AAAATGCCTATTGGATCCA
AAGAGAGGCCAACATTTTTTTGAAATTTTTAAGACACGCTGCAACAAAGCAGgtattgacaaatttatat
aactttataaattacaccgagaagtgttttctaaaaatgcttgctaaaaacccagtacgtcacag

AMPLICOM 2 EXON 3:

gatctttaactgttctgggicacaaattgtctgtcactgggttaaaactaagggtgggatttttttaaatagATTTAGGACCAATAAGTCTTA
ATTGGTTTGAAGAACTTTCTTCAGAAGCTCCACCCTATAATTCTGAACCTGCAGAAGAATC
TGAACATAAAAAACAACAATTACGAACCAAACCTATTTAAACTCCACAAAGGAAACCATCT
TATAATCAGCTGGCTTCAACTCCAATAATATTCAAAGAGCAAGGGCTGACTCTGCCGCTGT
ACCAATCTCCTGTAAAAGAATTAGATAAATTCAAATTAGACTTAGgtaagtaatgcaatatggtagactggg
gaactacaaactaggaatttaggcaaacctgtgttaaaacttagctcattcattaattgtcatgctggg

AMPLICOM 3 EXON 4:

agaatgcaaatataatccagagtataacattctcactgaattattgtactgtttcagGAAGGAATGTTCCCAATAGTAGACATA
AAAGTCTTCGCACAGTGAAAACATAAATGGATCAAGCAGATGATGTTTCCTGTCCACTTCT
AAATTCTTGTCTTAGTGAAAGgtatgatgaagctattatataaaatattaaatgaacattttctacatatattgttctataaagatgaat
ctgatt

AMPLICOM 4 EXONS 5/6:

Tgtgtggcattttaaacatcactgtgatattttaatgcttcatgagagatttacttttaaatgtaataaaaatctaaaagtagattccaacaatttatgaa
tgagaatctttttaaaaataagataaactagttttgccagtttttaaaataacctaagggttgcattgtttttatttagTCCTGTTGTTCTACAA
TGTACACATGTAACACCACAAAGAGATAAGTCAGgtatgattaaaaaatgctttttattctagaactagaaatgttaa
taaaaataaaacttaacaattttccccctttttacccccagTGGTATGTGGGAGTTTGTTCATACACCAAAGTTTGTG
AAGgtaaatattctactggtttttttatgacttagtaattgagaatttgacaatagcgttatacctttgccctg

AMPLICOM 5 EXON 7:

cttaatgatcagggcattttataaaaaataaactattttcttctcccagGGTCGTCAGACACCAAACATATTTCTGAAA
GTCTAGGAGCTGAGGTGGATCCTGATATGTCTTGGTCAAGTTCTTTAGCTACACCACCA
CCCTTAGTTCTACTGTGCTCATAGgtaataatagcaaatgtgtatttacaagaaagagcagatgaggtg

AMPLICOM 6 EXON 8:

gccatatctaccacctgtgagtagtactaaggaagtaagtagtttattcactgtgttgattgaccttctaataactatacttaagtactgaaatcaattctttgt
ttcaaatgtgcatgataatcaaatagtagatgtgctttttgatgctgacaaaaataagttttgactctagtgataatatacaatacacataaattttatcttacagT
CAGAAATGAAGAAGCATCTGAAACTGTATTTCTCATGATACTACTGCTgtaagtaaatatgacattgat
tagactgtgaaattgctaacaattttggaatgcctgttaaattatttacttacttttaatttcttaactctgtaattatctaagcctttgagaagctctaaacct

AMPLICOM 7 EXON 9:

cagataactgaaatcaccaaaagtgaaccatggataagggggactactactatgtgactgagagttttataactagtgattttaaactataattttgcag
AATGTGAAAAGCTATTTTTCCAATCATGATGAAAGTCTGAAGAAAAATGATAGATTTATCG
CTTCTGTGACAGACAGTGAAAACACAAATCAAAGAGAAGCTGCAAGTCATGgtaagctcctgttttag
ttgaactacagggtttttgtgtgt

AMPLICOM 8 EXON 10 A:

tataaaatattaatgtgcttctgtttatactttaacagGATTTGGAAAAACATCAGGGAATTCATTTAAAGTAAATA
GCTGCAAAGACCACATTGGAAAGTCAATGCCAAATGTCCTAGAAGATGAAGTATATGAAA
CAGTTGTAGATACCTCTGAAGAAGATAGTTTTTCATTATGTTTTTCTAAATGTAGAACAAA
AAATCTACAAAAGTAAGAAGTAGCAAGACTAGGAAAAAATTTTCCATGAAGCAAACGCT
GATGAATGTGAAAAATCTAAAAACCAAGTGAAAGAAAAATACTCATTGTATCTGAAGTG
GAACCAAATGATACTGATCCATTAGATTCAAATGTAGCAAATCAGAAGCCCTT

AMPLICOM 9 EXON 10 B:

GCAAACGCTGATGAATGTGAAAAATCTAAAAACCAAGTGAAAGAAAAATACTCATTGTATC
TGAAGTGAACCAATGATACTGATCCATTAGATTCAAATGTAGCAAATCAGAAGCCCTT
TGAGAGTGAAGTGACAAAATCTCCAAGGAAGTTGTACCGTCTTTGGCCTGTGAATGGTC
TCAACTAACCCCTTTCAGGTCTAAATGGAGCCCAGATGGAGAAAATACCCCTATTGCATAT
TTCTTCATGTGACCAAAATATTTTCAGAAAAAGACCTATTAGACACAGAGAACAAAAGAAA
GAAAGATTTTCTTACTTCAGAGAATTCTTTGCCACGTATTTCTAGCCTACCAAAATCAGAG
AAGCCATTAATGAGGAAACAGTGGTAAATAAGAGAGATGAAGAGCAGCATCTTGAATCT
CATACAGACTGCATTCTTGCAGTAAAGCAGGCAATATCTGGAACTTCTCCAGTGGCTTCTTC
ATTTC

AMPLICOM 10 EXON 10 C:

AGCAGCATCTTGAATCTCATACAGACTGCATTCTTGCAGTAAAGCAGGCAATATCTGGA
ACTTCTCCAGTGGCTTCTTCATTTTCAGGGTATCAAAAAGTCTATATTCAGAATAAGAGAATCAC
CTAAAGAGACTTTCAATGCAAGTTTTTCAGGTCATATGACTGTATCCAACTTTAAAAAAGA
AACTGAAGCCTCTGAAAGTGGACTGGAAATACATACTGTTTGCTCACAGAAGGAGGACTCC
TTATGTCCAAATTTAATTGATAATGGAAGCTGGCCAGCCACCACCACAGAATTCTGTAGC
CTTTGAAGAATGCAGGTTAATATCCACTTTGAAAAAGAAAACAAATAAGTTTATTTATGC
TATACATGATGAAACATCTTATAAAGGAAAAAATAACCGAAAGACCAAAAATCAGA
ACTAATTAAGTGTTCAGCCCAGTTTGAAGCAAATGCTTTTGAAGCACCACTTACATTTGCAAAAT
GCTGATTCAGgtacc

AMPLICOM 11 EXON 11 A:

aagcagctcttcctgccicagcctcccaaaagtgtgagattacagcatgagccactgtgcccacactaccttttaacttagt
gaaaaatatttagtgaatgt
gattgatggactttaattttgtcactttgtttttatgtagGTTTATTGCATTCTTCTGTGAAAAGAAGCTGTTACAG
AATGATTCTGAAGAACCAACTTTGTCCTTAAGCTCTTTTGGGACAATTCTGAGGAAAT
GTTCTAGAAATGAAACATGTTCTAATAATACAGTAATCTCTCAGGATCTTGATTATAAAGA
AGCAAAATGTAATAAGGAAAAACTACAGTTATTTATTACCCAGAAAGCTGATTCTCTGTCAT
GCCTGCAGGAAGGACAGTGTGRAAATGATCCAAAAGCAAAAAGTTTCAGATATAAAAAG
AAGAGGTCTTGGCTGC

AMPLICOM 12 EXON 11 B:

CCCCAGAAGCTGATTCTCTGTCATGCCTGCAGGAAGGACAGTGTGRAAATGATCCAAAAG
CAAAAAGTTTCAGATATAAAAAAGAGGGTCTTGGCTGCAGCATGTCACCCAGTACAACATT
CAAAAGTGAATACAGTGATACTGACTTTCAATCCAGAAAATCTTTTATATGATCATGA
AAATGCCAGCACTCTTATTTTAACTCCTACTTCCAAGGATGTTCTGTCAAACCTAGTCATG
ATTTCTAGAGGCAAAGAATCATAAAAATGTCAGACAAGCTCAAAGGTAACAATTATGAA
TCTGATGTTGAATTAACCAAAAATATTCCCATGGAAAAGAATCAAGATGTATGTGCTTTAAA
TGAAAATTATAAAAACGTTGAGCTGTTGCCACCTGAAA

AMPLICOM 13 EXON 11 C:

TCCCATGGAAAAGAATCAAGATGTATGTGCTTTAAATGAAAATTATAAAAACGTTGAGCTGTT
GCCACCTGAAAATACATGAGAGTAGCATCACCTTCAAGAAAGGTACAATTCAACCAAAAC
ACAAATCTAAGAGTAATCCAAAAAATCAAGAAGAACTACTTCAATTTCAAAAATAACTG
TCAATCCAGACTCTGAAGAACTTTTCTCAGACAATGAGAATAATTTTGTCTTCCAAGTAGC
TAATGAAAGGAATAATCTTGCTTTAGGAAATACTAAGGAACTTCATGAAACAGACTTGAC
TTGTGTAACGAACCCATTTTCAAGAACTCTACCATGGTTTTATATGGAGACACAGGTGATA
ACAAGCAACCCAAGTGTCAATTAAAAAAGATTGGTTATGTTCTTGCAGAGG

AMPLICOM 14 EXON 11 D:

CGAACCCATTTCAAGAACTCTACCATGGTTTTATATGGAGACACAGGTGATAAACAAGCAA
CCCAAGTGTCAATTAAAAAAGATTGGTTTATGTTCTTGCAGAGGAGAACAAAATAGTGTA
AAGCAGCATATAAAAAATGACTCTAGGTCAAGATTTAAATCGGACATCTCCTTGAATATA
GATAAAATACCAGAAAAAATAATGATTACATGAACAAATGGGCAGGACTCTTAGGTCCA
ATTTCAAATCACAGTTTTGGAGGTAGCTTCAGAACAGCTTCAAATAAGGAAATCAAGCTCTC
TGAACATAACATTAAGAAGAGCAAAATGTTCTTCAAAGATATTGAAGAACAATATCCTACT
AGTTTAGCTTGTGTTGAAATTGTAAATACCTTGGCATTAGATAATCAAAAGAAACTGAGCAA
GCC

AMPLICOM 15 EXON 11 E:

GGAAATCAAGCTCTCTGAACATAACATTAAGAAGAGCAAAATGTTCTTCAAAGATATTGAAG
AACAAATATCTACTAGTTTAGCTTGTGTTGAAATTGTAAATACCTTGGCATTAGATAATCA
AAAGAAACTGAGCAAGCCTCAGTCAATTAATACTGTATCTGCACATTTACAGAGTAGTGTAG
TTGTTTCTGATTGTAAAAATAGTCATATAACCCCTCAGATGTTATTTTCCAAGCAGGATTT
TAATTCAAACCATAATTTAACACCTAGCCAAAAGGCAGAAATTACAGAACTTTCTACTATA
TTAGAAGAATCAGGAAGTCAGTTTGAATTTACTCAGTTTAGAAAACCAAGCTACATATTGC
AGAAGAGTACATTTGAAGTGCTGAAAACCAGATGACTATCTTAAAGACCACTTCTGAGGAA
TGCAGAGATGCTGATCTTCATGTCATAATGAATGCCCATCGATTGGTCAGGTAGACAGCA
GCAAGCAAT

AMPLICOM 16 EXON 11 F:

AAGTGCTGAAAACCAGATGACTATCTTAAAGACCACTTCTGAGGAATGCAGAGATGCTGAT
CTTCATGTCATAATGAATGCCCATCGATTGGTCAGGTAGACAGCAGCAAGCAATTTGAAGG
TACAGTTGAAATTAACGGGAAGTTTGTCTGGCCTGTTGAAAAATGACTGTAACAAAAGTGC
TTCTGGTTATTTAACAGATGAAAATGAAGTGGGGTTTAGGGGCTTTTATTCTGCTCATGG
CACAAAACCTGAATGTTTCTACTGAAGCTCTGCAAAAAGCTGTGAAACTGTTTAGTGATATT
GAGAATATTAGTGAGGAACTTCTGCAGAGGTACATCCAATAAGTTTATCTTCAAGTAAA
TGTCATGATTCTGTCGTTTCAATGTTTAAAGATAGAAAATCATAATGATAAAACTGTAAGTGA
AAAAAATAATAAATGCCAACTGATATTACAAAATAATATTGAAATGACTACTGGCACTTTTG
TTG

AMPLICOM 17 EXON 11 G:

GTCATGATTCTGTCGTTTCAATGTTTAAAGATAGAAAATCATAATGATAAAACTGTAAGTGAA
AAAAATAATAAATGCCAACTGATATTACAAAATAATATTGAAATGACTACTGGCACTTTTGT
GAAGAAATTACTGAAAATTACAAGAGAAATACTGAAAATGAAGATAACAAATATACTGCT
GCCAGTAGAAATTCTCATAACTTAGAATTTGATGGCAGTGATTCAAGTAAAAATGATACT
GTTTGTATTCATAAAGATGAAACGGACTTGCTATTTACTGATCAGCACACATATGTCTTA
AATTATCTGGCCAGTTTATGAAGGAGGGAAACACTCAGATTAAGAAGATTTGTCAGATT
TAACTTTTTTGGAAGTTGCGAAAGCTCAAGAAGCATGTCATGGTAATACTTCAAATAAAG
AACAGTTAACTGCTACTAAAACGGAGCAAAATATAAAAGATTTTGAGACTTCTGATACATTT
TTCAGACTGCAAGTGGGAAAAATATTAGTGTCGCCAAAGAGTC

AMPLICOM 18 EXON 11 H:

TGCTACTAAAACGGAGCAAAATATAAAAGATTTTGAGACTTCTGATACATTTTTTCAGACTG
CAAGTGGGAAAAATATTAGTGTCGCCAAAGAGTCATTTAATAAAATTGTAAATTTCTTTGAT
CAGAAACCAGAAGAATTGCATAACTTTTCTTAAATTCTGAATTACATTCTGACATAAGAA
AGAACAAAATGGACATTCTAAGTTATGAGGAAACAGACATAGTTAAACACAAAATACTGA
AAGAAAGTGCCAGTTGGTACTGGAAATCAACTAGTGACCTTCCAGGGACAACCCGAAC
GTGATGAAAAGATCAAAGAACCTACTCTGTTGGGTTTTTCATACAGCTAGCGGGAAAAAAG
TAAAATTGCAAAGGAATCTTTGGACAAAGTGAAAAACCTTTTTGATGAAAAAGAGCAAGGT
ACTAGTGAAATCACCAGTTTTAGCCATCAATGGGCAAAGACCCTAAAGTACAGAGAGGCC
GTAAGACC

AMPLICOM 19 EXON 11 I:

GGAATCTTTGGACAAAGTGAAAAACCTTTTTGATGAAAAAGAGCAAGGTACTAGTGAAATCA
CCAGTTTTAGCCATCAATGGGCAAAGACCCTAAAGTACAGAGAGGCCGTAAAGACCTTGA
ATTAGCATGTGAGACCATTGAGATCACAGCTGCCCAAAGTGTAAGAAATGCAGAATTC
TCTCAATAATGATAAAAACCTTGTTTCTATTGAGACTGTGGTGCCACCTAAGCTCTTAAGT
GATAATTTATGTAGACAAAACCTGAAAATCTCAAAACATCAAAAAGTATCTTTTTGAAAAGTTA
AAGTACATGAAAATGTAGAAAAAGAAACAGCAAAAAGTCTGCAACTTGTTACACAAAATC
AGTCCCCTTATTAGTCAATTGAAAATTCAGCCTTAGCTTTTTACACAAGTTGTAGTAGAAAA
ACTTCTGTGAGTCAACTTCACTTGAAGCAAAAAAATGGCTTAGAGAAGGAATATTG
ATGGTCAACC

AMPLICOM 20 EXON 11 J:

TCAGTCCCCTTATTCAGTCATTGAAAATTCAGCCTTAGCTTTTTACACAAGTTGTAGTAGAAA
AACTTCTGTGAGTCAGACTTCATTACTTGAAGCAAAAAAATGGCTTAGAGAAGGAATATTT
GATGGTCAACCAGAAAGAATAAATACTGCAGATTATGTAGGAAATTATTTGTATGAAAATA
ATTCAAACAGTACTATAGCTGAAAATGACAAAAATCATCTCTCCGAAAAACAAGATACTTA
TTTAAGTAACAGTAGCATGTCTAACAGCTATTCTACCATTCTGATGAGGTATATAATGAT
TCCAGGATACTCTCAAAAAATAACTTGGATTCTGGTATTGAGCCAGTATTGAAGAATGTTGA
AGATCAAAAAACACTAGTTTTTCCAAAGTAATATCCAATGTAAAAGATGCAAATGCATAC
CCACAAACTGTAAATGAAGATATTTGCGTTGAGGAACCTTGTGACTAGCTCTTACCCTGCA

AMPLICOM 21 EXON 11 K:

CTTGGATTCTGGTATTGAGCCAGTATTGAAGAATGTTGAAGATCAAAAAACACTAGTTTTT
CCAAAGTAATATCCAATGTAAAAGATGCAAATGCATACCCACAAACTGTAAATGAAGATA
TTTGCGTTGAGGAACTTGTGACTAGCTCTTACCCTGCAAAAAATAAAAAATGCAGCCATTA
TTGTCCATATCTAATAGTAATAATTTTGAGGTAGGGCCACCTGCATTTAGGATAGCCAGT
GGTAAAATCGTTTGTGTTTACATGAAACAATTAATAAAAGTGAAAAGACATATTTACAGACA
GTTTCAGTAAAGTAATTAAGGAAAAACAAGAGAATAAATCAAAAAATTTGCCAAACGAAAAT
TATGGCAGGTTGTTACGAGGCATTGGATGATTGAGGATATTCTTCATAACTCTTAGATA
ATGATGAATGTAGCACGCATTACATAAGGTTTTTGCTGACATTCAGAGTG

AMPLICOM 22 EXON 11 L:

AACGAAAAATTATGGCAGGTTGTTACGAGGCATTGGATGATTCAGAGGATATTCTTCATAACT
CTCTAGATAATGATGAATGTAGCACGCATTACATAAGGTTTTTGCTGACATTCAGAGTGAA
GAAATTTTACAACATAACCAAAATATGTCTGGATTGGAGAAAGTTTCTAAAATATCACCTT
GTGATGTTAGTTTGAAACTTCAGATATATGTAAATGTAGTATAGGGAAGCTTCATAAGT
CAGTCTCATCTGCAAATACTTGTGGGATTTTTAGCACAGCAAGTGGAATACTGTCCAGG
TATCAGATGCTTCATTACAAAACGCAAGACAAGTGTTTTCTGAAATAGAAGATAGTACCA
AGCAAGTCTTTTCCAAAGTATTGTTTAAAAGTAACGAACATTCAGACCAGCTCACAAGAGAA
GAAAATACTGCTATACGTACTCCAGAACATTAATATCCCAAAAAGGCTTTTCATATAATG
TGGTAAATTCATCTGCTTCTCTGGATTTAGTACAGCAAGTGGAAAGC

AMPLICOM 23 EXON 11 M:

ATTCAGACCAGCTCACAAGAGAAGAAAATACTGCTATACGTACTCCAGAACATTTAATATCC
CAAAAAGGCTTTTCATATAATGTGGTAAATTCATCTGCTTCTCTGGATTTAGTACAGCAAG
TGGAAGCAAGTTTCCATTTTAGAAAGTTCCTTACACAAAGTTAAGGGAGTGTTAGAGGAA
TTTGATTTAATCAGAACTGAGCATAGTCTTCACTATTCACCTACGTCTAGACAAAATGTAT
CAAAAATACTTCTCGTGTGATAAGAGAAAACCCAGAGCACTGTGTAACCTCAGAAATGG
AAAAAACCTGCAGTAAAGAATTTAAATTATCAATAACTTAAATGTTGAAGGTGGTTCTTCA
GAAAATAACTACTCTATTAAAGTTTCTCCATATCTCTCTCAATTTCAACAAGACAAACA
AGTTGGTATTAGGAACCAAGTCTCACTTGTGAGAACATTCATGTTTTGGAAAAAGAACA
GGCTTACCT

AMPLICOM 24 EXON 11 N:

TGTTGAAGGTGGTTCTTCAGAAAATAACTACTCTATTAAGTTTCTCCATATCTCTCTCAATT
TCAACAAGACAAACAACAGTTGGTATTAGGAACCAAGTCTCACTTGTGAGAACATTCA
TGTTTTGGGAAAAAGAACAGGCTTACCTAAAAACGTAAAAATGGAAATTGGTAAACTGAAA
CTTTTTCTGATGTTCTGTGAAAACAAATATAGAAGTTTGTCTACTTACTCCAAAGATTC
AGAAACTACTTTGAAACAGAAGCAGTAGAAATTGCTAAAGCTTTTATGGAAGATGATGA
ACTGACAGATTCTAAACTGCCAAGTCATGCCACACATTCTCTTTTTACATGTCCCAGAAAT
GAGGNAATGGTNTTGTCAAATTCAAGAATTGGAAAAAGAAGAGGAGAGCCCCTTATCTTA
GTGGgtaagtgtcattttaccttctgttgccaatcactttttaaagt

AMPLICOM 25 EXON 12:

Agtggtgttttaagtggtcaaaacagaacaaaatgtaattgacattgaagactgacttactcttcaaacattaggtcactattgttgaagtattttgttaac
atttaaagagtcactttagctttaaataaagtgtctatagacttttgagaataaaactgatattattgaccttaaaacatatatgaaatattcttttagGAG
AACCTCAATCAAAAGAACTTATTAATGAATTTGACAGGATAATAGAAAATCAAGAAA
AATCCTTAAAGGCTTCAAAAAGCACTCCAGATGgttaaattagcttntattntatctgttctccctctataggtnatggta
tataatattctgacctcagGtgatcc

AMPLICOM 26 EXON 13:

gcatccgttacattcactgaaaattgtaaagcctataattgtctcaaatTTTTgtgtatttacagtaacatggatattctcttagattttaactaatatgtaataaaat
aattgtttctagGCACAATAAAAAGATCGAAGATTGTTTATGCATCATGTTTCTTTAGAGCCGATTA
CCTGTGTACCTTTTCGgtaagacatgtttaaattttctaattctaatacagatgagaaaagtctcgttttataaatgaacatttctaaaataat
gactaacgtaagaagtaaacattcccgt

