

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica

**FREQÜÊNCIA DA MUTAÇÃO 185delAG DO GENE BRCA1 EM
MULHERES JUDIAS ASHKENAZI DE PORTO ALEGRE.**

Eleonora Souza Dias

Orientador: Dr. Roberto Giugliani
Co-orientadora: Dra. Sandra Leistner

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Clínica Médica

2001

MED
T
WA100 D541F 2001

05907452

[000601878] Dias, Eleonora Souza. Frequência da mutação 185delAG do gene BRCA1 em mulheres judias ashkenazi de Porto Alegre. 2001. 70 f.

Ficha Catalográfica

Dias, Eleonora Souza

**FREQÜENCIA DA MUTAÇÃO 185delAG DO GENE BRCA1 EM MULHERES JUDIAS
ASHKENAZI, DE PORTO ALEGRE.**

Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina - Programa de Pós-Graduação em Medicina: Clínica Médica,

2001. Orientador: Dr. Roberto Giugliani. Co-orientadora: Dra. Sandra Leistner

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
AGRADECIMENTOS	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 Etiologia do câncer de mama	16
2.2 Genética e cancer de mama	19
2.3 Frequência das mutações no gene BRCA1	21
2.4 População Judaica	22
3. JUSTIFICATIVA	25
4. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo Principal	26
4.2 Objetivo Secundário	26
5. POPULAÇÃO E MÉTODOS	27
5.1 Proteção dos Direitos Humanos	27
5.2 Delineamento	27
5.3 Amostra Estudada	28
5.4 Métodos	29
5.4.1 Isolamento do DNA	29
5.4.2 Amplificação do DNA pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR)	31

5.4.2.1 Diluição dos primers (iniciadores da reação) e medida da concentração do DNA genômico	31
5.4.3 Análise dos Produtos Amplificados por PCR em gel de agarose	33
5.4.3.1 Soluções Utilizadas	34
5.4.3.1.1 Tampão TBE 5X	34
5.4.3.1.2 Corante utilizado para observação da migração	34
5.4.3.1.3 Corante utilizado para a visualização do DNA sob luz ultravioleta	34
5.4.4 Identificação da mutação por SSCP (Análise de polimorfismo de conformação de cadeia simples – “Single Strand Conformation Polymorphism”)	35
5.4.4.1 Preparação das placas de vidro	35
5.4.4.2 Preparação do gel MDE 0.5x	36
5.4.4.3 Preparação das amostras	36
5.4.4.4 Eletroforese	37
5.4.4.5 Revelação do gel com nitrato de prata	37
5.4.4.6 Técnicas também testadas	38
5.5 Análise Estatística	39
6. RESULTADOS	40
6.1 Análise Epidemiológica	40
6.1.1 Idade	40
6.1.2 Índice de massa corporal	41
6.1.3 Origem Judaica Ashkenazi	42
6.1.4 Antecedentes Gineco-obstétricos	43
6.1.4.1 Menarca	43

6.1.4.2	Uso de anticoncepcional oral (ACO)	43
6.1.4.3	Menopausa	44
6.1.4.4	Uso de terapia de reposição hormonal (TRH)	44
6.1.4.5	Paridade	45
6.1.4.6	Amamentação	45
6.1.5	História pessoal de doença benigna mamária	45
6.1.6	História familiar de câncer	46
6.1.7	História pessoal de câncer	47
6.2	Resultado da análise molecular	49
7.	DISCUSSÃO	52
8.	RESUMO	59
9.	ABSTRACT	60
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
11.	ANEXO 1 QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO PREENCHIDO PELAS PARTICIPANTES	68
12.	ANEXO 2 CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO PREENCHIDO PELAS PARTICIPANTES QUE FIZERAM A DOAÇÃO DE SANGUE PARA ANÁLISE DO DNA	69
13.	ARTIGOS REDIGIDOS E PUBLICADOS	70