AMPLICOM 27 EXON 14:

accatgtagcaaatgagggctgcaacaaaggcatattcctaaatatttatgtgtactagtcaafaaacttatatatttctccccattgcagCACAACT
AAGGAACGTC AAGAGATACAGAAATCCAAATTTTACCCGCACCTGGTCAAGAATTTCTGTCT
AAATCTCATTTGTATGAACATCTGACTTTGGAAAAATCTTCAAGCAATTTAGCAGTTTCAG
GACATCCATTTTATCAAGTTTCTGCTACAAGAAATGAAAAATGAGACACTTGATTACTAC
AGGCAGACCAACCAAAGTCTTTGTTCCACCTTTTAAAACTAAATCACATTTT CACAGAGTTG
AACAGTGTGTTAGGAATATTAAC TTGGAGGAAAA CAGACAAAA GCAAAACATTGATGGACATG
GCTCTGATGATAGTAAAAATAAGATTAATGACAATGAGATTCATCAGTTTAAACAAAAACAA
CTCCAATCAAGCAGCAGCTGTAAC TTTACAAAGTGTGAAGAAGAACCTTTAGgtattgtatgaca
atgtgtgatgaattttgctttcagttagAtatttccgttgtaaataatgtcctgatggtttcccccttgggtggtaatttaagccc

AMPLICOM 28 EXON 15:

ggccaggggtgtgcttttaaattcaattttatttttctaagtatttattttgatagATTTAATTACAAGTCTTCAGAATGCCAG
AGATATACAGGATATGCGAATTAAGAAGAAACAAAGGCCAACGCGTCTTTCCACAGCCAGG
CAGTCTGTATCTTGCAAAAACATCCACTCTGCCTCGAATCTCTCTGAAAGCAGCAGTAGG
AGGCCAAGTTCCTCTGCGgtgtcccaataaacaggtatgtgttgnctacaatactgatggctttatgacagagtgaatttatttcattaact
agtatcct

AMPLICOM 29 EXON 16:

ttggtaaatcagtttggtttgtataattgttttattgtgtgatacatgttactttaaattgttttctttttgtgtgtttattttgtgtagGTGTTCTCATA
AACAGCTGTATACGTATGGCGTTTCTAAACATTGCATAAAAAATTAACAGCAAAAATGCAG
AGTCTTTTCAGTTTCACACTGAAGATTATTTTGGTAAGGAAAGTTTATGGACTGGAAAAG
GAATACAGTTGGCTGATGGTGGATGGCTCATACCCTCCAATGATGGAAAGGCTGGAAAAG
AAGAATTTTATAGgtactctatgcaaaaagattgtgttaacttttatgtattccctcCctctttctcttaactgtctctcgaactaaaaagt
ggct

AMPLICOM 30 EXON 17:

cagagaatagttgagttggattcagatcatcctatgtggttttatgataatattctacttttattttgttcagGGCTCTGTGTGACACTCCA
GGTGTGGATCCAAAGCTTATTTCTAGAATTTGGGTTTATAATCACTATAGATGGATCATAT
GGAACTGGCAGCTATGGAATGTGCCTTTCTAAGGAATTTGCTAATAGATGCCTAAGCC
CAGAAAGGGTGCTTCTTCAACTAAAATACAGgcAagttaaagcattacattacgtaatcatatagggcagtatgggttaag
gtttct

AMPLICOM 31 EXON 18 A:

gatccactatttgggattgctaataaagcatttttgcattttatttttctttttaaataattgatatttaacaatatgaacaatatattcctagctacaaaatttta
attctcagatttcttagataaattcagttttattctcagttattcagtgactgtttaaacagtggaattctagagtcacactcctaaaatagcattttgtttcactttt
agATATGATACGGAAATTGATAGAAGCAGAAGATCGGCTATAAAAAAGATAATGGAAAGG
GATGACACAGCTGCAAAAACACTTGTCTCTGTGTTTCTGACATAATTTTATTGAGCGCAA
ATATATCTGAAACTTCTAGCAATAAACTAGTAGTGCAGATACCCAAAAAGTGGCCATTATT
GAACTTACAGATGGGTGGTATGCTGTAAAGGCCAGTTAGATC

AMPLICOM 32 EXON 18 B:

GCAGATACCCAAAAAGTGGCCATTATTGAACTTACAGATGGGTGGTATGCTGTAAAGGCCAG
TTAGATCCTCCCCTCTTAGCTGTCTTAAAGAATGGCAGACTGACAGTTGGTCAGAAGATTA
TTCTTCATGGAGCAGAACTGGTGGGCTCTCCTGATGCCTGTACACCTCTTGAAGCCCCAG
AATCTCTTATGTTAAAGgtaattaattgcactctgtgtaaaaatcagtcattgattcagttaaattctagaagtttacatttaaaatttaaatgctt
actaaggatgctcaatttcttagatgactgataattttagataaaaagcatatttctcagacagttaaagttttgtcagttttgggaggtccaga

AMPLICOM 33 EXON 19:

Cttattactgtcttactaatcttccaaagacttttaagtgaaatatttttaagggcagttctagaagaatgaaaactttatgatatctgtaataagaattgaatacatat
ttaactactaatcaatataatttataattgtccagATTTCTGCTAACAGTACTCGGCCTGCTCGCTGGTATACCAA
ACTTGGATTCTTTCCTGACCCTAGACCTTTTCCTCTGCCCTTATCATCGCTTTTCAGTGAT
GGAGGAAATGTTGGTTGTGTTGATGTAATTATTCAAAGAGCATACCCTATACAGgtatgatgtatt
cttgaacttaccatataattctttctttgatacaattaattgtttgtttgtagatggagtttcggtc

AMPLICOM 34 EXON 20:

ggigatccactaatctcagcctccaaagttctgggattacagatgtgagccactgtgcctggcctgatacaattaacttgaatgttatatgtgactttttgg
gtgtgtaacacattattacagTGGATGGAGAAGACATCATCTGGATTATACATATTTTCGCAATGAAAGA
GAGGAAGAAAAGGAAGCAGCAAAATATGTGGAGGCCCAACAAAAGAGACTAGAAGCCTT
ATCACTAAAATTCAGGAGGAATTTGAAGAACATGAAGgtaaaattagttatgttacacattgtatttctaataatga
gaacaaagtcttagagactttgaafttaacattttatgagtaaaattgtttattttgagtagtaaaattgactttatttttagtatctagggtattctttttgtgttagac
aaagaatagcaacaagggac

AMPLICOM 35 EXON 21:

gggtgtttatgcttggttctttagttttagttgctttgaatttacagtttagtaantaataatcctttgttttcttagAAAACACAACAAAACCATA
TTACCATCACGTGCACCTAACAAAGACAGCAAGTTTCGTGCTTTGCAAGATGGTGCAGAGCT
TTATGAAGCAGTGAAGAATGCAGCAGACCCAGCTTACCTTGAGgtgagagagtaaggacatataatgag
gcttgatgatttcaaggtgagaagctgtTtanactcttgccatcacaggaaggaatattgttgaatg

AMPLICOM 36 EXON 22:

aaccacaccttaagatgagctcttaattttgtgtattgtcctgtttaagccatctagttacaatagatggaactttttgttctgattgctttttatccaatatcttaa
atgttcacagGGTTATTTTCAGTGAAGAGCAGTTAAGAGCCTTGAATAATCACAGGCAAATGTTG
AATGATAAGAAACAAGCTCAGATCCAGTTGGAAATTAGGAAGGCCATGGAATCTGCTGAA
CAAAAGGAACAAGGTTTATCAAGGGATGTCACAACCGTGTGGAAGTTGCGTATTGTAAGC
TATTCAAAAAAAGAAAAAGATTTCAGgtaagtagtaaatgctttgtttttatcagttttataacttaaaaaatgaccttactaacaataatg
attataaatccagataaagataaagtttagtttatatcagagaagcaaaatccactactaatgccc

AMPLICOM 37 EXON 23:

acttctccattgcatctttctcatcttttcccaaacagTTATACTGAGTATTTGGCGTCCATCATCAGATTTATATTC
TCTGTTAACAGAAGGAAAGAGATACAGAATTTATCATCTTGCAACTTCAAAATCTAAAAGT
AAATCTGAAAGAGCTAACATACAGTTAGCAGCGACAAAAAAACTCAGTATCAACAACTACC
Ggtacaaaccttccattgtaattttcagtttgataagtgctttagttatggaatcccaatgttgaattttgtttgttt

AMPLICOM 38 EXON 24:

GCAGCGACAAAAAAACTCAGTATCAACA ACTACCggtacaaaccttccattgtaattttcagtttgataagtgcttgg
agtttatggaatcctcatatgttgaattttgtttgtttctgtagGTTTCAGATGAAATTTTATTTTCAGATTTACCAGCCA
CGGGAGCCCCTTCACTTCAGCAAAATTTTAGATCCAGACTTTCAGCCATCTTGTCTGAGG
TGGACCTAATAGGATTTGTCTGTTTCTGTTGTGAAAAAAACAGgtaatgcacaatataagtaatttttttattgattct
ttaaaaaaCattgtcttttaaaatctcttagattagttggagctaccagttggcaaat

AMPLICOM 39 EXON 25:

gcttcgccaattcagctattttgattgttattattagcatataccaaaataatagggcatattagatttcttcttgcactcttaaaattcatctaacacatctat
aataacattctttttttccattctagGACTTGCCCCCTTTCGTCTATTTGTCAGACGAATGTTACAATTTAC
TGGCAATAAAGTTTTGGATAGACCTTAATGAGGACATTATTAAGCCTCATATGTTAATTGC
TGCAAGCAACCTCCAGTGGCGACCAGAATCCAAATCAGGCCTTCTTACTTTATTTGCTGG
AGATTTTCTGTGTTTTCTGCTAGTCCAAAAGAGGGCCACTTTCAGAGACATTCAACAAA
ATGAAAAATACTGTTGAGgtaaggttActtttcagcatcaccacacattttggtg

AMPLICOM 40 EXON 26:

gtccaaactttcatttctgctttaaggaataacttttgaacataaataatgtgggttgcatttataaagcagcttttccactttttcttagAATATTG
ACATACTTTGCAATGAAGCAGAAAACAAGCTTATGTCATATACTGCATGCAAATGATCCCA
AGTGGTCCACCCCAACTAAAGACTGTACTTCAGGGCCGTACACTGCTCAAATCATTCTG
GTACAGGAAAACAAGCTTCTGgtaagttatgtaaaactcaaggaatattataagaagtatataggaggccatctgatattctgtgtataact
agtaaacatggtaaatgtaattaaacttaattagaaaagtgggttatgtggtc

AMPLICOM 41 EXON 27 A:

ctgtgtgtaaatattgctgctaaaatatttcaatgaaaagtactttgatttagttttatgttactacataattatgataggctacgtttcattttttatcagATGT
CTTCTCCTAATTGTGAGATATATTATCAAAGTCCTTTATCACTTTGTATGGCCAAAAGGAA
GTCTGTTTCCACACCTGTCTCAGCCCAGATGACTTCAAAGTCTTGTAAGGGGAGAAAGA
GATTGATGACCAAAAGAAGTGCAAAAAGAGAAGAGCCTTGGATTTCTTGAGTAGACTGCC
TTACCTCCACCTGTTAGTCCCATTTGTACATTTGTTTCTCCGGCTGCACAGAAGGCATTT
CAGCCACCAAGGAGTTGTGGCACCAATACGAAACACCCATAAAGAAAAAGAACTGAATT
CTCCTCAGATGACTCCATTTAAAAAATCAATGAAATTTCTCTTTTGAAAAGTAATTCAATA
GCTGACGAAGAACTTGC

AMPLICOM 42 EXON 27 B:

ACCCATAAAGAAAAAAGAACTGAATTCTCCTCAGATGACTCCATTTAAAAAATCAATGAAAT
TTCTCTTTTGAAAAGTAATTCAATAGCTGACGAAGAAGTTGCATTGATAAATACCCAAGCTC
TTTTGTCTGGTTCAACAGGAGAAAAACAATTTATATCTGTCAGTGAATCCACTAGGACTGC
TCCCACCAGTTCAGAAGATTATCTCAGACTGAAACGACGTTGTACTACATCTCTGATCAAA
GAACAGGAGAGTTCCCAGGCCAGTACGGAAGAATGTGAGAAAAATAAGCAGGACACAAT
TACAACTAAAAAATATATCTAAGCATTGCAAAGGCGACAATAAATTATTGACGCTTAACC
TTCCAGTTTATAAGACTGGAATATAATTTCAAACCACACATTAGTACTTATGTTGCACAATGA
G

12.2.5 Protocolo PCR longo *BRCA1*

Kit Triple Master da Eppendorf para grandes fragmentos para BRCA1:

Mix 1

H₂O: 2 µL

Primer F: 1 µL

Primer R: 1 µL

Mix 2

H₂O: 16,8 µL

Buffer : 2,5 µL

dNTP: 0,5 µL

Taq triple: 0,2 µL

DNA: 1 µL

Volume final: 25µL

Programa do termociclador:

1. 93°C/30 seg
2. HOLD A 93°C
3. 93°C/3 min
4. 93°C/15 seg
5. 65°C/30 seg
6. 68°C/10 min
7. GOTO 4 REP 10
8. 95°C/15 seg
9. 65°C/30 seg
10. 68°C/10 min
11. GO TO 8 REP 20
12. 72°C/5 min
13. HOLD 20°C

Produtos verificados em Gel Agarose 0,8%

12.2.6 Primers PCR lungo *BRCA1*

Par 1:	5' GCAATGCAAAGACCGTCCGCTG – 3'
	5' GTACTTCTTCAACGCGAAGAGCAGATAAATC 3'
Par 2:	5' TTTGGACAATAGGTAGCGATTCTGACCTTC 3'
	5' AACTCCAGACTAGCAGGGTAGGGGGGG 3'
Par 3:	5' TCCTGACACAGCAGACATTTA3'
	5' CCCGTCTCTACAGAAAACAC 3'
Par 4:	5' TGTGAAGACAGGAAAGGACCTGATACCAGTTTC 3'
	5' CACGGTTTCTGTAGCCATACTTTGGATGATAG 3'
Par 5:	5' GCTTTTCAGCTTGACACAGGTTTGG 3'
	5' CCCAGCACTCCTAAGAACATTTAGTATAGG 3'
Par 6:	5' CAGGAAACCAGTCTCAGTGTCCAACCTCTAACCTTG 3'
	5' TGTCACTCAGACCAACTCCCTGGCTTTCAGAC 3'
Par 7:	5' CCATACACATTTGGCTCAGGGTTACCGAAGAGGG 3'
	5' TTCGCAGGTCCTCAAGGGCAGAAGAGTCAC 3'
Par 8:	5' GGTGTGAGAGTGAAACAAGCGTCTCTGAAGACTGC 3'
	5' GCCTGTCACCAATTTCTCCCATTCCACTTAGCTTC 3'
Par 9:	5' GGAGCCAGCCTTCTAACAGCTACCCTTCCATC 3'
	5' GACTCCAGAGCAACTGTGCATGTACCACCTATC 3'
Par 10:	5' TGATAGGTGGTACATGCACAGTTGCTCTGG3'
	5' GCTAACTACCCATTTTCTCCCGCAATTCC 3'
Par 11:	5' GTGTAGAACGTGCAGGATTG 3'
	5' CATTGTTAAGGAAAGTGGTGC 3'
Par 12:	5' TGCAGATGCTGAGTTTGTGTGTGAACGGAC 3'
	5' CCTGGGATTCTCTTGCTCGCTTTGGACC 3'
Par 13:	5' TCCCAGTGAGGTGAAAAGCCGGATTGTTAAGTTC 3'
	5' CCCATAGCAACAGATTTCTAGCCCCCTGAGG 3'
Par 14:	5' ATATGACGTGTCTGCTCCAC 3'
	5' ACTGTGCTACTCAAGCACCA 3'
Par 15:	5' AGCTGTGTGGTGTCTGTGGTGAAGG 3'
	5' AGAGCCAGCAAGATCAGATGGTCTACAGGAC 3'

12.2.7 Protocolo PCR TP53 e temperaturas de DHPLC

	Reagentes	Exon 2-3	Exon 4	Exon 5-6	Exon 7	Exon 8-9	Exon 10	Exon 11
Volumes dos reagentes	H2O							
	10x buffer	2,5 µL	3,0 µL	3,0 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
	MgCl2 (50mM)	0,5 µL	0,9 µL	0,9 µL	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL	0,75 µL
	dNTP(B)	1,0 µL	1,2 µL	1,2 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
	Primer F (25µM)	1,0 µL	1,2 µL	1,2 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
	Primer R (25µM)	1,0 µL	1,2 µL	1,2 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL	1,0 µL
TaqPlat DNA	0,2 µL	0,24 µL	0,24 µL	0,24 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL	0,2 µL
Total	25µL	30µL	30µL	30 µL	25µL	25µL	25µL	25µL
Programas	1	94°C 2 min	1	94°C 2 min	Ver Exon 4	1	95°C 15 min	Ver Exon 4
	2	94°C 45 seg	2	94°C 30 seg		2	94°C 30 seg	
	3	61°C 45 seg	3	63,5°C 45 seg		3	60°C 30 seg	
	4	72°C 45 seg	4	72°C 1 min		4	72°C 30 seg	
	5	72°C 10 min	5	94°C 30 seg		5	72°C 10 min	
	6	10°C HOLD	6	63°C 45 seg		6	10°C HOLD	
			7	72°C 1 min				
			8	94°C 30 seg				
			9	62,5°C 45 seg				
			10	72°C 1 min				
			11	94°C 30 seg				
			12	62°C 45 seg				
			13	72°C 1m				
			14	94°C 30 seg				
			15	61,5°C 45 seg				
			16	72°C 1 min				
			17	94°C 30 seg				
			18	61°C 45 seg				
			19	72°C 1 min				
			20	94°C 30 seg				
			21	60,5°C 45 seg				
			22	72°C 1 min				
			23	94°C 30 seg				
			24	60°C 45 seg				
			25	72°C 1 min				
			26	72°C 10'				
			27	10°C HOLD				
Temperaturas DHPLC			60,3°C ; 62°C ; 65°C	60,2°C ; 63,6°C ; 66°C	61,6°C ; 64°C	57,9°C ; 59,8°C ; 62,4°C		

12.2.8 Primers TP53

	Primer direto	Primer reverso	Fragmento (pb)
Éxons 2-3	p558: 5'-ccagtgaccaggggtgga-3'	p228:5'-agcatcaaatcatccattgc-3'	428
Éxon 4	p326:5'-tgaggacctggtcctctgac-3'	p327:5'-agaggaatcccaaagttcca-3'	412
Éxon 5-6	P236:5'-tggtcactgtgccctgact-3'	p256:5'-cggaggccactgacaacca-3'	488
Éxon 7	p333:5'-cttgccacaggtctcccaa-3'	p313:5'-aggggtcagcggcaagcaga-3'	237
Éxon 8-9	p314:5'-ttgggagtagatggagcct-3'	p315:5'-actgataagaggtccaag-3'	372
Éxon 10	p10li:5'-caattgtaactgaaccatc-3'	p563:5'-cttccaacctaggaaggca-3'	191
Éxon 11	p564:5'-atctctcctcctgcttctg-3'	pE11Ri:5'-aggctgtcagtggggaacaa-3'	145

12.2.9 Protocolo amplificação *CHEK2*

Condições para PCR longo do gene *CHEK2*

Primer F: 5' TTAAAGCCAGAGAATGTTTTACTGTCATCTCAAG 3'

Primer R: 5' TCAACTAAAGAACCGATTATCAAGCAGAAGCACAAAG 3'

Reagentes

MIX 1

dNTP	0,875 µL
<i>Primer F</i>	0,375 µL
<i>Primer R</i>	0,375 µL
H ₂ O	variável
DNA	variável
Total	12,5 µL

MIX 2

TAMPAO A	1,0 µL
TAMPAO B	3,1 µL
MIX ENZIMA Elongase	0,83 µL
H ₂ O	variável
Total	12,5 µL

Programa do termociclador

1. 94°C 2 min **Adicionar MIX 1**
2. 80°C HOLD **Adicionar MIX 2**
3. 94°C 10 seg
4. 64°C 30 seg
5. 68°C 10 min
6. GOTO 3 REP 10
7. 94°C 10 seg
8. 64°C 30 seg
9. 68°C 10 min 20 seg
10. GOTO 7 REP 20
11. 68°C 17 min
12. 25°C 10 seg

Checar amplificação em gel de agarose 0,5%

Condições para PCR Nested

Primer F: 5' ATAACAGGAAACAGCTATGACCAACTTGCAAAGACATGAATCTG 3'

Primer R: 5' GCAAGACACATTTGTGACTTC 3'

Reagentes

Pré Mix

Tampão 10X	1 µL
MgCl ₂	0,9µL
dNTP	0,3 µL
<i>Primer F</i>	0,75 µL
<i>Primer R</i>	0,75 µL
DNA (prod. do PCR longo)	1 µL
LoTE	5,3 µL

Mix da polmerase

Buffer	0,5 µL
LoTE	4,0 µL
Taq Platinum	0,5 µL

LoTE= 300 µL TRIS + 40 µL EDTA + 99,7 mL de H₂O

Programa do termociclador

- | | |
|------------------|------------------------------------|
| 1. 94°C 2 min | Adicionar Pré Mix |
| 2. 80°C HOLD | Adicionar Mix da polimerase |
| 3. 94°C 30 seg | |
| 4. 64°C 1 min | |
| 5. 72°C 1 min | |
| 6. GOTO 3 REP 35 | |
| 7. 72°C 5 min | |
| 8. 25°C 10 seg | |

Checar amplificação em gel de agarose 2%

12.2.10 Tabela com famílias, critérios e alterações detectadas

Família	Critério	Câncer no probando	HF	Alteração verificada
4	HBOC – ASCO 3/4A; M>30%	Mama (F-37)	mama (F-43, F-<50);colo de útero (28); garganta (M-41); lábio (M-ND)	BRCA1 2201C/T P871L E1038G K1183R K1208T S1613G IVS18+66G/A BRCA2 203G/A D129N 3624A/G
5	LFL - E1	Mama (F-39), útero (39)	meduloblastoma (F-44)	
6	HBOC – ASCO 3; M>30%; LFL – B/E1	CCR (F-40)	mama (F-38, F-47, F-bil39), SNC (F-38, M-50) , pulmão (M-64)	BRCA1 K1183R BRCA2 N289Y IVS10-74T/C IVS16-14T/C
25	HBCC - 1 LFL – E1	CCR (F-72)	mama (F-60), CCR (F-35, M-13), utero (50), próstata (ND, ND), pancreas (M-ND), esôfago (M->70)	
32	LFL – B/E1	Pulmão (M-84)	SNC (F-7, M-23) , próstata (52, 87) , sarcoma (M-40) , esôfago (F-77) , testículo (58)	
36	LFL - E1	NA	esôfago (M-60, F-72), SNC (M-48), mama (F-43), próstata (81)	
62	HBOC – ASCO 4A/4C; M>30%	Mama (F-35)	mama (F-30, F-58), útero (ND, 30), colo de útero (53) , ovário (30), boca (M-50)	BRCA1 Q356R 2201C/T 2430T/C P871L E1038G K1183R K1208T 4427T/C S1613G IVS18+66G/A BRCA2 203G/A D129N IVS4-89T/C IVS6-49A/C N289H N289Y

				IVS10-74T/C 2457T/C 3624A/G D1699G 7470A/G V2527L IVS16-14T/C A2951T
85	LFL – B/E1	Linfoma não Hodking (M- 46)	mama (F-43, F-63), SNC (M-23), CCR (F-64)	
101	HBOC – ASCO 4A LFL – E1	NA	Mat= mama (F-38, F-46), estômago (M-70); Pat= sarcoma (M- 15), leucemia (M- 49), estômago (F- ND)	BRCA1 2201C/T 2430T/C P871L E1038G K1183R K1208T S1613G IVS18+66G/A BRCA2 IVS4-89T/C N289H 2457T/C V2527L IVS16-14T/C
103	HBCC - 2 LFL – E1	Mama bilateral (F-65)	mama (F-36, F-82), ginecológico (49), pulmão (F-ND), leucemia (M-ND), CCR(M-ND), ND (M-ND)	
110	LFL - E1	NA	linfoma (M-10), leucemia (F-40)	
137	HBOC – ASCO 4A	Mama (F-61)	mama (F-43, F-53,F-50), pulmão (M-45)	BRCA2 203G/A N289Y 3624A/G IVS16-14T/C
163*	LFL - E1	NA	CCR (M-53, M-46), mama bil (F-49), leucemia (M-40)	
186**	HBOC – ASCO 3/4A; M>30% LFL - B	NA	mama (F-35, F-40, F-40), rim (M-5)	BRCA1 2201C/T 2430T/C P871L E1038G K1183R K1208T 4427T/C IVS17+44A/T BRCA2 D129N N289H IVS16-14T/C K2950N

187	LFL - E1	Mama (F-58)	mama (F-60, F-70, F-bil47, F-ND, F-ND), rim (F-79, M-63), fígado (M-ND, M-ND, M-ND), pulmão (M-72), SNC (M-55), bexiga (M-63)	
284***	HBCC - 1 LFL - B/E1	CCR (F-71)	breast (F-50), colon (F>50), CNS (M>70), gastric (M-41)	
290	LFL - E1/E2	CCR (F-42)	mama (F-43, F-<62), pele (F-43, F-38), carcin basocelular (M-60), pulmão (M-62, M-78), próstata (69), rabdomiosarcoma (F-19)	
303	LFL - B/E1	NA	mama (F-35, F-bil 36), leucemia (M-8), útero (40, ND)	
311	HBCC - 1	CCR (F-54)	CCR (M-52, F-<58), mama (F-66), leucemia (F40, F-<30)	
407	LFL - E1	Mama (F-59)	ovário (65), leucemia (F-<50, M-ND), pele (F-ND), mama (F-73)	
439	HBOC - ASCO 4A/4C HBCC - 2	Mama bilateral (F<50)	mama (F-bil39, F-70), uterino (>30), CCR (M-60), ovario (70)	BRCA1 2201C/T 2430T/C P871L E1038G K1183R K1208T 4427T/C S1613G IVS18+66G/A BRCA2 N289Y IVS10-74T/C 2457T/C A2951T
440	LFL - B/E1	NA	próstata (69), SNC (M->50, M-37, F-43), fígado (F-ND), bexiga (M-60), CCR (F-40), estômago (M-ND)	
442	HBOC - ASCO 1/3/4A; M>30%; P>30% LFL - E1	Estômago (F-39), ovário (42)	mama (F15, F40, F21, FND, FDN, FND, FND, FND, FND, FND),	BRCA1 2201C/T P871L K1183R

			estômago (FND), próstata (ND), leucemia (M48), rim (FND), ND (F64, MND)	S1613G IVS18+66G/A BRCA2 203G/A D129N IVS6-49A/C IVS10-74T/C Q1181P V2527L IVS16-14T/C G2724V
520	HBOC – ASCO 3/4A; M>30% LFL - B	Mama Bilateral (F-42)	Mama (F49, F38, F<52, Fbil<55), ossos (M31), esôfago (M50), CCR (F>60), leucemia (M8)	BRCA1 2201C/T P871L E1038G K1183R K1208T S1613G IVS17+44A/T BRCA2 203G/A D129N IVS6-49A/C IVS10-74T/C 3624A/G 7470A/G IVS16-14T/C G2724V
525	LFL - E1	Pâncreas (M-55)	mama (F-55), CCR (M-70), ND (M-60)	
529	LFL - E1	Tumor de Wilms (F-4)	leucemia (F-ND, F- <50, F-ND), mama (F-20), colo de útero (31)	
534	LFL - E1	Mama (F-53), ginecológico (F-ND)	próstata (55), pulmão (F-ND, F- ND), leucemia (M- ND), ND (M-ND)	
552	HBOC – ASCO 3/4A; M>30% HBCC – 1/2/4/5 LFL - E1	Mama (F-38)	Mat= mama (F36, F62, F25, FND), CCR (M>50, M<48, MND), ovário (ND), útero (ND)/ Pat= SNC (MND), próstata (ND)	BRCA2 IVS10-74T/C IVS16-14T/C G2724V
554	HBOC – ASCO 4B/4C LFL - E1	Mama (F-44), melanoma (F-39)	ovario (63, 60)	BRCA1 2201C/T 2430T/C P871L E1038G K1183R K1208T 4427T/C S1613G IVS18+66G/A BRCA2 203G/A N289H

				3624A/G 7470A/G IVS16-14T/C
570	HBOC – ASCO 4A	Mama (F-40)	mama (50), útero (>50, ND)	BRCA1 2201C/T 2430T/C P871L E1038G K1183R K1208T 4427T/C IVS17+44A/T IVS18+66G/A BRCA2 203G/A IVS6-49A/C N289H 3624A/G R2108H 7470A/G IVS14+3delA IVS16-14T/C
572	LFL – B/E1	Mama (F-60), pele (F-60)	SNC (F-<18), mama (F-80)	
573	LFL - B	NA	leucemia (F- 4meses, F-7meses), ovário (44), pulmão (M-40), SNC (M- 40), perna (M-50, F- ND)	
581	LFL - E1	Mama (F-45)	mama (F-42), próstata (45)	
590	HBOC – ASCO 4A LFL - E1	Mama (F-49)	mama (F53), tireoide (F36), ovário (28), estômago (F40), garganta (M50), nariz (FND), ND (FND)	BRCA1 IVS7-34C/T 2201C/T 2430T/C P871L E1038G K1183R K1208T 4427T/C IVS17+44A/T IVS18+66G/A BRCA2 D129N N289H IVS10-74T/C 2457T/C 3624A/G 7470A/G V2527L IVS16-14T/C A2951T
592	LFL - E1	Mama (F-49)	SNC (M-8), esôfago (F-63)	
607	LFL - E1	Melanoma (F-45)	mama (F-50), pâncreas (M-50)	

652	HBOC – ASCO 4A	Mama (F-33)	mama (F-47), útero (<50)	BRCA2 IVS7-34C/T BRCA2 D129N N289H IVS10-74T/C Q1181P IVS16-14T/C
678	LFL – B/E1	NA	SNC (F-6, M-44), pele (F-58, M-48) , útero (60), CCR (F-40), próstata (89, 70)	
681****	HBOC – ASCO 4C HBCC - 5	Mama (F-52)	pulmao (M62), endometrio (64), utero (41, <50), mama (F<50), CCR (M50, F68), garganta (M<50)	CHEK2 delC 1100 BRCA1 2201C/T P871L E1038G K1183R K1208T S1613G IVS18+66G/A BRCA2 D129N N289Y T1915M 7470A/G IVS16-14T/C G2724V E2856A
718	HBOC – ASCO 4A	Mama (F-45)	mama (F-45, F-60, F-80), estômago (F-60)	BRCA1 Q356R 2201C/T 2430T/C P871L E1038G K1183R 4427T/C IVS17+44A/T IVS18+66G/A BRCA2 D129N 7470A/G IVS16-14T/C E2856A
728	LFL - E1	Bexiga (F-52)	leucemia (F-9meses), mama (58), estômago (F-60), ND (M-60, M-60, M-ND, F-ND)	
R729	LFL - E1	SNC (M-61)	próstata (<78), SNC (<70), útero (23)	TP53 R273C
732	LFL - E1	Mama (F-46)	CCR (F-27) , próstata (65), rim (M-53)	
736	HBOC – ASCO 4C; M>30% LFL - E1	NA	pâncreas (F25, M50), útero (32, 49), ovário (32, 49, 36),	BRCA1 2201C/T P871L

			CCR (F40), mama bil (F47), pulmão (F60)	E1038G K1183R K1208T S1613G IVS18+66G/A BRCA2 203G/A IVS1-7T/A D129N IVS4-89T/C N289H 3624A/G 7470A/G G2724V
743	LFL - E1	Mama (F-51)	estômago (M-53), próstata (74, 80, 76, 68), pâncreas (F-64, M-69), mama (F->50), útero (>50), ND (M-<86)	
752	LFL - E1	SNC (M-71)	útero (<50), mama bil (F->50)	
779	LFL - E1	Mama (F-43)	CCR (F-58), leucemia (M-<33), mama (F-60), próstata (<60)	
810	HBOC – ASCO 4A	Mama (F-44)	mama (F-bil30, F->70)	BRCA1 Q356R 2201C/T 2430T/C P871L E1038G K1183R K1208T 4427T/C S1613G IVS18+66G/A BRCA2 203G/A IVS4-89T/C N289Y IVS10-74T/C 2457T/C 3624A/G 7470A/G G2724V
907	LFL - E1	Mama (F-37)	CCR (F-84), próstata (70), útero (ND), ND (M-ND)	
R747	LFL - E1	Mama (F-53)	próstata (70, 70)	

* Família testada para mutações em *TP53*, porém após comprovação da história familiar, verificou-se que a mesma não preenchia os critérios de inclusão para LFL;

** Família testada para *BRCA1/2* e *TP53* (devido ao tumor na infância), porém após confirmação da HF, o grau de parentesco com o indivíduo afetado por tumor na infância não se confirmou, deixando assim de possuir critérios para LFL;

*** A referida família apresentava, inicialmente critérios para HBOC e HBCC, porém após confirmação com laudos, um dos casos de CCR não foi confirmado, passando a apresentar critérios apenas para HBOC;

**** Família apresentava inicialmente critérios para HBOC e HBCC, porém um dos casos de câncer de ovário era, na verdade, um tumor de colo de útero, sendo assim a família passou a ser considerada como apresentando critérios de inclusão apenas para HBCC;

Nota: Coluna 1=número das famílias, os heredogramas encontram-se no anexo 12.1.11;

Coluna 2= critérios de inclusão para teste genético, anexo 12.1.4

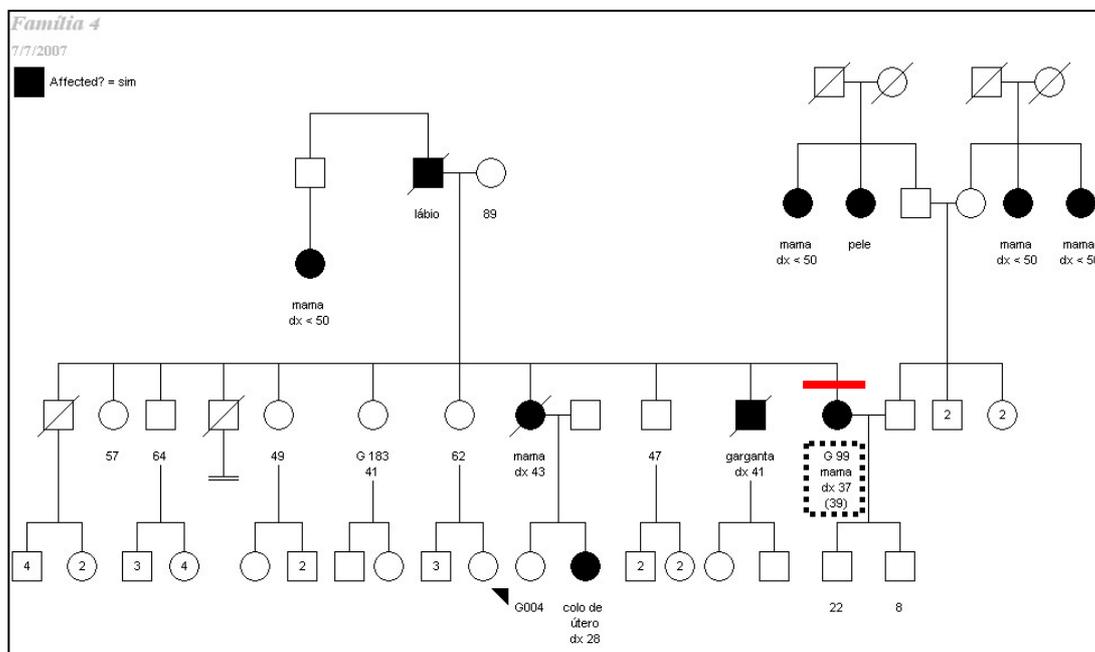
Coluna 3= tipo de câncer presente no probando (indivíduo testado)

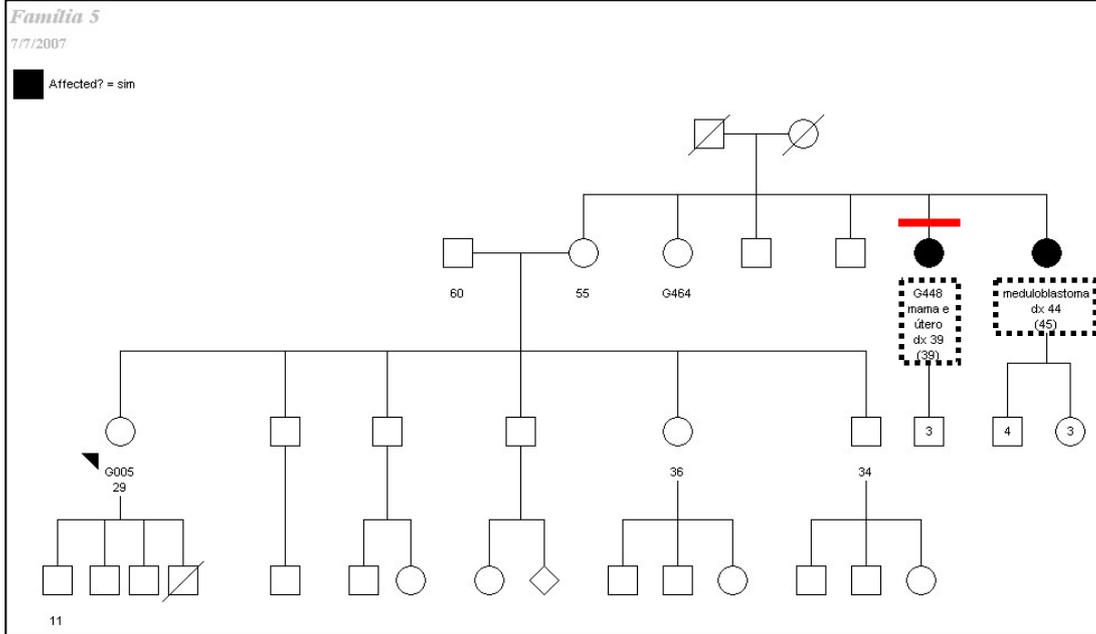
Coluna 4= História familiar de câncer das famílias investigadas (considerado apenas o lado familiar para o qual o critério de inclusão na respectiva síndrome foi preenchido)

Coluna 5= mutações detectadas nos genes *CHEK2* e *TP53*, além das alterações verificadas nos genes *BRCA1/2*; Não estão incluídos os polimorfismos detectados no gene *TP53*

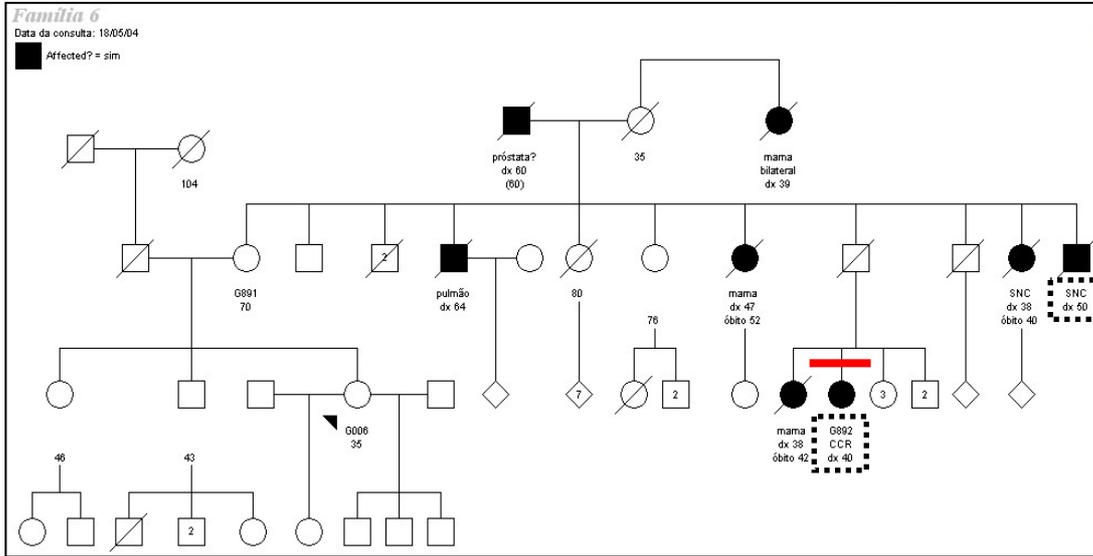
Casos em negrito incluem aqueles com comprovação do diagnóstico por laudo anátomo-patológico, laudo médico e/ou atestado de óbito; HF= história familiar; F= feminino; M= masculino; Mat= materno; Pat= paterno; bil= bilateral; CCR= câncer colo-retal; SNC= sistema nervoso central; ND= não-determinado; NA= não se aplica.

12.2.11 Heredogramas das 50 famílias analisadas

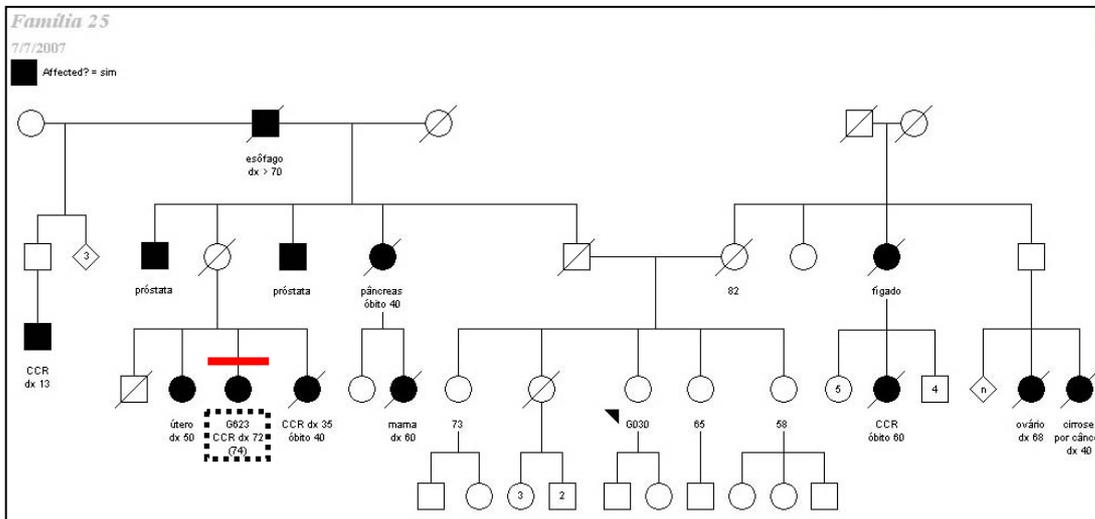




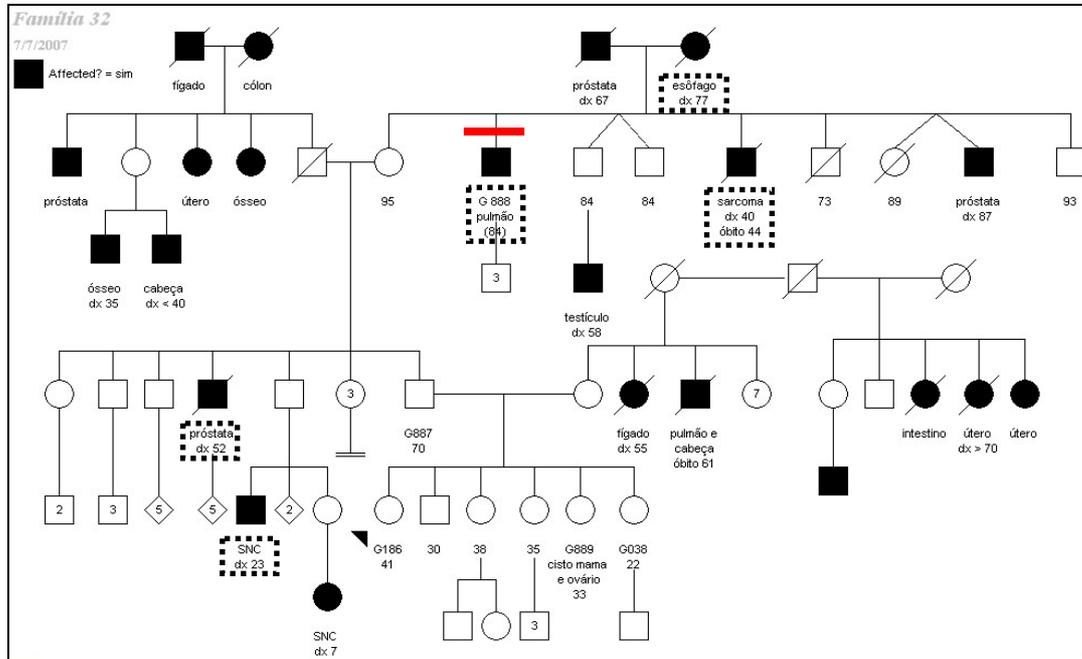
-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando



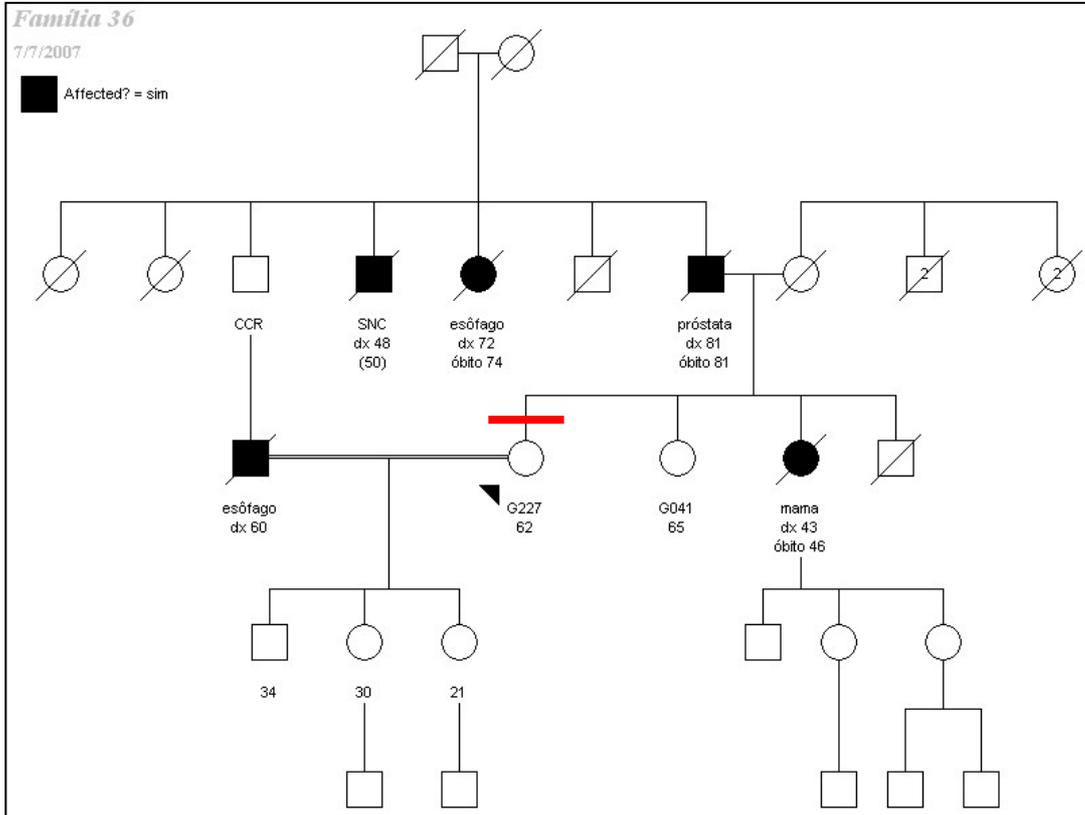
-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando