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 Estimativas para o ano 2000 das taxas brutas de incidência e mortalidade por 1 00.000 e de número de casos novos e de óbitos por câncer, em mulheres, segundo localização primária, no Brasil	13
Tabela 2 Estimativas para o ano 2000 das taxas brutas de incidência e mortalidade por 1 00.000 e de número de casos novos e de óbitos por câncer, em mulheres, segundo localização primária, na Região Sul do Brasil.	14
Tabela 3 Fatores de riscos para câncer de mama	17
Tabela 4 Frequências de mutações na população judaica Ashkenazi	24
Tabela 5 Concentrações dos reagentes utilizados para a PCR	32
Tabela 6 Condições de PCR para o exon 2 do gene BRCA1	32
Tabela 7 Faixas etárias das participantes da pesquisa	40
Tabela 8 Índice de massa corporal (IMC)	41
Tabela 9 Origem judaica Askenazi	42
Tabela 10 Idade da menarca	43
Tabela 11 Menopausa	44
Tabela 12 História familiar para câncer em geral	47
Tabela 13 Diferentes trabalhos e percentagem de mutação 185delag, independentemente da história pessoal ou familiar para câncer de mama.	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática dos genes BRCA1 e BRCA2, indicando a localização das 3 mutações freqüentes na população de Judeus Ashkenazi.	24
Figura 2 Amplificação do exon 2 do gene brca1	34
Figura 3 PCR amplificação de um fragmento de cerca de 257pb	50
Figura 4 Análise por SSCP do fragmento do exons 2 do gene brca1 amplificado por PCR	51

LISTA DE ABREVIATURAS

1X - Uma vez
10X - Dez vezes
A - adenina
a - ano
APS - Persulfato de amônio
AT - Azul de toluidina
BFB - Azul de Bromo Fenol (Bromo Fenol Blue)
BRCA1- breast cancer gene 1
BRCA2 - breast cancer gene 2
BRL - Bethesda Research Laboratories
C - Citosina
°C - Graus Centígrados
Co. - Companhia (Company)
Conc. - Concentração
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
dNTP - Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA - Tetra-acetato-etileno-diamina
G - Guanina
g - grama
HCl - Acido clorídrico
HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre
INCA - Instituto Nacional do Câncer
IMC – Índice de massa corporal
M - Molar
m - mês
ul - Microlitro
ml - mililitro
mg - miligrama
min - minuto
pb - pares de base
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição)
rpm - rotações por minuto
SGM - Serviço de Genética Médica
SSCA - Single Strand Conformation Analysis
T - Timina
Taq - DNA Polimerase de *Thermus aquaticus*
TBE - Tampão Tris-Borato-EDTA
TEMED- Tetrametilenodiamina
Tris - Tris-(hidroximetil)-aminoetano

AGRADECIMENTOS

São inúmeras as pessoas responsáveis por este trabalho e agradeço a todas elas que participaram, quer seja direta ou indiretamente na realização deste.

A Deus eu agradeço todos os dias por ter tido a oportunidade de nascer em um lar onde além do amor, tive a alegria de ter tido como genitores Nilza e Fernando que tanto fizeram e fazem para que a ética e a moral sejam sempre guias em nossos passos.

Agradeço ao Rogério, meu esposo, que sempre acreditou, me apoiou e financiou todos meus projetos.

Aos meus filhos agradeço por eles terem nascido saudáveis e serem a força para eu continuar a crescer sempre.

Há professores que a gente nunca esquece e, ao Dr. Carlos Henrique Menke, um verdadeiro mestre, eu o agradeço por ter proporcionado a realização do meu primeiro trabalho científico assim como minha primeira bolsa de iniciação científica, ainda como acadêmica de medicina, o que fez com que tomasse gosto pela pesquisa e pela mastologia.

Ao Dr. Roberto Giugliani eu agradeço por ter acreditado em minha capacidade e ter aceito ser o meu orientador deste trabalho.

A Dra. Sandra Leistner, mestre e pesquisadora dedicada, principal responsável por esta dissertação, sem a qual orientação, este trabalho jamais teria sido concluído, o meu muito obrigada.