-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando



-  Afetado
-  Diagn6stico confirmado
-  Indiv6duo testado para muta66o germinativa
-  Caso 6ndice/Probando

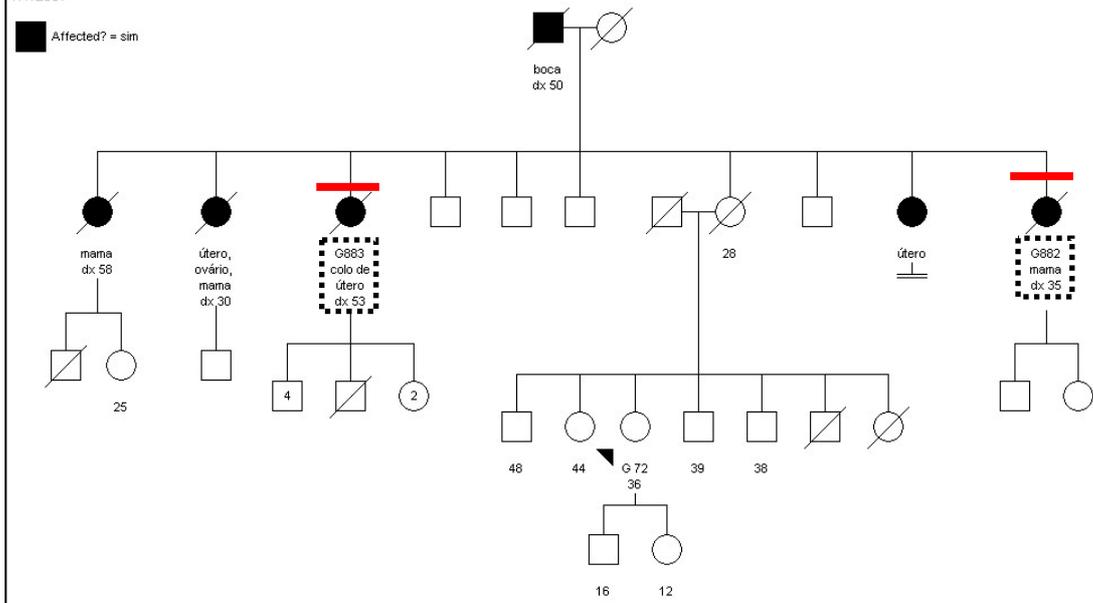


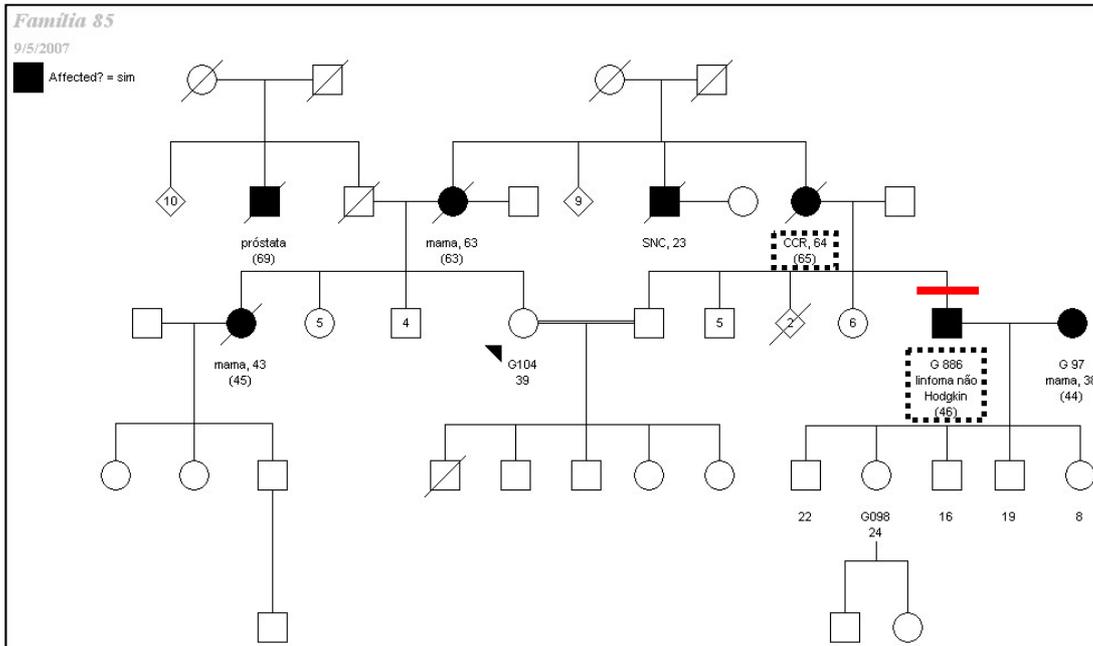
- Afetado
- Diagnóstico confirmado
- Individuo testado para mutação germinativa
- ▼ Caso Índice/Probando

Família 62

7/7/2007

■ Affected? = sim



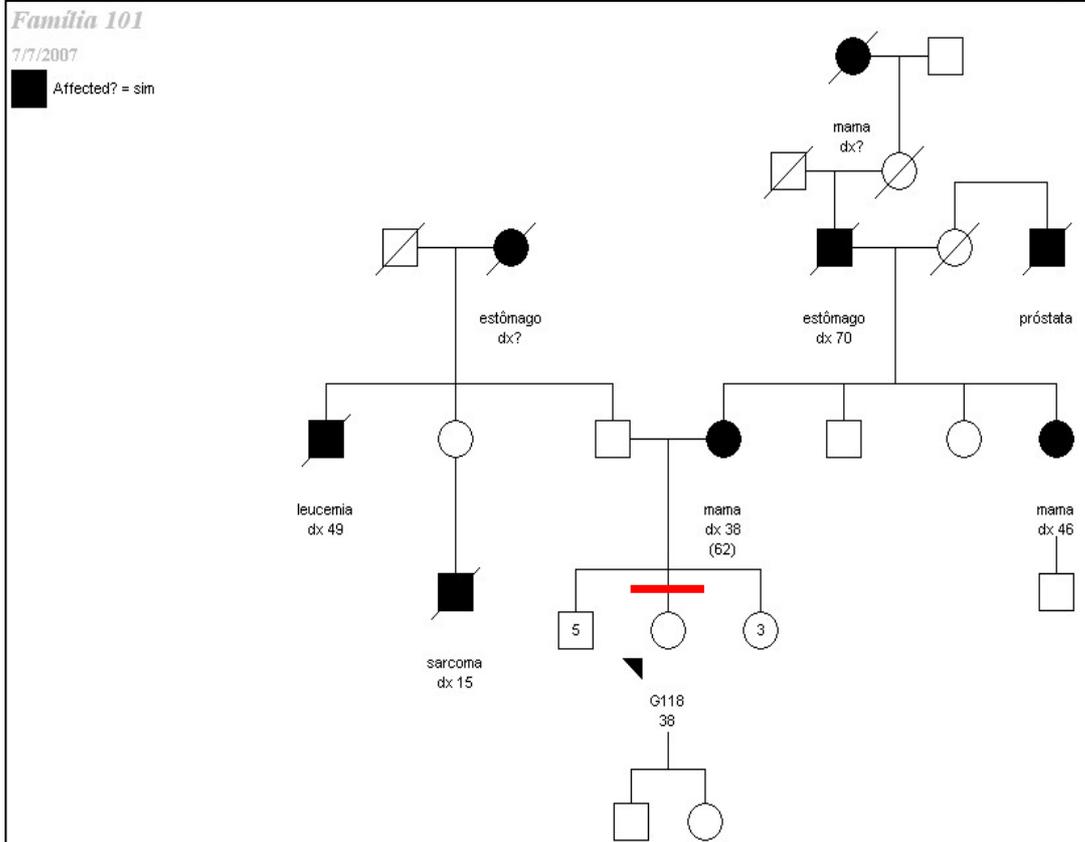


-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando

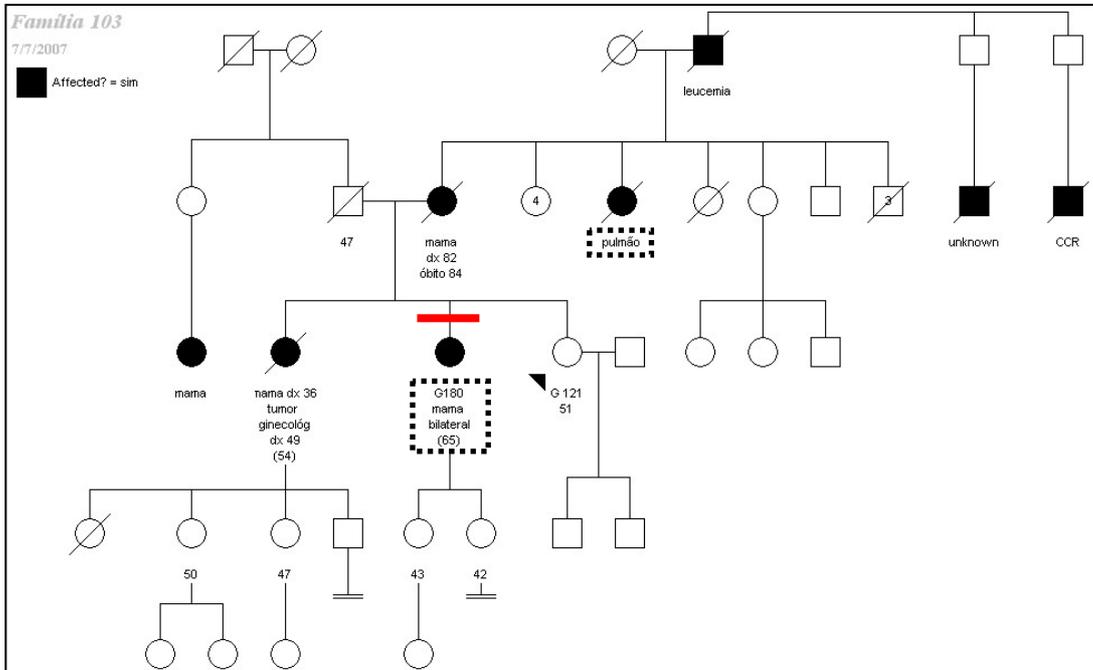
Família 101

7/7/2007

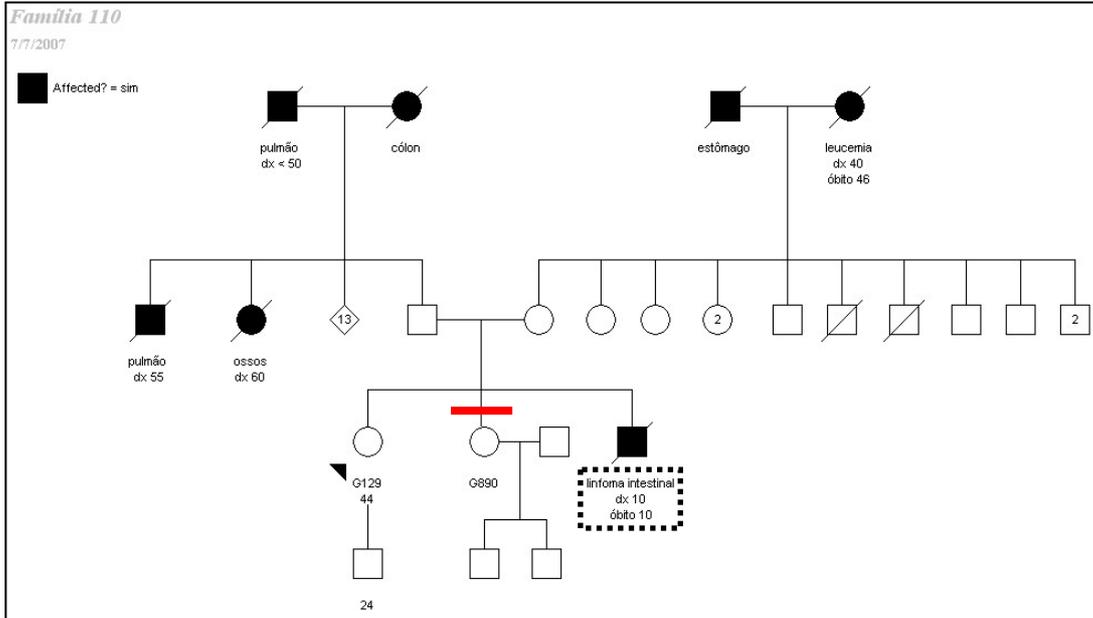
■ Affected? = sim



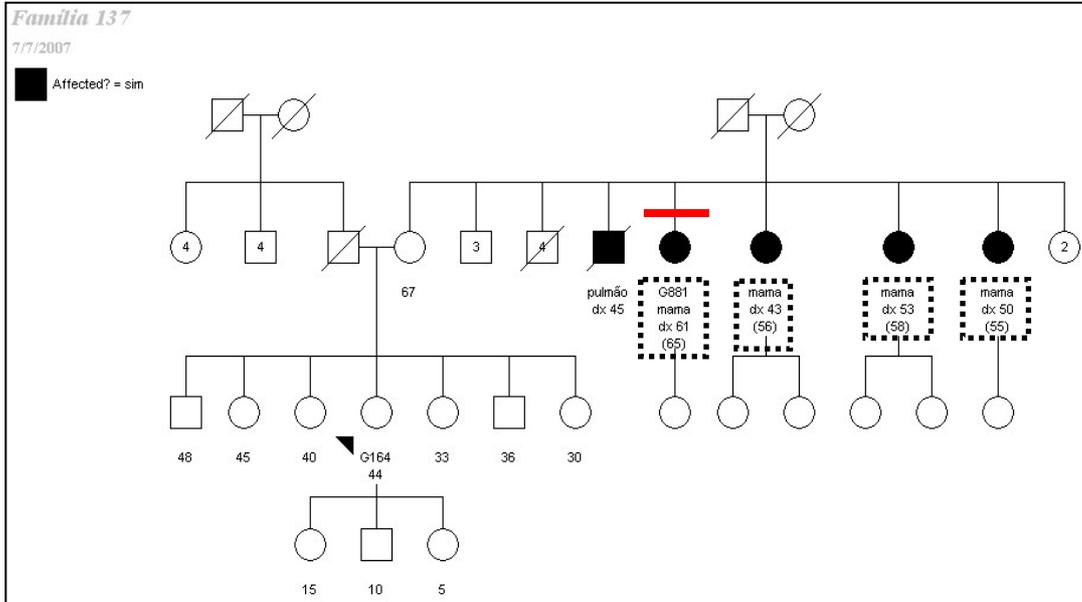
- Afetado
- Diagnóstico confirmado
- Individuo testado para mutação germinativa
- ▼ Caso Índice/Probando

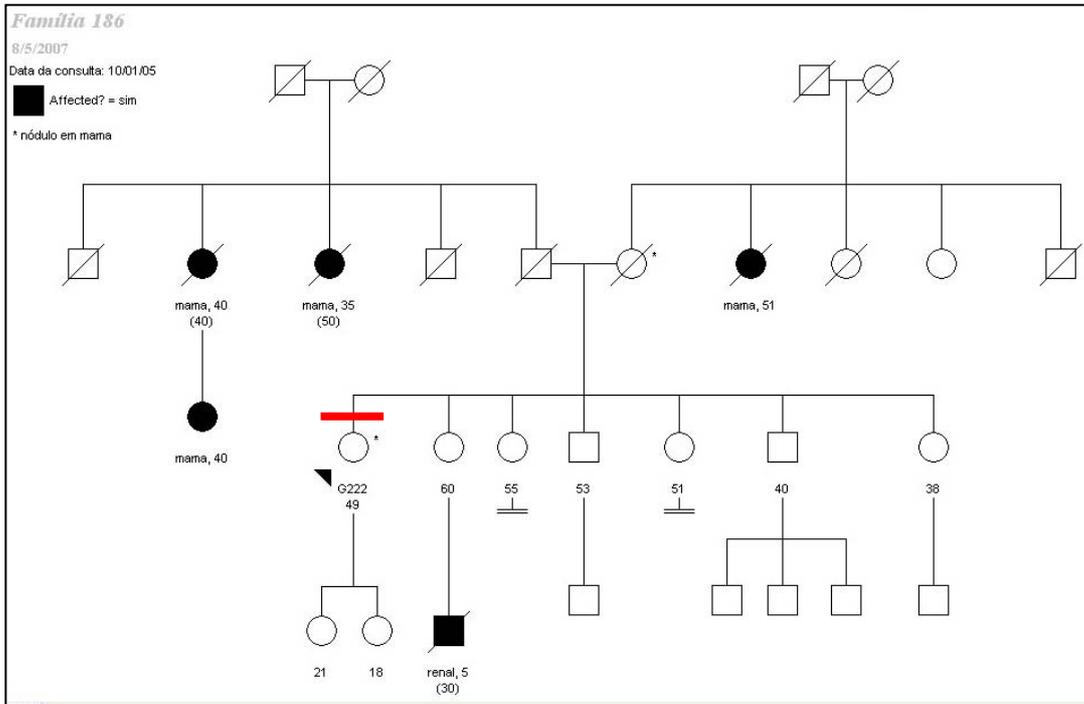


-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando



-  Afetado
-  Diagn633stico confirmado
-  Individuo testado para muta633633o germinativa
-  Caso 633ndice/Probando



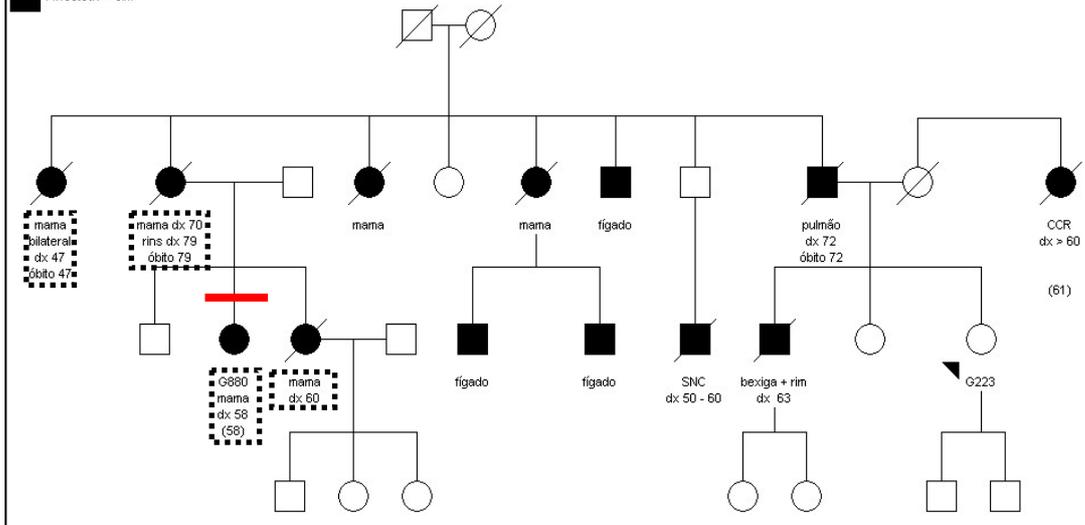


-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando

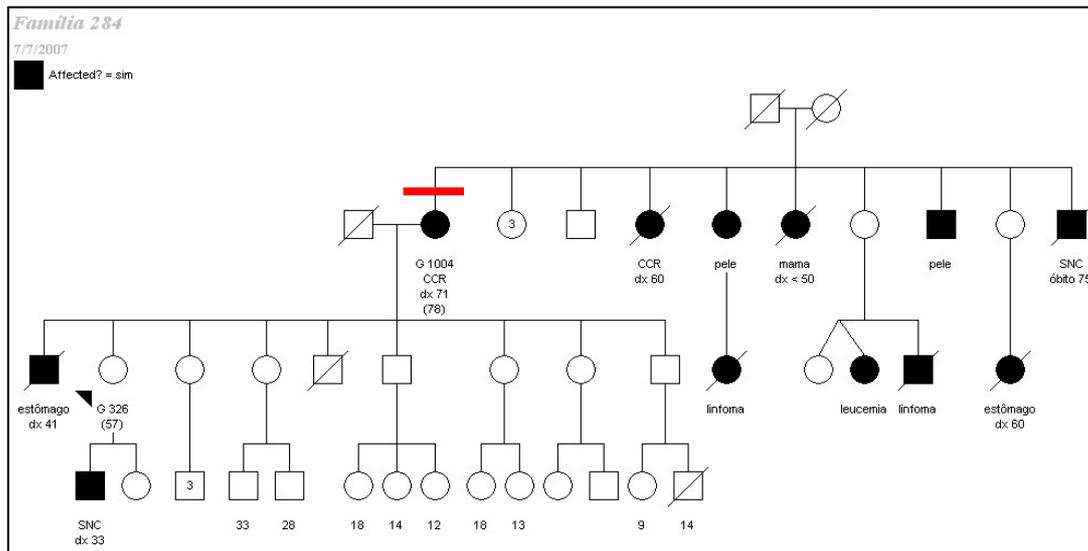
Família 187

7/7/2007

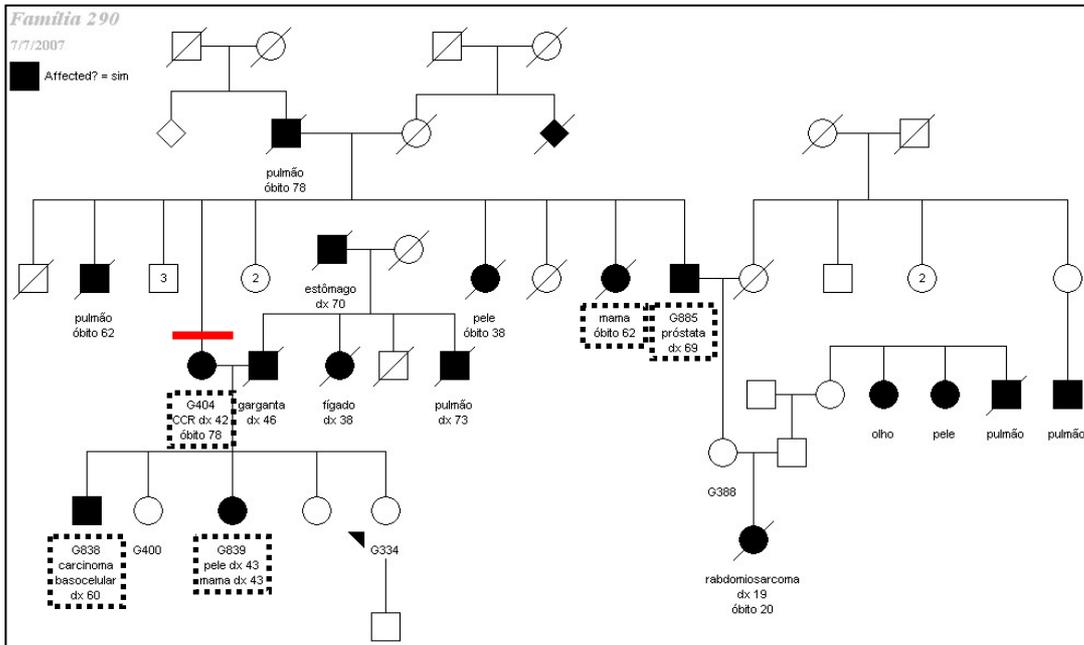
■ Affected? = sim



- Afetado
- ▭ Diagnóstico confirmado
- Individuo testado para mutação germinativa
- ▴ Caso Índice/Probando



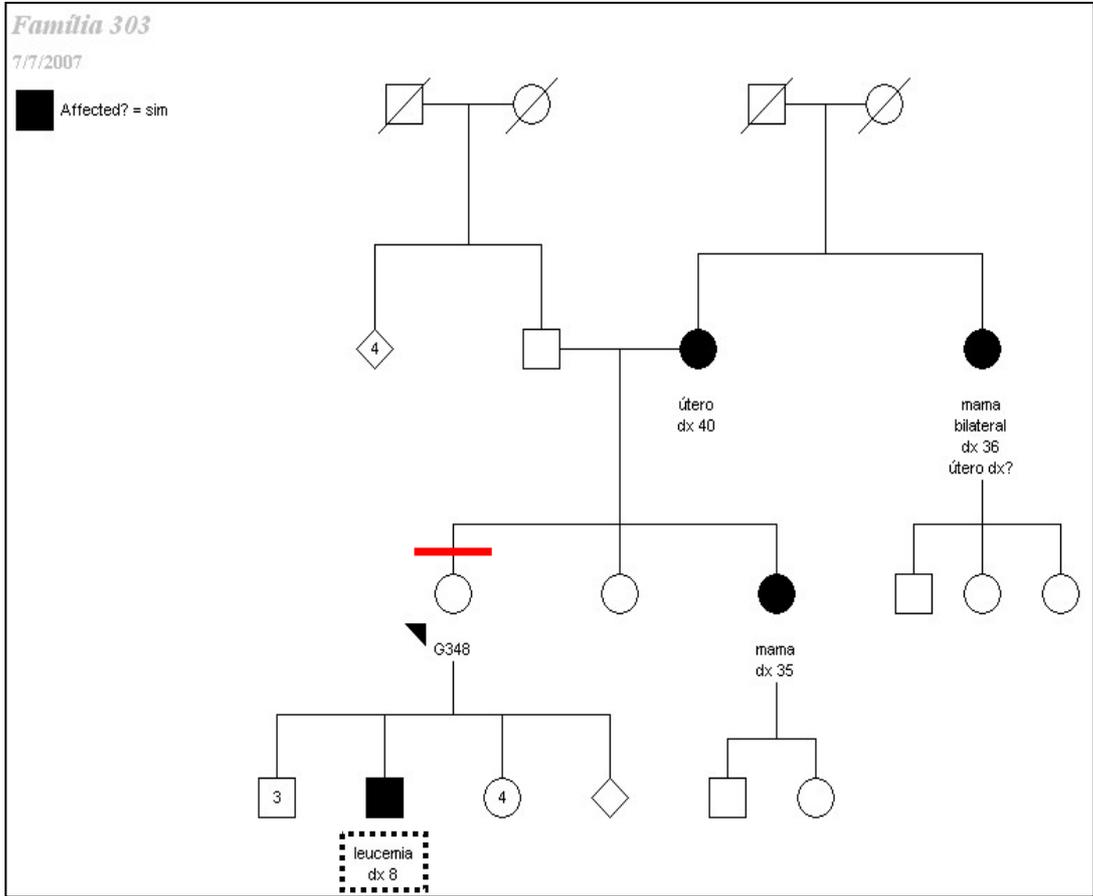
-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando



Família 303

7/7/2007

■ Affected? = sim

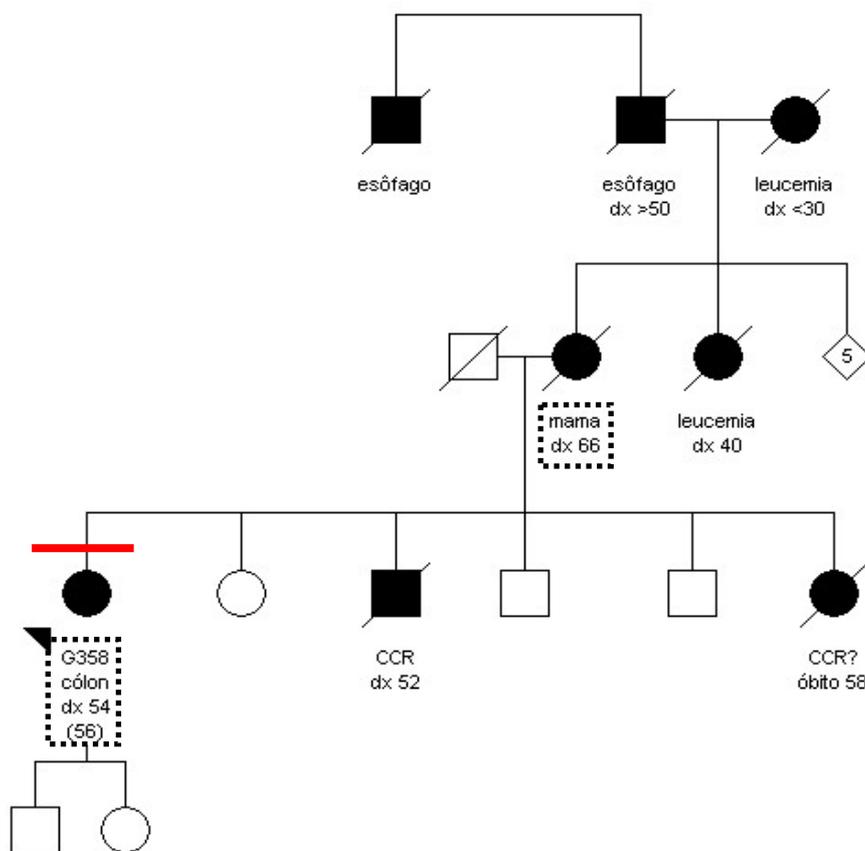


- Afetado
- ▭ Diagnóstico confirmado
- Individuo testado para mutação germinativa
- ▴ Caso Índice/Probando

Família 311

7/7/2007

■ Affected? = sim

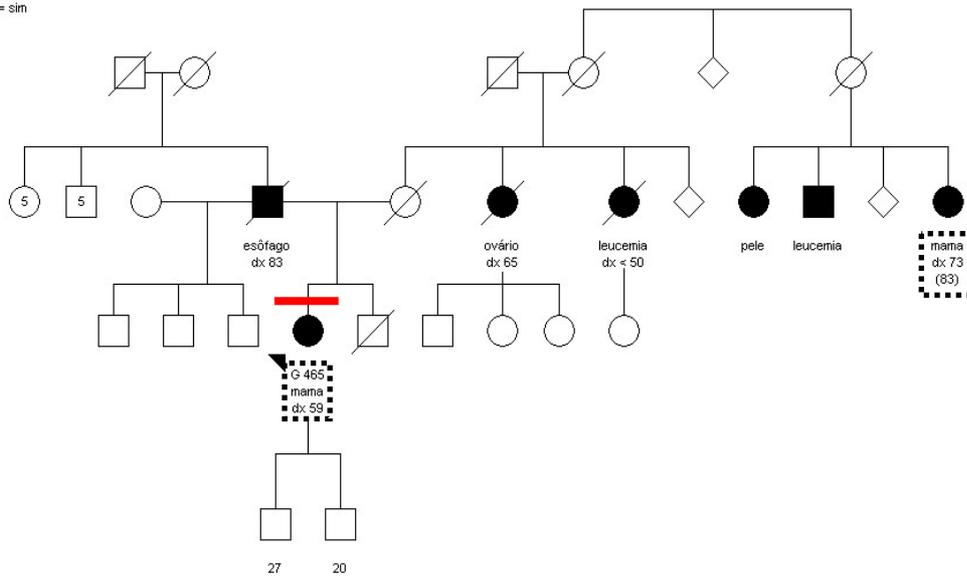


- Afetado
- ▭ Diagnóstico confirmado
- Individuo testado para mutação germinativa
- ▴ Caso Índice/Probando

Família 407

7/7/2007

 Affected? = sim

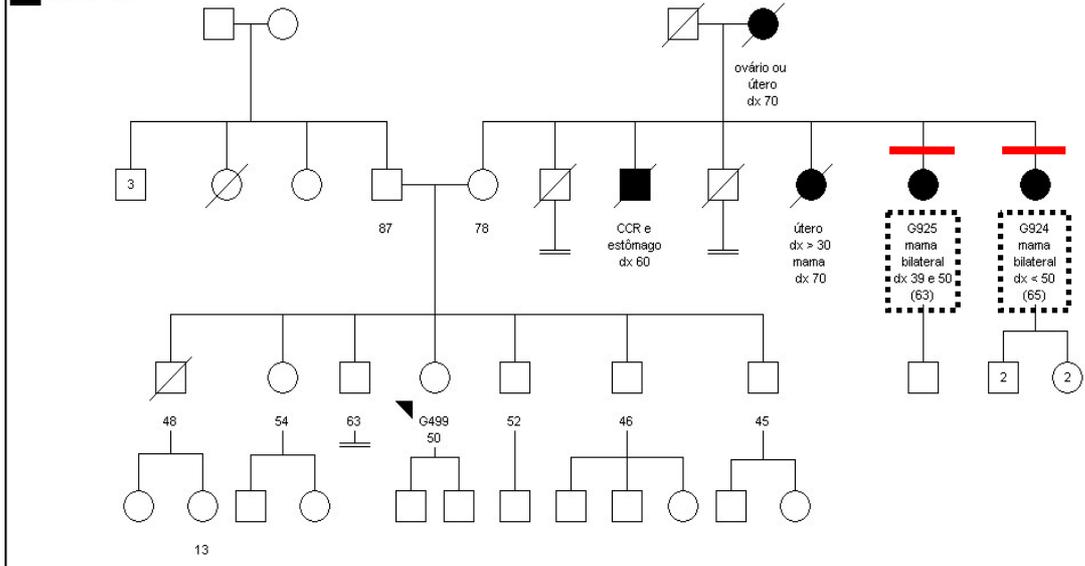


-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando

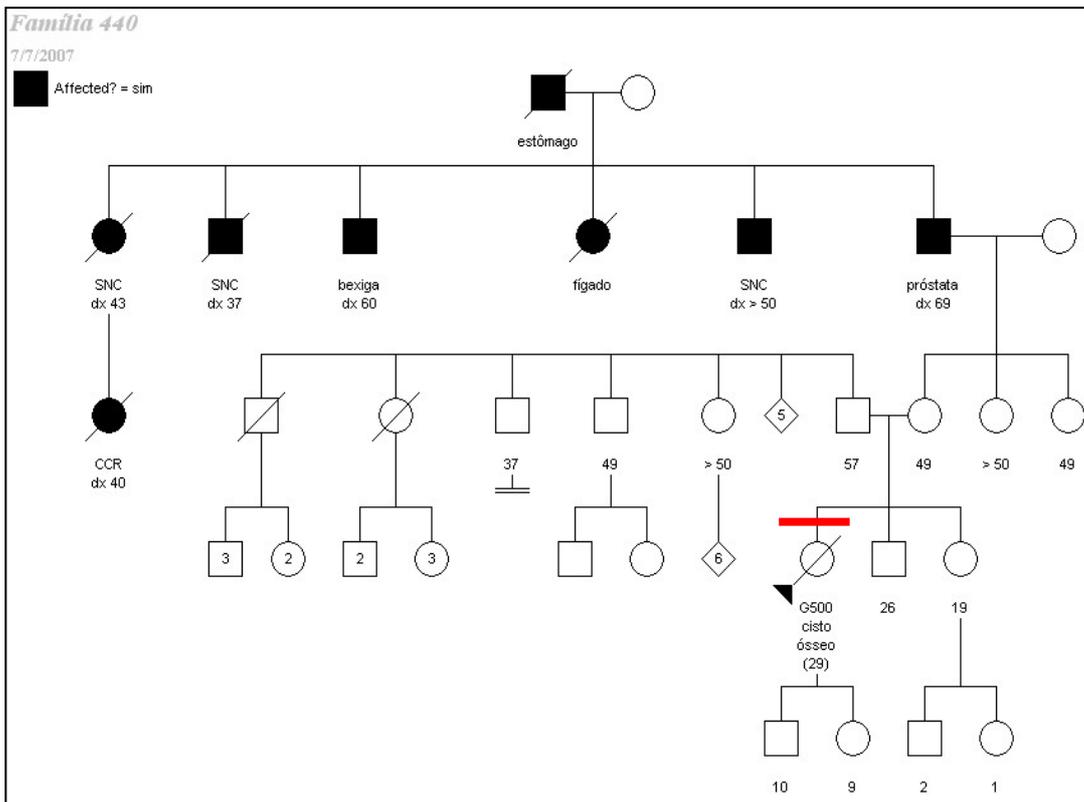
Família 439

7/7/2007

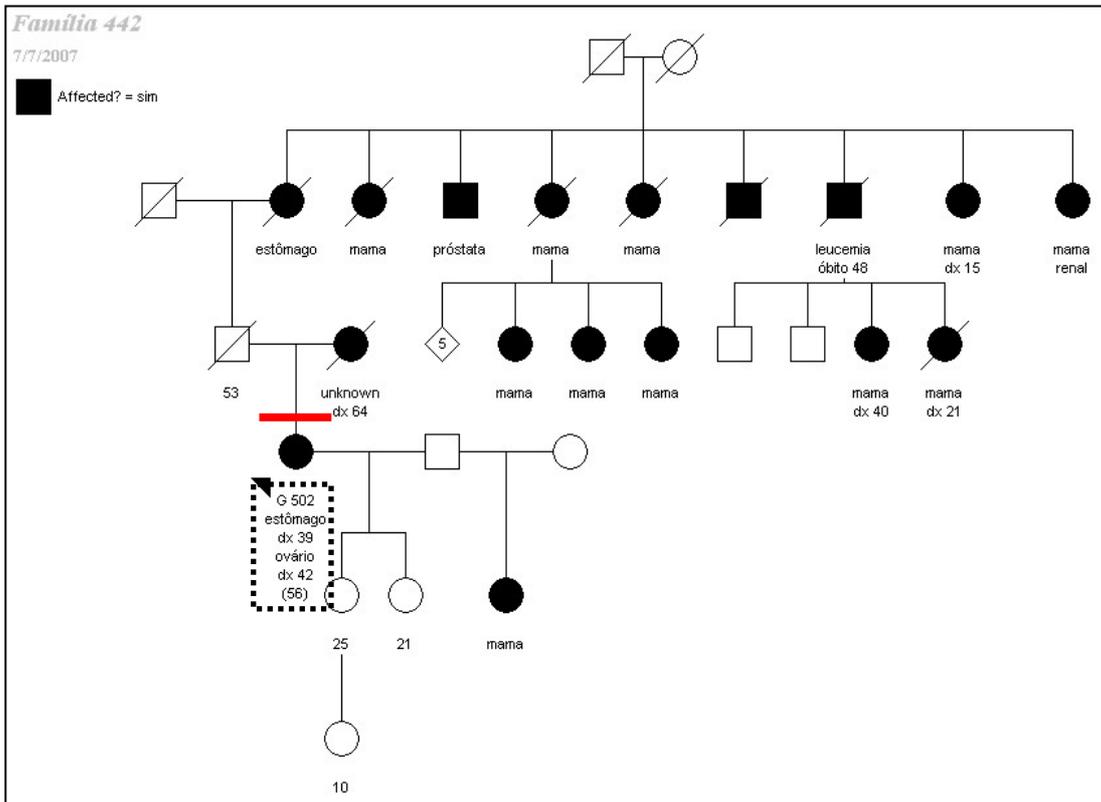
■ Affected? = sim



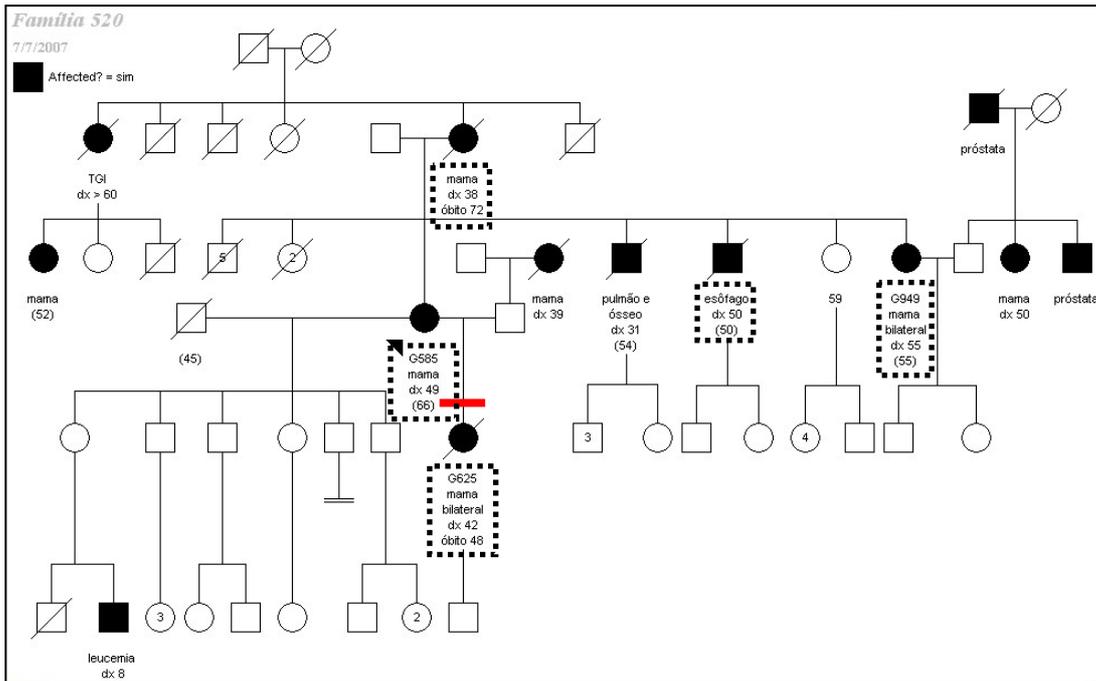
- Afetado
- ⋯** Diagnóstico confirmado
- Indivíduo testado para mutação germinativa
- ◄** Caso Índice/Probando



-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando



- Afetado
- ▭ Diagnóstico confirmado
- ▬ Indivíduo testado para mutação germinativa
- ▴ Caso Índice/Probando

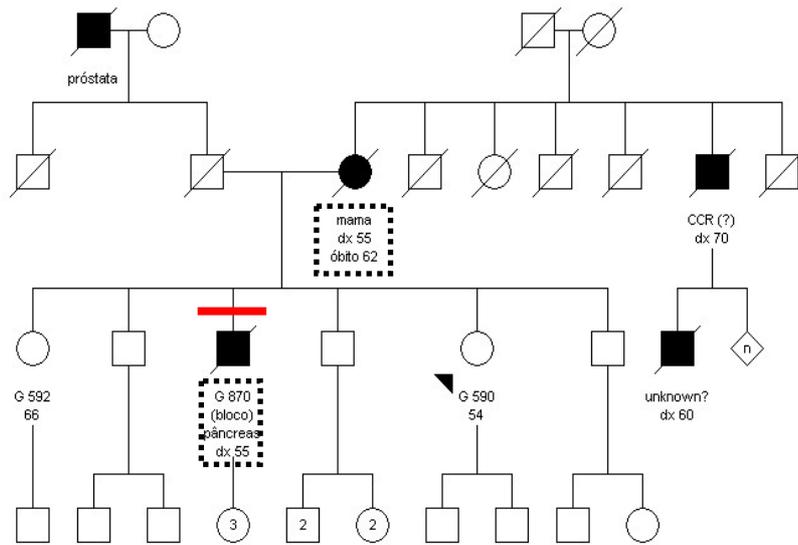


- Afetado
- ▭ (borderado) Diagnóstico confirmado
- (vermelha) Indivíduo testado para mutação germinativa
- ▲ Caso Índice/Probando