À Dra. Maira Caleffi e voluntárias do Instituto da Mama do Rio Grande do Sul agradeço as idéias, bem como o auxílio na coleta dos dados. Jamais esquecerei que as oportunidades aparecem e podem ser únicas e, por isso, devemos aproveitá-las, estudar muito e fazer sempre o melhor possível.

Agradeço a Dra. Susan Brancher por ter auxiliado, quer seja na preparação para a prova de seleção da clínica médica, bem como na coleta de material e realização deste trabalho.

A farmacêutica Ana Paula Bohn Kaspary e a Dra. Úrsula Matte, assim como a todos os colegas de laboratório de biologia molecular o meu muito obrigado, pois foram importantes ao desenvolvimento deste trabalho.

Não poderia deixar de agradecer o apoio e credibilidade de toda Federação Israelita de Porto Alegre, principalmente, as participantes desta pesquisa, que foram fundamentais para esta dissertação que será, certamente, um marco para a ciência no nosso estado.

1. INTRODUÇÃO

O impacto do câncer de mama nas sociedades ocidentais tem sido significativo, por ser uma das doenças mais comuns e assustadora para as mulheres e, a principal causa de mortalidade por câncer neste grupo. Estima-se que na idade de 95 anos uma em oito mulheres americanas terá câncer de mama (Miki et al., 1994).

No Brasil, segundo estimativa do INCA para o ano 2000, o câncer de mama atingirá 28.340 mulheres, resultando em 8.245 mortes.

Na região sul é a principal causa de morte por neoplasia maligna em mulheres, sendo estimados 2270 casos novos e 900 mortes para o ano de 2000 (Dados do Instituto Nacional do Câncer – INCA - 2000) (Tabelas 1 e 2)

Tabela 1 - Estimativas para o ano 2000 das taxas brutas de incidência e mortalidade por 100.000 e de número de casos novos e de óbitos por câncer, em mulheres, segundo localização primária, no Brasil.

Fonte: Dados do Instituto Nacional do Câncer-INCA-2000.

Localização primária	Estimativas dos casos novos		Estimativa dos Óbitos	
	nº de Casos	Taxa bruta	nº de óbitos	Taxa bruta
Neoplasia maligna da pele não melanoma	20.410	24,17	267	0,31
Neoplasia maligna da mama feminina	28.340	33,58	8.245	9,78
Neoplasia maligna da traquéia, brônquios e pulmão	5.622	6,66	4.232	4,97
Neoplasia maligna do estômago	6.180	7,30	3.610	4,24
Neoplasia maligna do colo do útero	17.251	20,48	3.563	4,25
Neoplasia maligna do cólon e reto	6.074	7,19	3.563	4,24
Neoplasia maligna do esôfago	2.333	2,74	1.194	1,40
Leucemias	3.000	3,52	1.880	2,19
Boca	2.608	3,05	606	0,73
Outras localizações	53.632	63,55	25.215	29,88
Total	145.450	172,36	52.437	62,14

Tabela 2 - Estimativas para o ano 2000 das taxas brutas de incidência e mortalidade por 100.000 e de número de casos novos e de óbitos por câncer, em mulheres, segundo localização primária, na Região Sul do Brasil.

Fonte: Dados do Instituto Nacional do Câncer-INCA-2000.

Localização Primária	Estimativa dos Casos Novos		Estimativa dos Óbitos	
	nº de Casos	Taxa Bruta	nº de Óbitos	Taxa Bruta
Neoplasia maligna da pele não melanoma	4.510	36,00	50	0,41
Neoplasia maligna da mama feminina	4.140	33,11	1.640	13,09
Neoplasia maligna da traquéia, brônquios e pulmão	1.340	10,73	1.090	8,66
Neoplasia maligna do estômago	1.020	8,12	730	5,76
Neoplasia maligna do colo do útero	2.560	20,35	760	6,04
Neoplasia maligna do cólon e reto	1.380	11,05	750	6,01
Neoplasia maligna do esôfago	560	4,47	380	3,02
Leucemias	575	4,59	370	2,96
Boca	350	2,75	110	0,93
Outras localizações	12.005	95,88	5.250	41,93
Total	28.440	227,15	11.130	88,90

Nos últimos anos, um trabalho intenso vem sendo feito para identificar e definir os genes envolvidos na suscetibilidade ao câncer de mama.