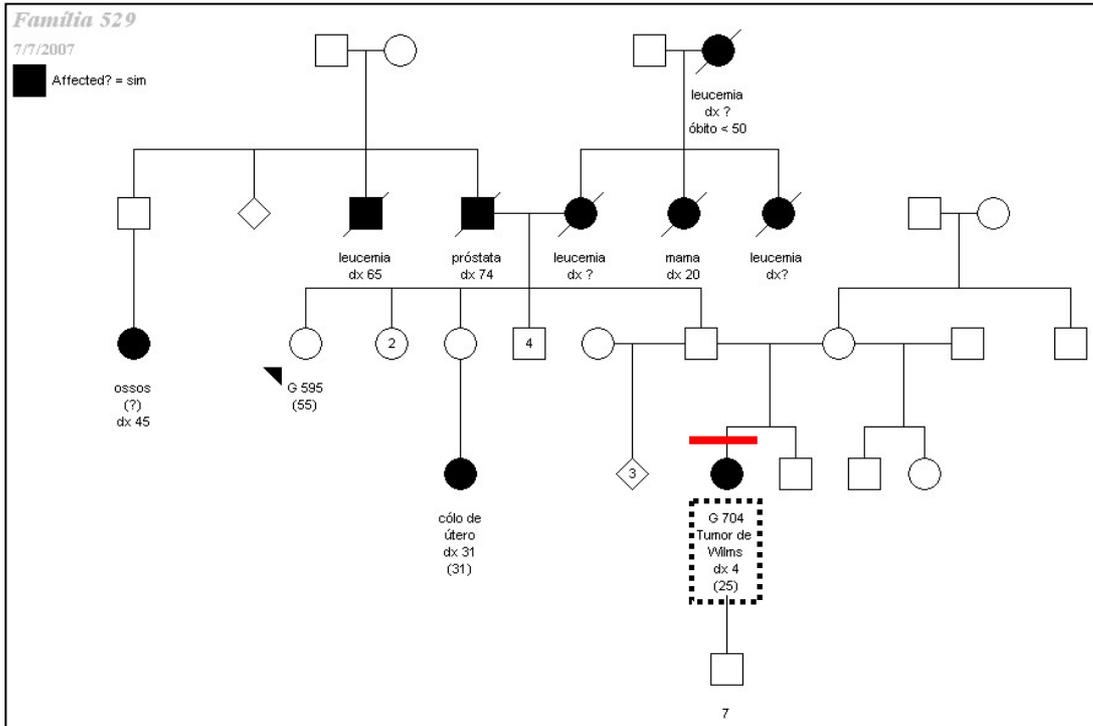
Família 525

7/7/2007

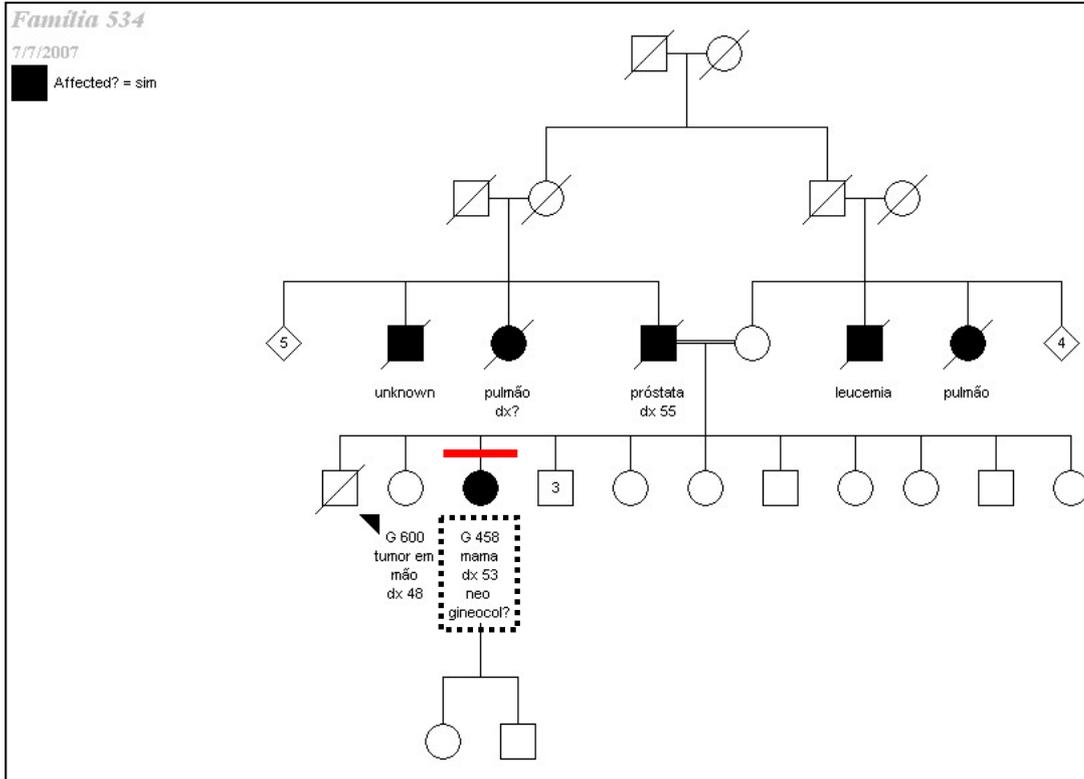
 Affected? = sim



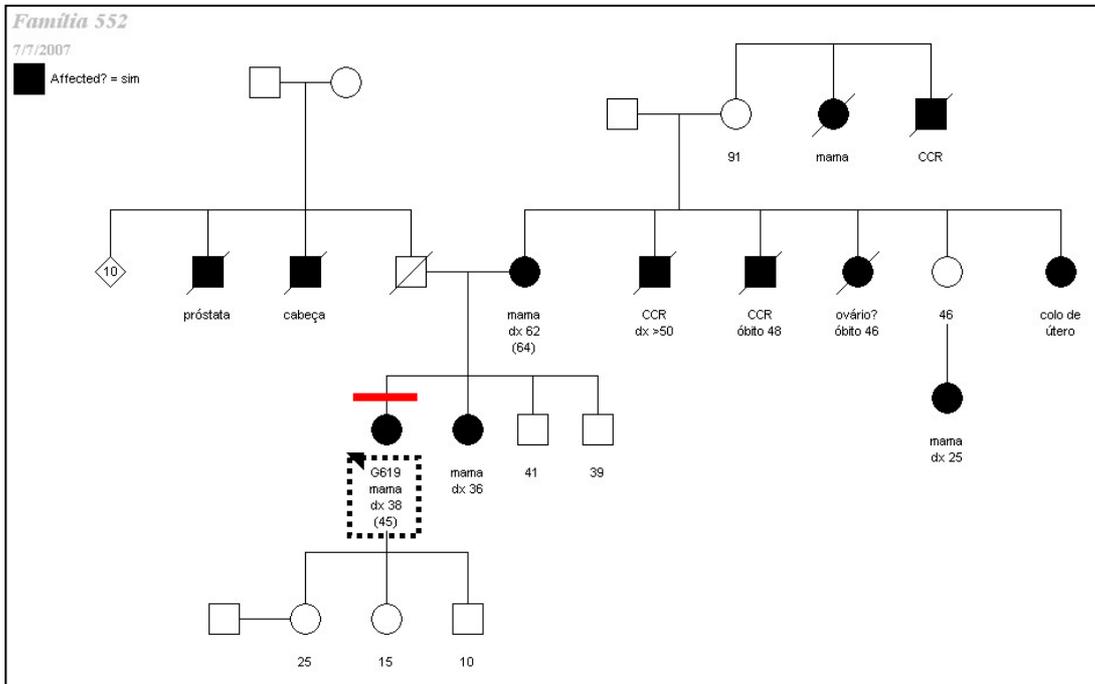
-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando



-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando



- Afetado
- ▭ Diagnóstico confirmado
- Individuo testado para mutação germinativa
- ▴ Caso Índice/Probando

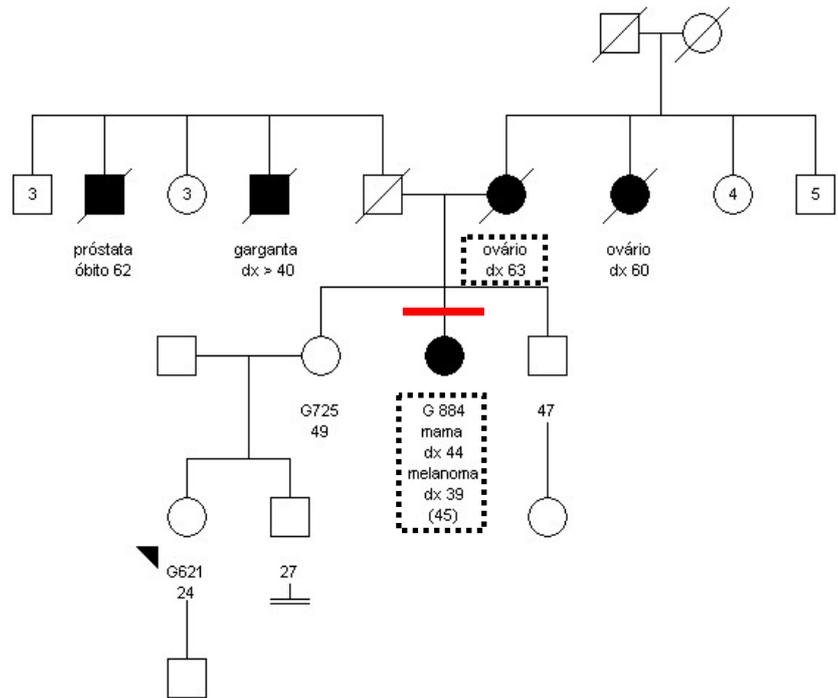


-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando

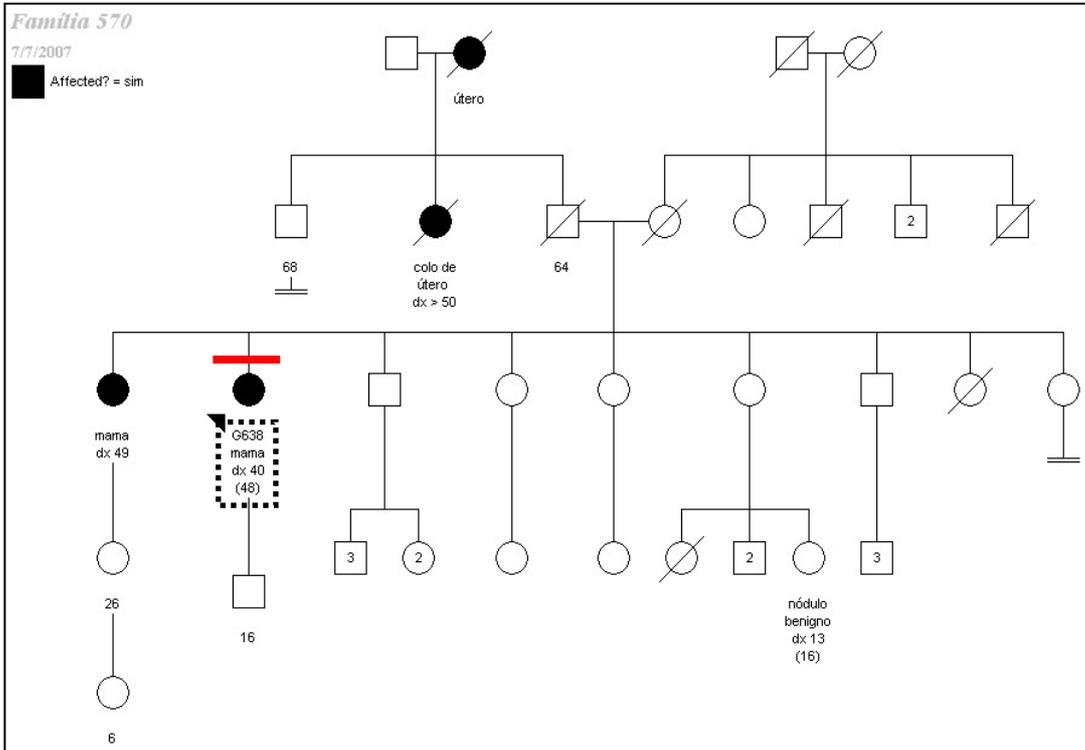
Família 554

7/7/2007

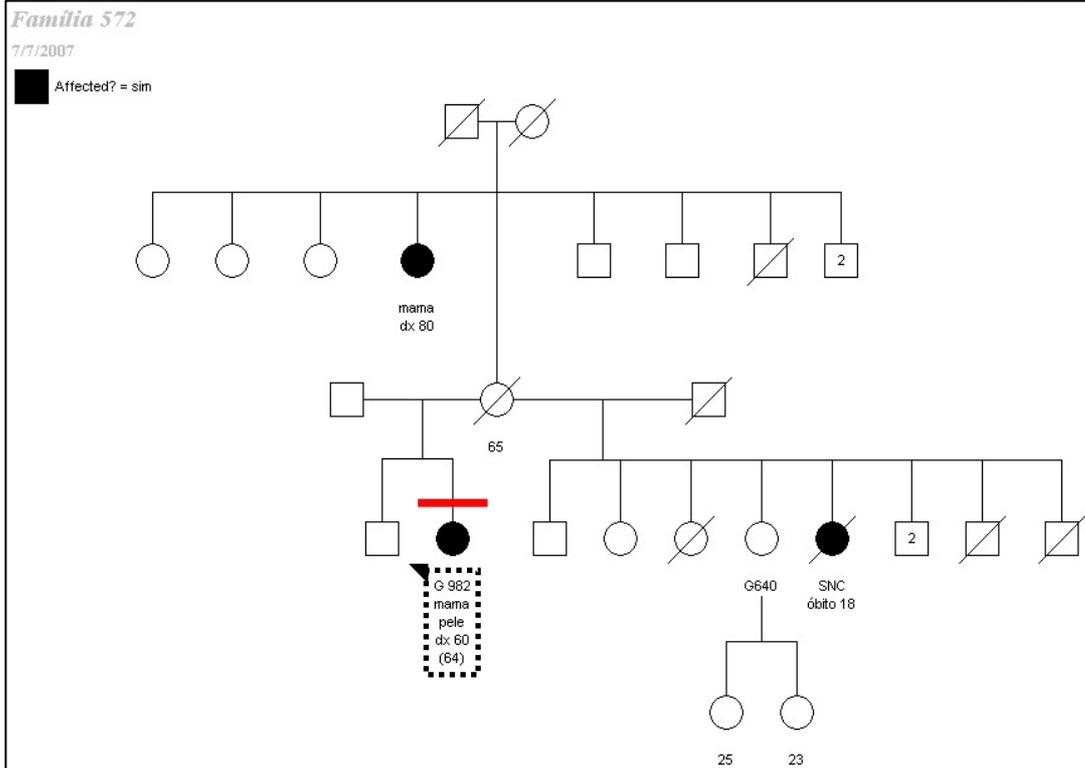
■ Affected? = sim



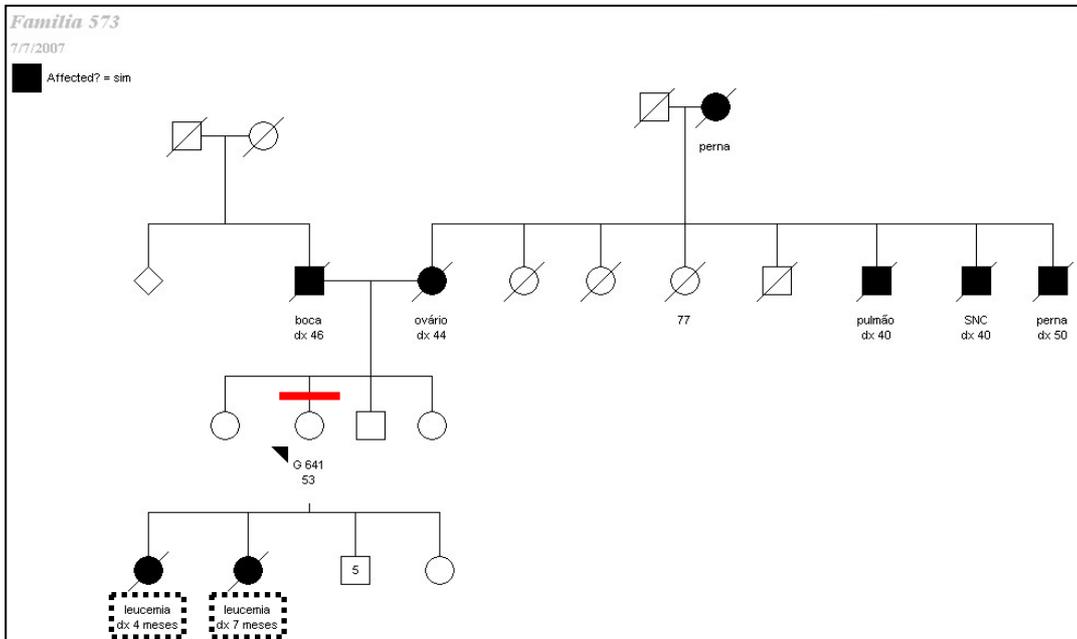
- Afetado
- ▭ Diagonístico confirmado
- Individuo testado para mutação germinativa
- ▼ Caso Índice/Probando



- Afetado
- ▤ Diagnóstico confirmado
- ▬ Indivíduo testado para mutação germinativa
- ◄ Caso Índice/Probando



- Afetado
- ▭ Diagonally split (male) / Circle with diagonal line (female) = Deceased
- ▭ (empty) = Unaffected
- ▭ (dashed) = Diagnóstico confirmado
- (red) = Indivíduo testado para mutação germinativa
- ▴ (black) = Caso Índice/Probando

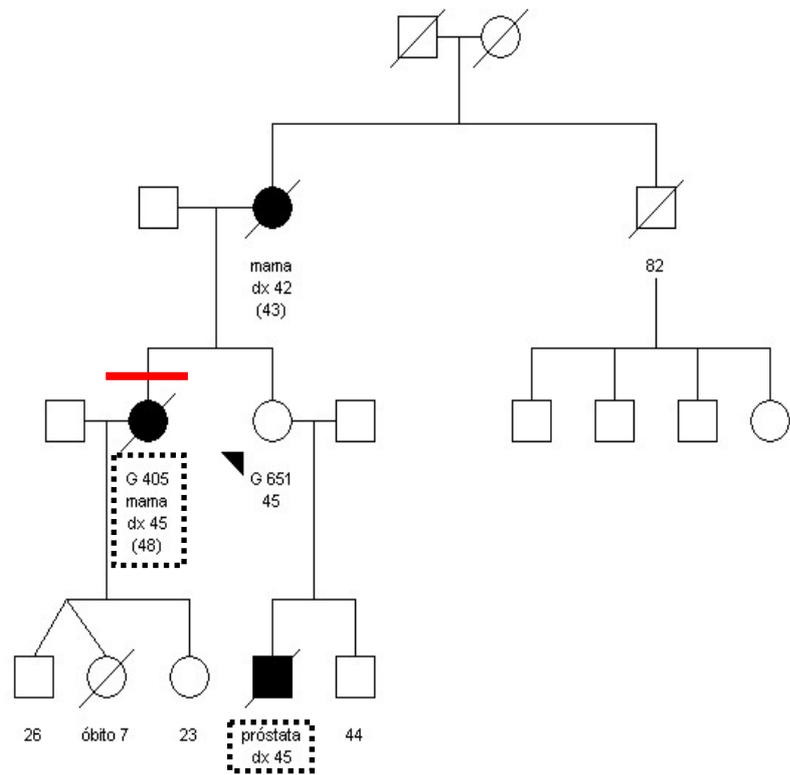


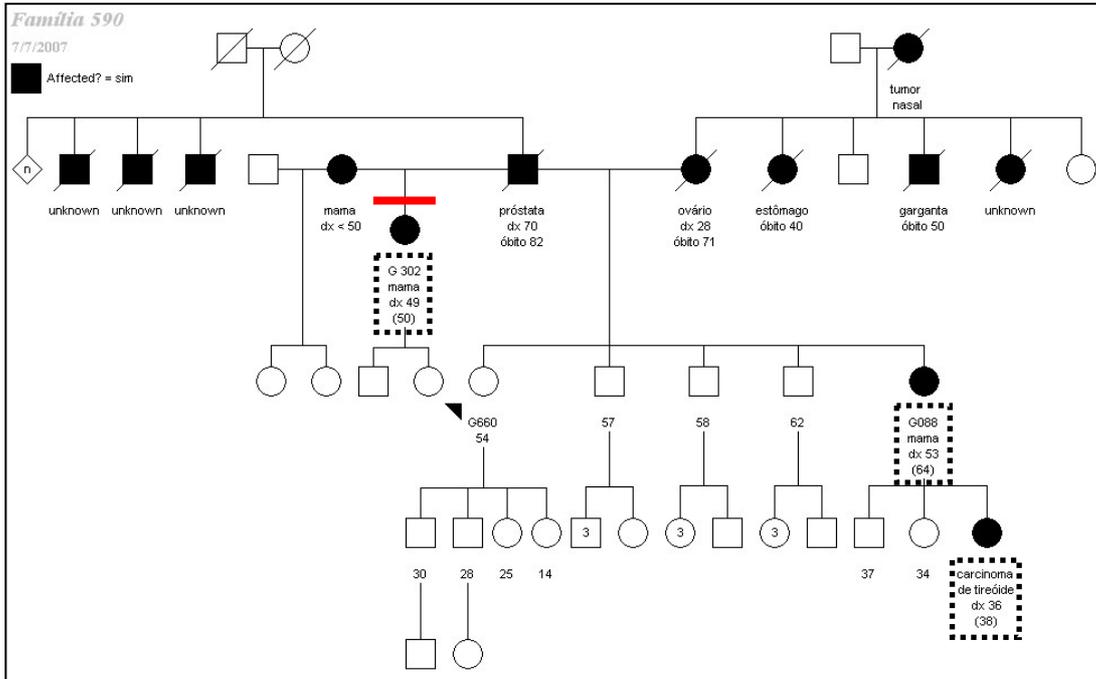
-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando

Família 581

7/7/2007

■ Affected? = sim



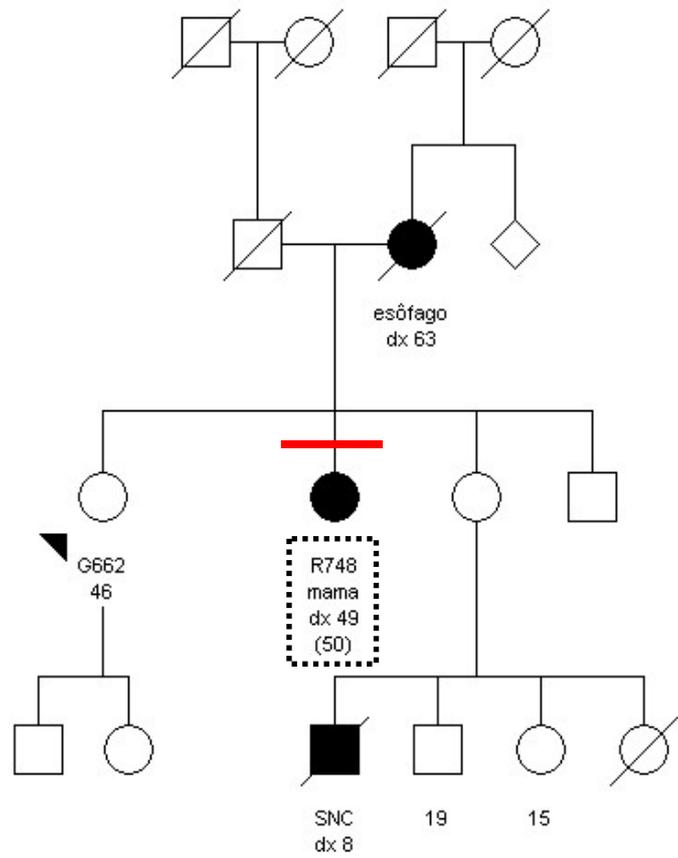


- Afetado
- ▭ (borderado) Diagnóstico confirmado
- ▬ Individuo testado para mutação germinativa
- ▴ Caso Índice/Probando

Família 592

7/7/2007

■ Affected? = sim

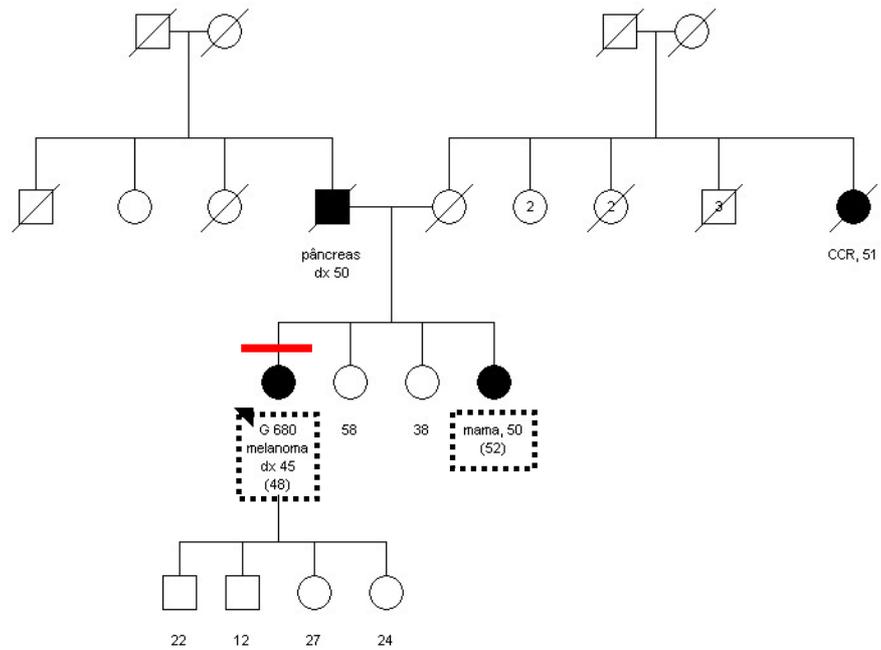


- Afetado
- ▭ Diagnóstico confirmado
- Individuo testado para mutação germinativa
- ▼ Caso Índice/Probando

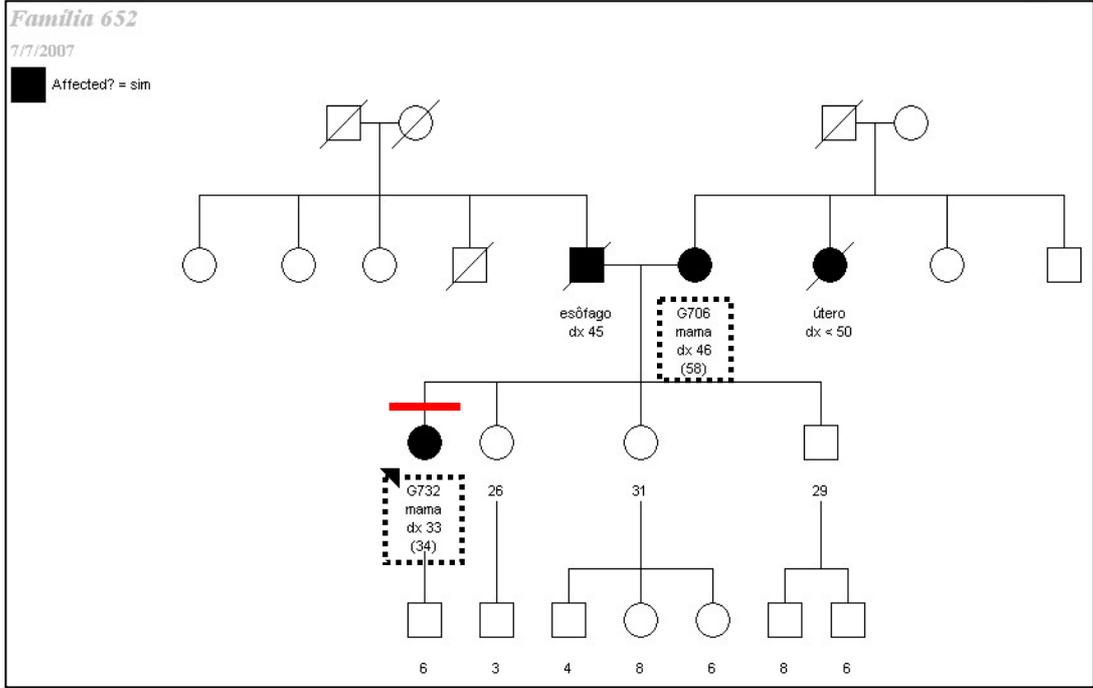
Família 607

9/5/2007

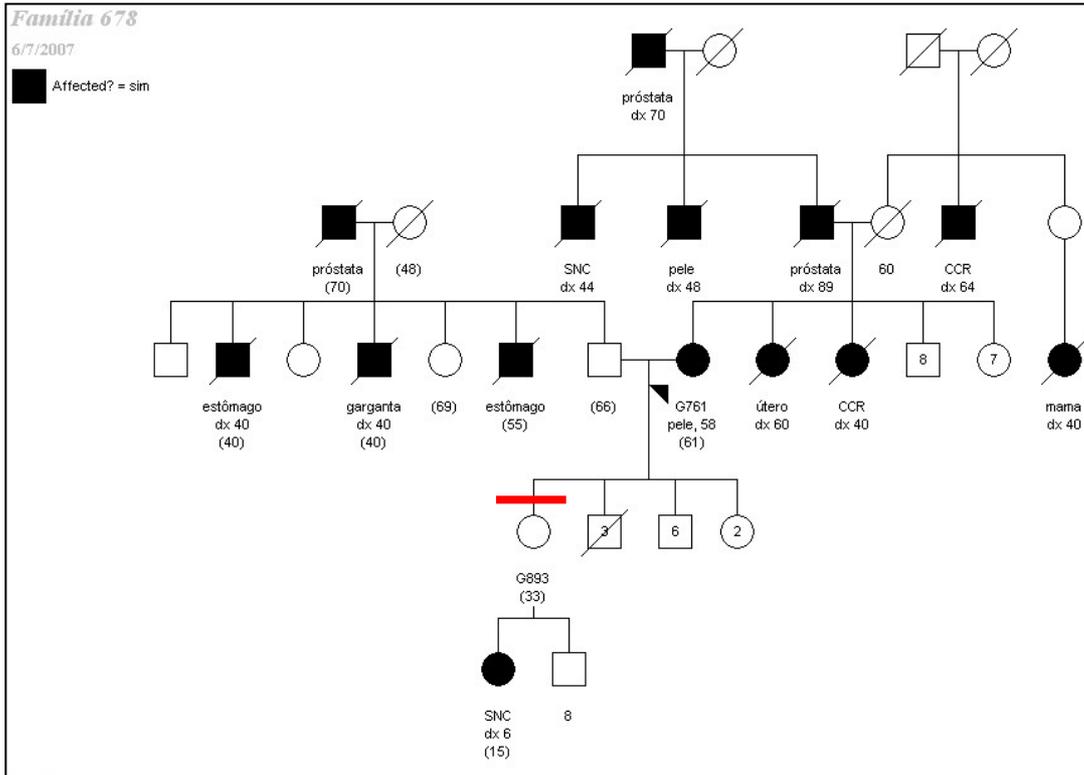
■ Affected? = sim



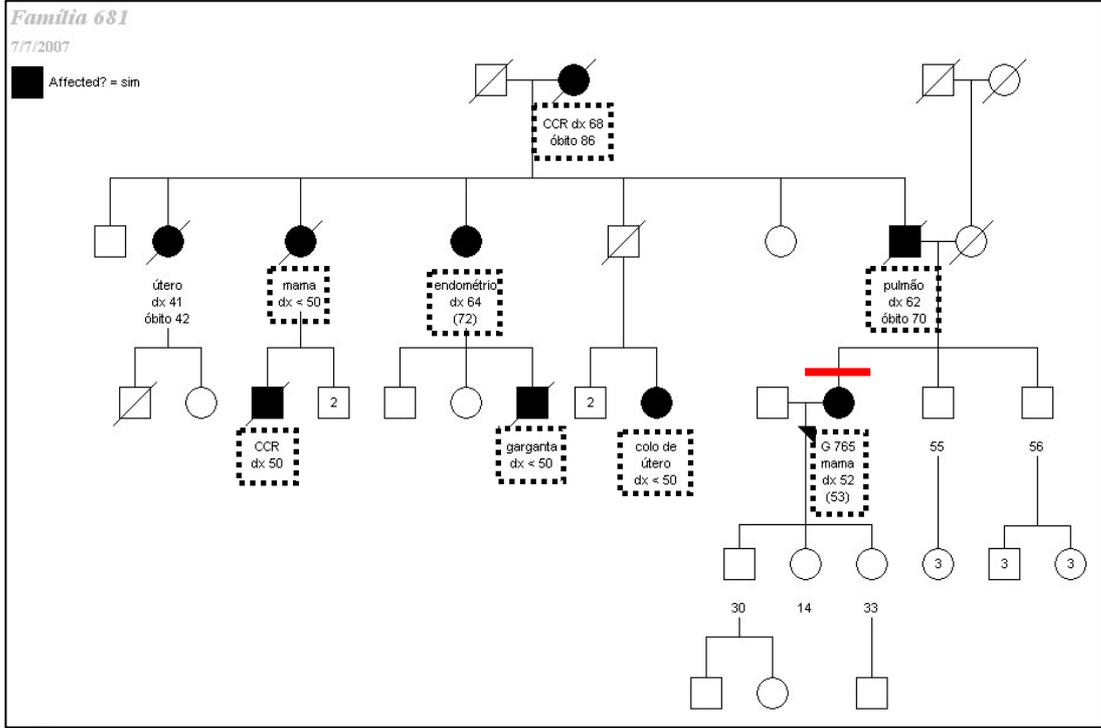
- Afetado
- ▭ Diagnóstico confirmado
- Indivíduo testado para mutação germinativa
- ▴ Caso Índice/Probando



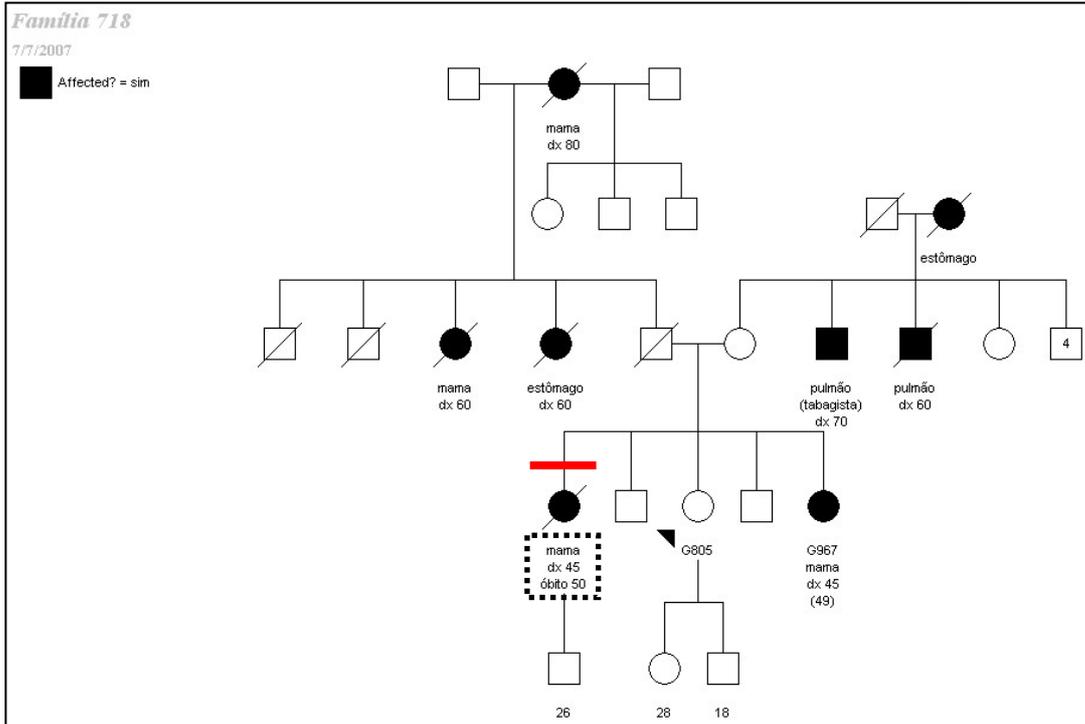
-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando



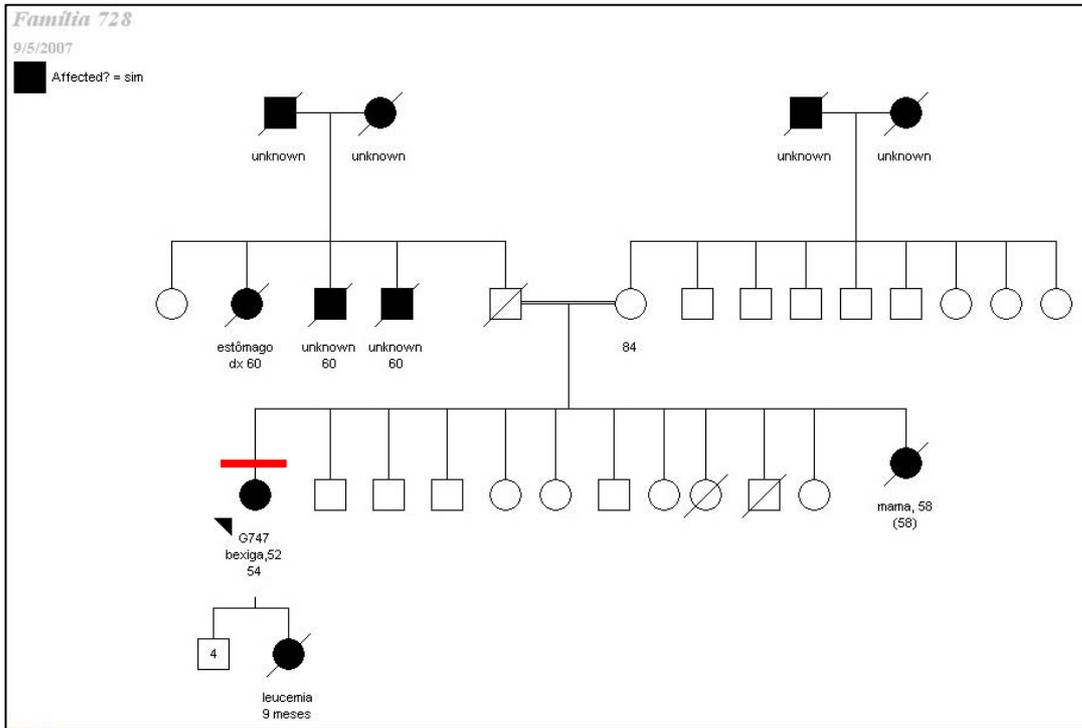
-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando



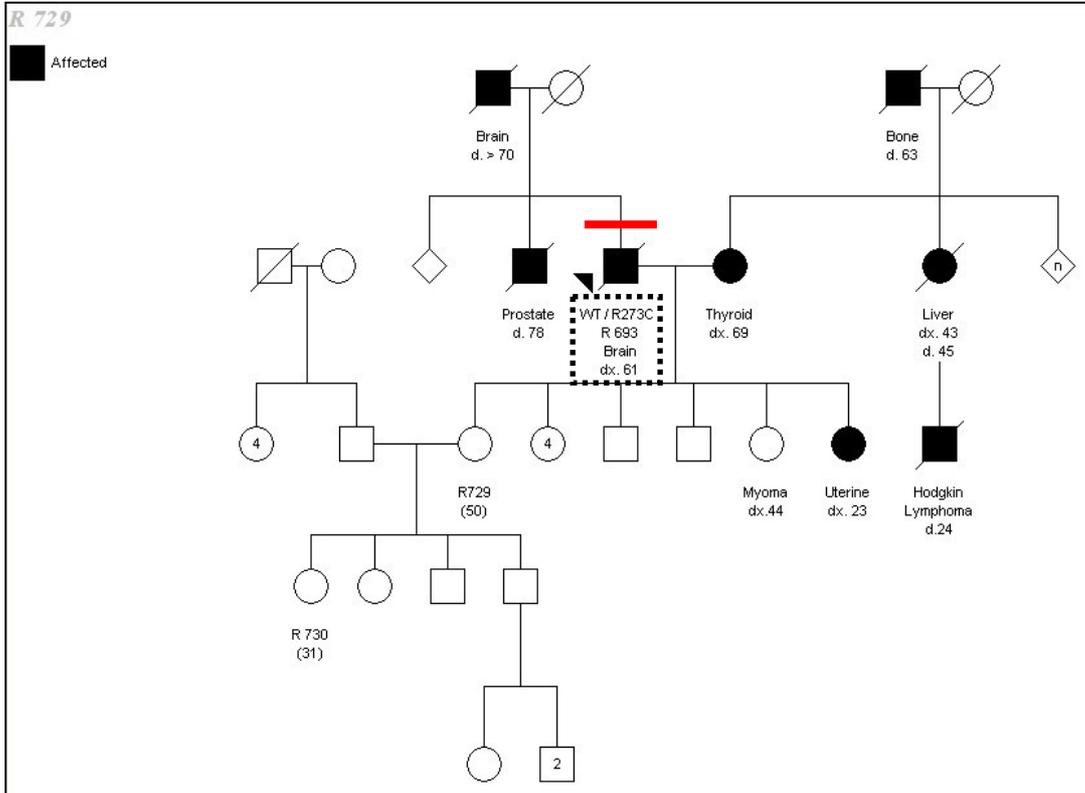
-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando



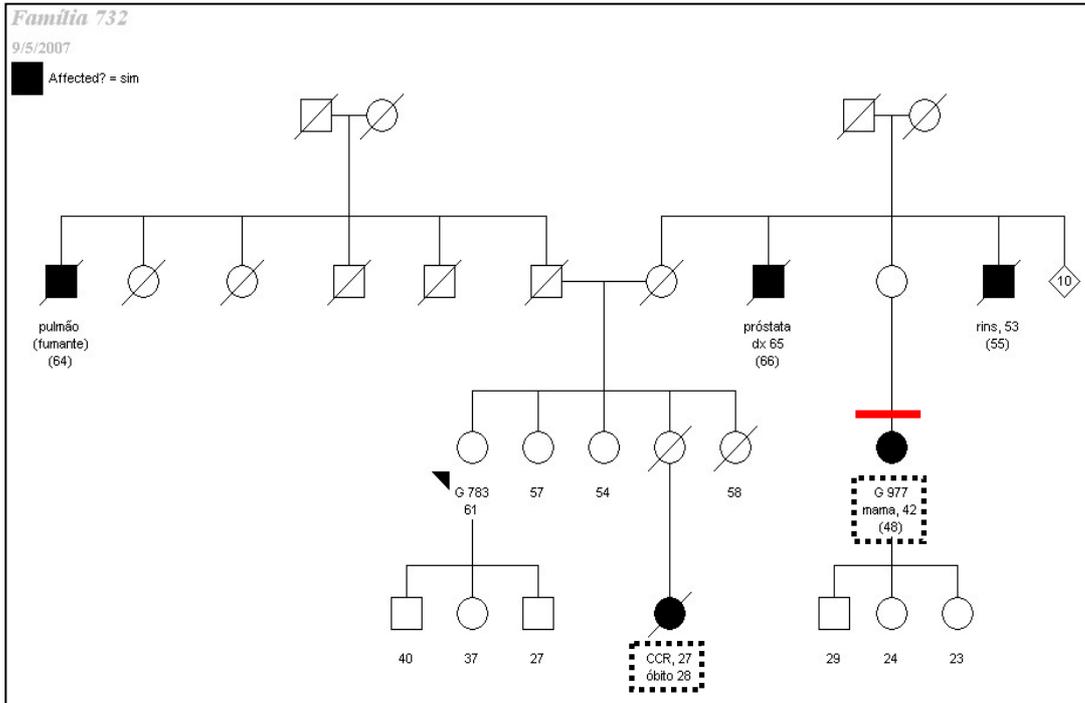
- Afetado
- Diagnóstico confirmado
- Individuo testado para mutação germinativa
- ▼ Caso Índice/Probando



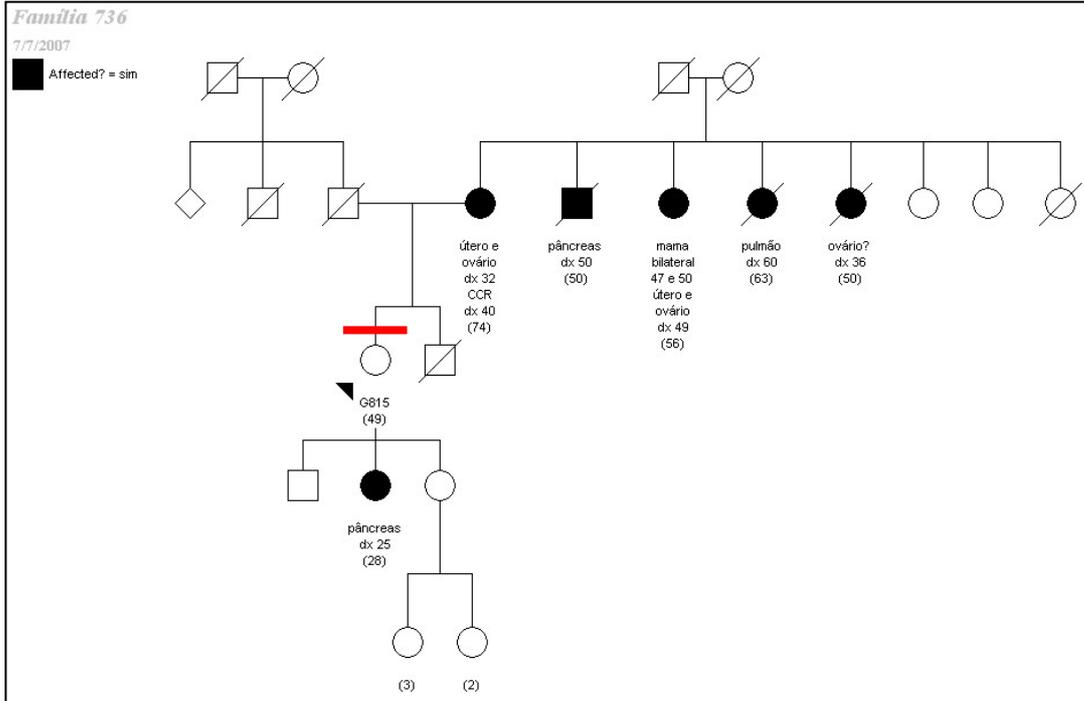
-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando



-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando



- Afetado
- (dotted) Diagnóstico confirmado
- (red) Indivíduo testado para mutação germinativa
- ◄ Caso Índice/Probando

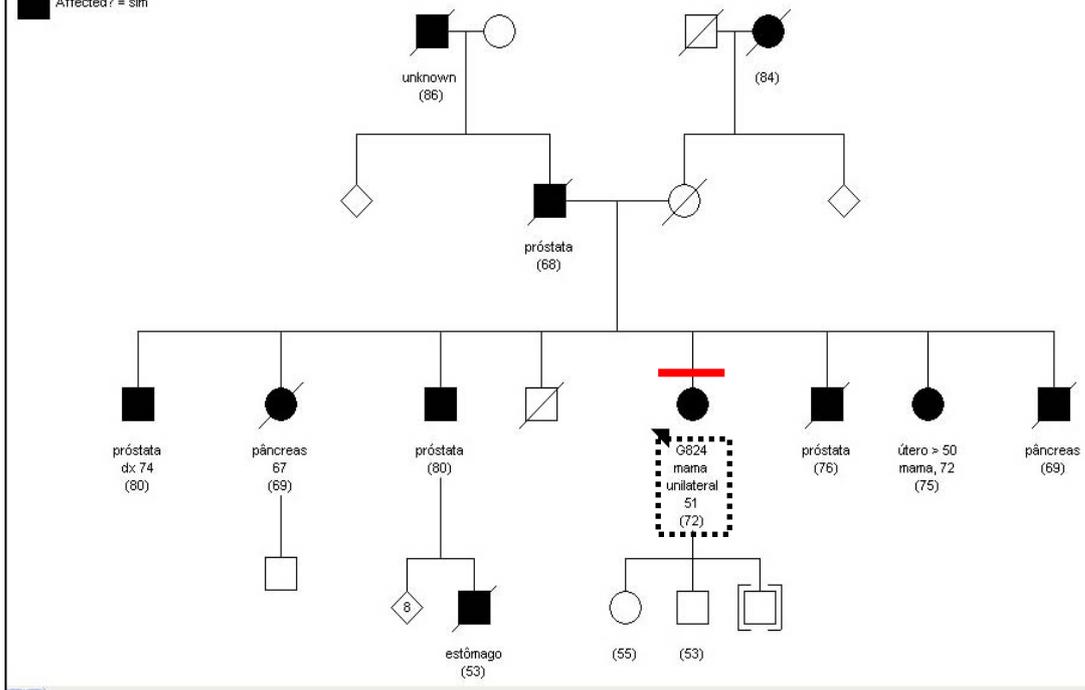


- Afetado
- Diagnóstico confirmado
- Indivíduo testado para mutação germinativa
- ▲ Caso Índice/Probando

Família 743

9/5/2007

■ Affected? = sim

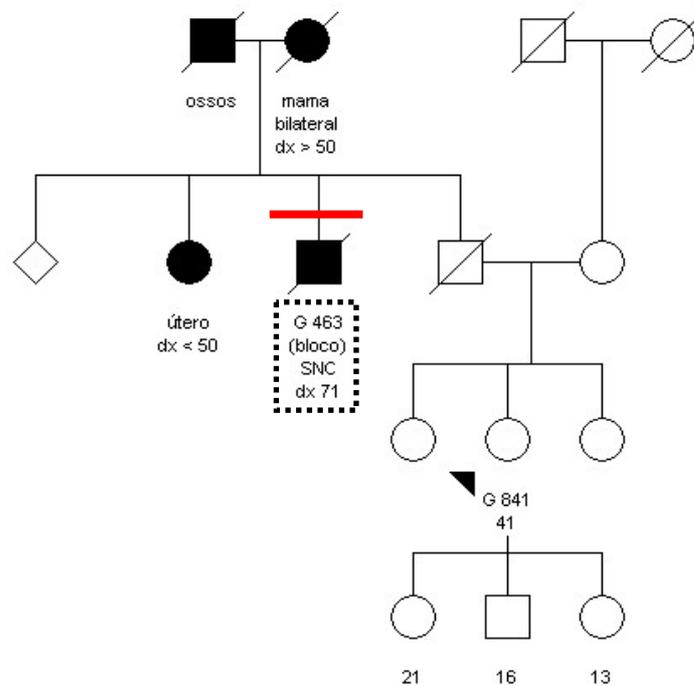


- Afetado
- ▭ Diagnóstico confirmado
- Individuo testado para mutação germinativa
- ▴ Caso Índice/Probando

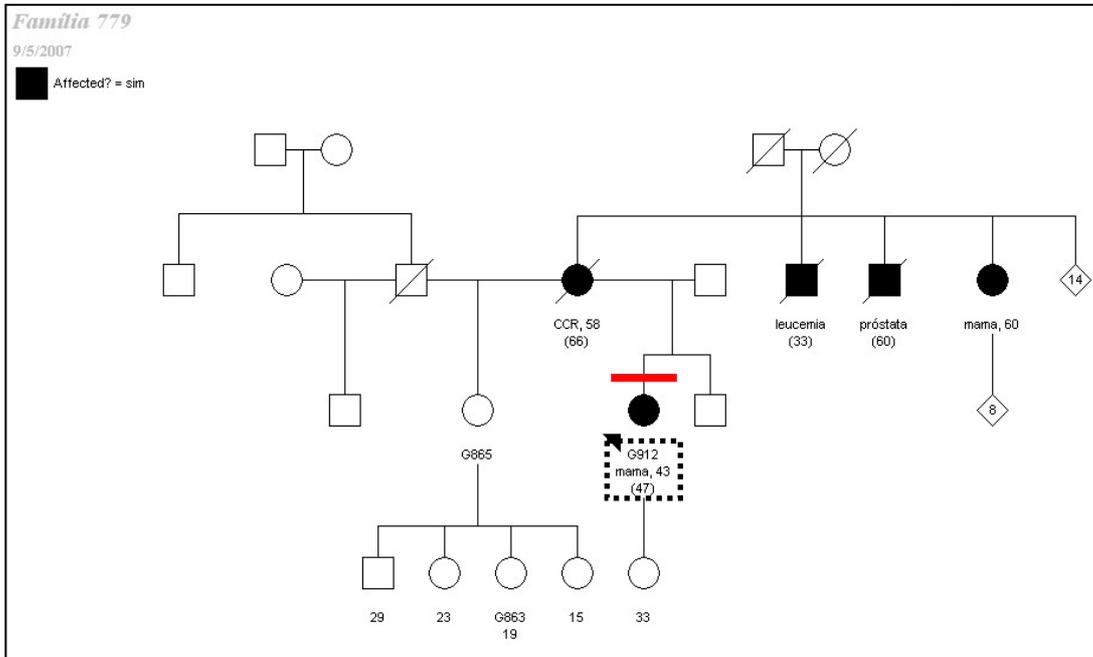
Família 758

6/7/2007

■ Affected? = sim



- Afetado
- Diagonistic confirmado
- Individuo testado para mutação germinativa
- ▼ Caso Índice/Probando

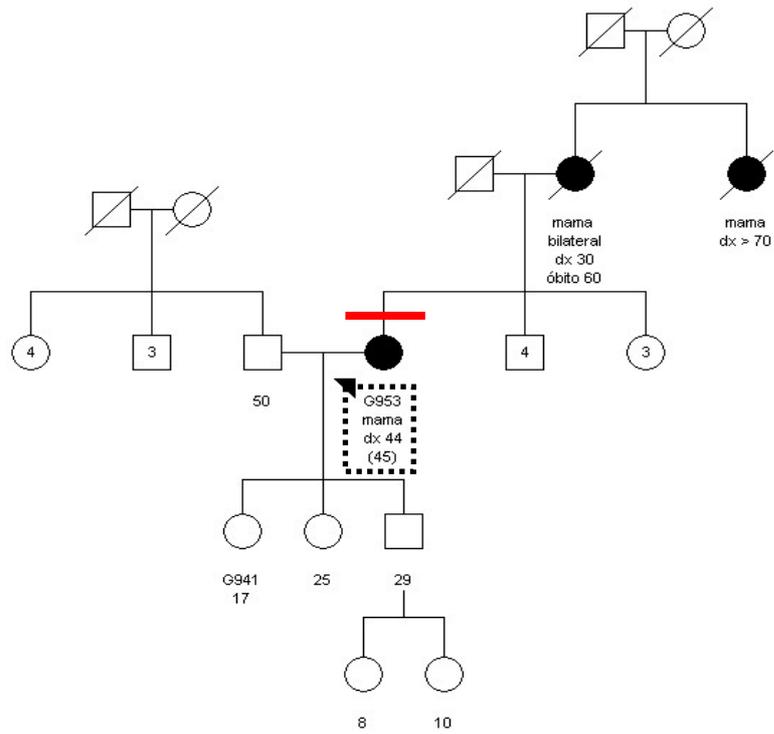


- Afetado
- ▭ Diagnóstico confirmado
- Individuo testado para mutação germinativa
- ▴ Caso Índice/Probando

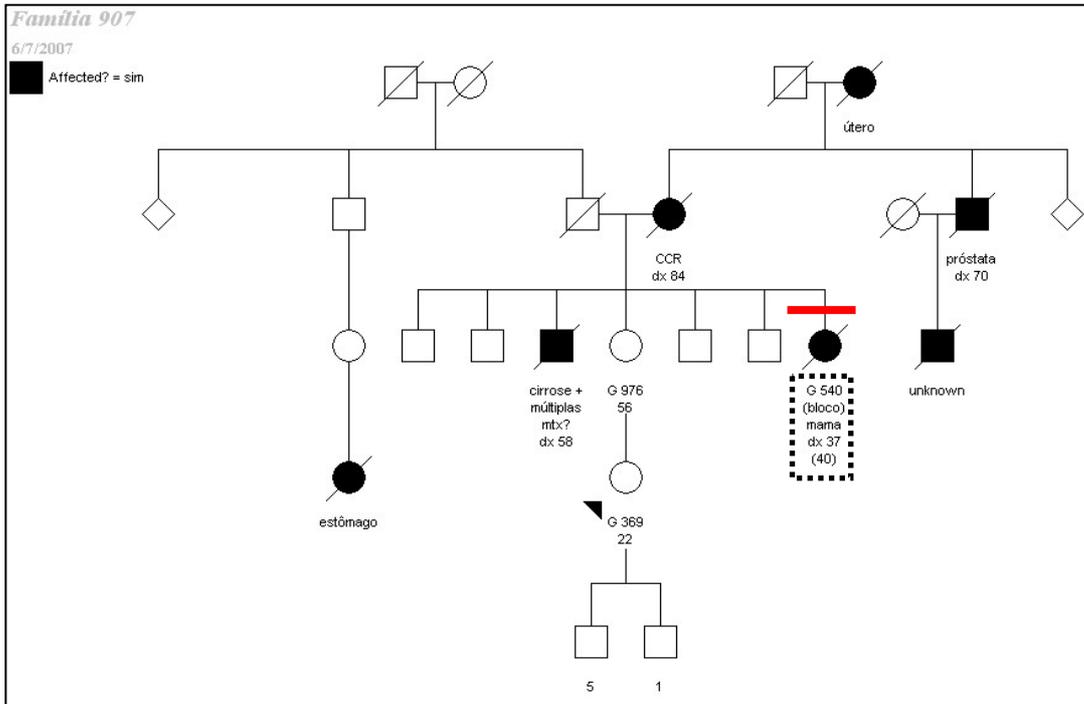
Família 810

7/7/2007

■ Affected? = sim



- Afetado
- ▭ Diagnóstico confirmado
- Individuo testado para mutação germinativa
- ▼ Caso Índice/Probando

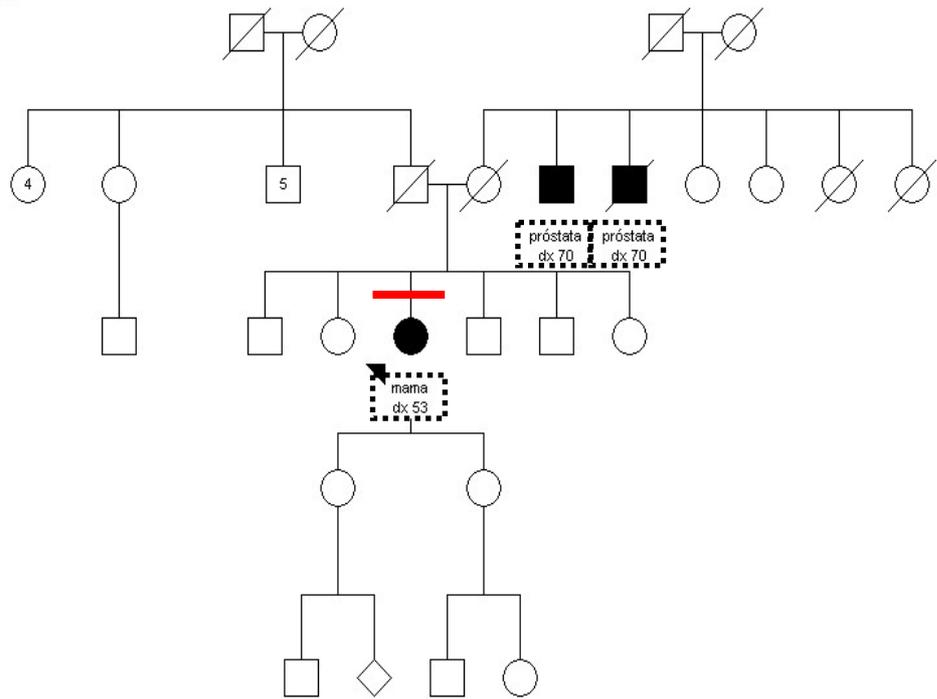


-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando

R 747

8/5/2007

 Affected? = sim



-  Afetado
-  Diagnóstico confirmado
-  Indivíduo testado para mutação germinativa
-  Caso Índice/Probando

12.2.12 Artigo Científico relacionado ao tema (Manuscrito submetido ao *Familial Cancer*)

Inheritance of TP53 mutation and tumour spectrum in Brazilian LFS/LFL families: association with early-onset colorectal cancer

Maria Isabel Waddington Achatz¹, Magali Olivier², Benedito Mauro Rossi³, Edenir Inez Palmero⁴, Maira Caleffi⁵, Fernanda Lenara Roth⁶, Pierre Hainaut², Patricia Ashton-Prolla^{4,6}

Addresses

1. Dept Oncogenetica, Hospital do Câncer A. C. Camargo, Sao Paulo, Brazil
2. Molecular Carcinogenesis Group, International Agency for Research on Cancer, 150 cours Albert Thomas, 69372 Lyon cedex 08, France
3. Department of Pelvic Surgery, Hospital AC Camargo, Sao Paulo, Brazil
4. Hospital das Clinicas, Porto Alegre, Brazil
5. Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil
6. Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Correspondence to: Maria Isabel Waddington Achatz,
Dept Oncogenetica, Hospital do Câncer A. C. Camargo, Rua Professor Antonio Prudente
211 – Sao Paulo, Brazil – CEP 01509010
Email: miachatz@hcancer.org.br

Word count: 974

Keywords: TP53, p53, mutations, Li-Fraumeni syndrome, colorectal cancer

Abstract

Tumor patterns in families with Li-Fraumeni (LFS) or Li-Fraumeni-like (LFL) syndromes remain unclear. We describe tumor patterns of 338 patients diagnosed among 45 Brazilian families matching commonly accepted LFS/LFL definitions. The most common tumors were breast carcinomas, soft tissue sarcomas and tumors of central nervous system, followed by gastric and colorectal cancers. The latter cancers represented 6.7% and 5.9% of all cases. Age at diagnosis for CRC was 32.4 in TP53 mutation carriers versus 51.6 in non-carriers. Thus, CRC should be considered as part of the LFS/LFL cancer spectrum and screening should be included in surveillance protocols.

Li-Fraumeni syndrome (LFS; MIM# 151623) is an autosomal dominant disorder of predisposition to multiple cancers. The underlying genetic defect is germline mutation in the TP53 tumor suppressor (MIM# 191170). Classic LFS is defined by a proband with sarcoma diagnosed before the age of 45, associated with a tumor before 45 years in a first-degree relative, and another tumor before 45 years or a sarcoma at any age in a close relative. Most frequent cancers in LFS are sarcomas, breast cancers, brain tumors and adrenocortical carcinomas (ADR). Additional tumors described in some LFS families include leukemia, melanoma, lung, gastric, colorectal, and prostate cancers as well as germ cell tumors, choroid plexus papillomas, and Wilms' tumors. [1] Some families present a tumor pattern reminiscent of LFS without matching classical criteria and are termed Li-Fraumeni like (LFL). Several definitions of LFL have been proposed (LFL-E1 and LFL-E2, LFL-B). [2;3] However, the spectrum and frequency of tumors associated with germline *TP53* mutations are uncertain. In 2001, Birch et al. assessed the frequency of cancers in *TP53* mutation carriers and used cancer statistics from the United Kingdom (U.K.) to assess the excess of cancer risk associated with inheritance of *TP53* mutation. [4] They showed that although breast carcinomas, sarcomas and brain tumors were most frequent, the greatest increase relative to general population rates were in rare tumors, ADR and phyllodes tumors. Thus, *TP53* mutation does not simply increase general cancer risk but exert some tissue specific effects.

In this study, we describe the tumor spectrum of 338 patients diagnosed with cancer among 45 families that match at least one of the accepted LFS or LFL definitions (LFL-E1, LFL-E2 or LFL-B), recruited in a high-cancer risk clinic within a protocol approved by local ethics committees (Fundacao Antonio Prudente, CONEP). Blood was obtained from probands for *TP53* mutation analysis by sequencing as described previously. [5] Information on cancer occurrence in the family was obtained by structured interview and ascertained using hospital records. Table 1 shows the 119 tumors detected in patients from families in which the proband had an identified germline mutations and the 219 tumors from families without *TP53* mutations.

Table 1: Spectrum and mean age at diagnosis of tumors in 45 Brazilian Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like families.

Tumors	Cases with germline mutation		Cases without germline	
	n (%)	Age at diagnosis	n (%)	Age at diagnosis
Total (338)	119 (35.2%)		219 (64.8%)	
Breast*	33 (27.7%)	43,5	39 (17.8%)	44,9
Central nervous system*	13 (10.9%)	19	13 (5.9%)	32
Soft tissue sarcoma*	10 (8.4%)	30,1	27 (12.3%)	31,8
Gastric*	8 (6.7%)	55,6	22 (10.0%)	51,6
Adrenocortical	8 (6.7%)	14,7	0	N/A
Colorectal*	7 (5.9%)	32,4	14 (6.4%)	51,6
Lung*	7 (5.9%)	55,9	8 (3.7%)	46,6
Prostate*	4 (3.4%)	64,5	12 (3,5%)	72
Renal	4 (3.4%)	20,7	0	N/A
Esophagus*	3 (2,5%)	53	6 (2,7%)	68,3
Head and neck*	3 (2,5%)	54,5	6 (2,7%)	48,8
Liver*	3 (2,5%)	39	4 (1.8%)	60,5
Ampulla of Vater	2 (1.7%)	49,5	0	N/A
Thyroid	2 (1.7%)	41,5	4 (1,8%)	58
Leukemia/ Lymphoma*	2 (1.7%)	45	19(8.6%)	33,2
Female genital tract*	2 (1.7%)	59,7	11 (3,2%)	54,2
Non-melanoma skin cancer*	1 (0.8%)	58	10 (2,9%)	48,7
Bone sarcoma*	1 (0.8%)	N/A	8 (3.6%)	17,3
Melanoma	1 (0.8%)	80	6 (2,7%)	47
Pancreas*	1 (0.8%)	58	5(2.3%)	47,5
Bladder*	0	N/A	3 (1.4%)	54
Wilms´	0	N/A	1(0.4%)	1
Bone	1 (0.8%)	21	0	N/A
Hidatyform mole	0	23	1 (0,4%)	N/A
Unknown	3 (2,5%)	N/A	0	N/A

Key:; N/A: not applicable; * the exact age at diagnosis was unknown in one to three tumors in the group, thus not included in the average.

Consistent with Birch et al. (2001), breast carcinomas, soft tissue sarcomas and brain tumors were the three most common diagnoses. However, the prevalence of other cancers showed important differences with the UK series. In the latter series, the 4th and 5th diagnoses were osteosarcomas and lung carcinomas, each representing 6.7% of the total,

whereas gastric cancer was 6th (4.7%) and colon cancer, 14th (1.3%). In Brazilian families with *TP53* mutations, the 4th and 6th diagnoses were gastric and colorectal cancers, representing respectively 6.7% and 5.9% of all diagnoses. These two cancers were also common in families without germline mutations, corresponding to the 3rd and 4th diagnoses. In contrast, osteosarcomas were rare, with only 0.8% of diagnoses in families with *TP53* mutations (3.6% in families without mutations). The strongest association with *TP53* mutation was observed for ADR and renal cancers, which were diagnosed solely in *TP53* germline mutation carriers, representing 6.7% and 3.4% of all diagnoses.

The low prevalence of bone sarcomas in the Brazilian series may be due to under diagnosis due to late presentation, rapid progression, and reliance upon imaging techniques that were not readily accessible in many centers in Brazil. The high proportion of gastric cancer is correlated with the fact that this cancer is frequent in Brazil, with incidences (2006) of 16,3:100.000 in males and 8,7:100.000 in females (<http://www.inca.gov.br>). A total of 21 cases of CRC were diagnosed in 15 of the 45 families (33.3%), including 5/13 (38%) families with and 10/32 (31%) families without detected *TP53* mutation. The age at diagnosis in *TP53* mutation carriers was lower than in families without mutation (31 vs 51.6 years). This observation argues in favor of an association between inheritance of *TP53* mutation and early occurrence of CRC.

Further evidence for association between LFS/LFL and CRC comes from a survey of a community-based, breast cancer- risk cohort in Porto-Alegre, Southern Brazil. Among 9233 recruited subjects, 74 families matching LFL criteria were identified, including 64 matching LFL-E1/E2 criteria and 10 LFL-B. CRC was diagnosed in at least one member of 20 (27%) of the families, including all LFL-B and 10 LFL-E1/2. A total of 34 CRC cases were identified, with average age at diagnosis of 55,9 years, including seven cases diagnosed before the age of 45.

Analysis of the IARC *TP53* database (<http://www-p53.iarc.fr/germline>) supports that CRC is part of the LFS spectrum. Indeed, we showed that inherited *TP53* mutations are associated with early-onset CRC. [1] Moreover, in subjects with germline mutations that completely abrogate p53 transcriptional activity, CRC is diagnosed at 36.3 years on

average, compared with 52 years in subjects with mutations that partially retain transcriptional capacity. [6] Recently, Wong et al. (2006) reported a high prevalence of early onset CRC in 397 patients from a US series with classical LFS, occurring several decades earlier than in general population. [7] This observation led to suggest that LFS should be considered as diagnosis when a young patient presents with CRC. Taken together, our data and those of Wong et al. (2006) indicate that CRC is a common diagnosis in LFS/LFL families.

Based on these observations we propose the following recommendations: (1) CRC should be considered among cancers characterizing the LFS/LFL spectrum; (2) screening for CRC should be included in the follow-up of subjects belonging to LFS/LFL families, in particular if there is a history of CRC. Screening should be offered from the age of 25, as also proposed by Wong et al. (2006); (3) Given the possibility of gene-environment interactions enhancing the risk of gastric cancer in LFS/LFL subjects in Brazilian population, screening should be performed from age 45 in individuals from this and other high risk populations; (4) given the current low rate of osteosarcoma diagnosed in Brazilian LFS/LFL families, efforts should focus on assessing the impact of under diagnosis.

Acknowledgements

The authors wish to thank Ghislaine Martel-Planche, Elodie Caboux and Dr Ricardo Renzo Brentani for their continuous support. The work of M I W A at IARC was partially supported by an ICRETT fellowship of Union Internationale Contre le Cancer (UICC), No. 978/2004, and by FAPESP grant No. 03/10121-8. This work was partially supported by the National Cancer Institute (NCI), USA.

References

- 1 Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, Eeles RA. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res.* 2003; **63**:6643-6650.
- 2 Birch JM. Li-Fraumeni syndrome. *Eur J Cancer.* 1994; **30A**:1935-1941.
- 3 Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv.* 1995; **25**:101-124.
- 4 Birch JM, Alston RD, McNally RJ, Evans DG, Kelsey AM, Harris M, Eden OB, Varley JM. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene.* 2001; **20**:4621-4628.
- 5 Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, Ashton-Prolla P, Giugliani R, Palmero EI, Vargas FR, Da Rocha JC, Vettore AL, Hainaut P. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett.* 2007; **245**:96-102.
- 6 Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat.* 2007; **28**:622-629.
- 7 Wong P, Verselis SJ, Garber JE, Schneider K, DiGianni L, Stockwell DH, Li FP, Syngal S. Prevalence of early onset colorectal cancer in 397 patients with classic Li-Fraumeni syndrome. *Gastroenterology.* 2006; **130**:73-79.

12.3 ANEXOS REFERENTES AO CAPÍTULO 3

12.3.1 Artigo Científico relacionado ao tema

12.3.2 PCR e RFLP para exon 10 do gene TP53

PCR do Exon 10		RFLP do Exon 10 (detecção de mutação R337H)	
H2O	Variável	H2O	Variável
10x buffer	2,5 µL	Buffer	2 µL
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µL	BSA	2 µL
dNTP(B)	1,0 µL	HhaI	2 µL
Primer F (25µM)	1,0 µL	DNA	Variável
Primer R (25µM)	1,0 µL	Volume total	20 µL
TaqPlat	0,2 µL		
DNA	Variável		
Total	25µL		

Obs: Verificação do produto da clivagem em gel de agarose 1.5%