As primeiras demonstrações convincentes de localização de um gene associado ao câncer de mama foram produzidas através de estudos genéticos de ligação por Hall et al. (1990), que localizaram no braço longo do cromossomo 17 (17 q 12-21), o provável locus do gene BRCA1 (breast cancer gene 1). Informações de estudos com perda de heterozigiosidade em tecido tumoral de casos esporádicos forneceram evidências de que o BRCA1 parece ser um gene supressor tumoral envolvido tanto em casos de câncer esporádico quanto familiar. Estudos subseqüentes de Hall et al. (1990), Miki et al. (1994), Weitzel (1994) e Easton (1995) estabeleceram a relação do BRCA1 com o câncer de mama e de ovário.

As duas mutações mais freqüentes do gene BRCA1 são as 185delAG e 5382insC, localizadas nos exons 2 e 20, respectivamente, e correspondem a aproximadamente 19% de todas as mutações neste gene (Shattuck-Eidens et al., 1995).

Posteriormente foi identificado um segundo gene, denominado BRCA2, localizado no cromossoma 13q12-13 (Cohen, 1994).

A observação epidemiológica de que mulheres judias parecem ser mais vulneráveis ao câncer de mama está sendo agora explicada através de estudos moleculares dos genes BRCA1 e BRCA2.

Dentre as diferentes mutações identificadas no gene BRCA1 foi observado que 1% das mulheres judias de origem Ashkenazi possuem uma mutação específica denominada 185delAG. Outra mutação freqüente neste gene, nesta população, é denominada 5382insC. No gene BRCA2 foi identificada a mutação 6174delT (Roa, 1996 e Struewing, 1997). A presença dessas mutações poderia estar relacionada com a freqüência elevada do câncer de mama nesta população.

Em estudo realizado por Neuhausen et al., 1996 foi observado que a mutação 6174delT, do tipo *frameshift* no gene BRCA2, aparece na mesma freqüência do que a 185delAG. Em outro estudo, realizado com cerca de 3000 mulheres a freqüência encontrada foi de 1.09% para 185delAG, 0.13% para 5382insC e 1,52% para a 6174delT BRCA2 (Roa, 1996).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

Evidências epidemiológicas e genéticas sugerem ser o câncer de mama uma doença heterogênea (Lindblom, 1993) e que vários fatores etiológicos ambientais e genéticos estariam envolvidos (Andersen, 1996). Os dois principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são a idade e a história familiar (Lerman, 1995; Hoskins, 1995; Castilla et al., 1994). São também fatores de risco: o alto nível sócio econômico (Mackillop et al., 2000), a menarca precoce (abaixo dos 12 anos), a menopausa tardia (após os 55 anos), a gestação a termo em idade avançada (após os 30 anos) e o pequeno número de filhos. A obesidade pós-menopáusicas aumenta o risco, assim como a história prévia de atipias mamárias. Evidências da relação dos hormônios com câncer datam de mais de um século, sendo que, os mesmos participam da carcinogênese como um fator promotor e iniciador através da indução de enzimas e proteínas envolvidas na síntese de ácido nucleico assim como ativação de oncogenes (Clemons e Goss, 2001). É sabido que a ooforectomia antes dos 40 anos diminui o risco de desenvolver câncer de mama para menos de 10%, mesmo em mulheres com história familiar importante (Bilimoria, 1995).

Sabe-se que antigamente as mulheres tinham em média 50 ciclos ovulatórios, durante sua vida, pois passavam a maior parte do tempo de sua vida reprodutiva grávidas, ou amamentando. Elas menstruavam tarde e com 40 a 45 anos paravam de menstruar naturalmente. Hoje em dia, o perfil da vida reprodutiva de uma menina, em um país desenvolvido, é menstruar pela primeira vez com 11 ou 12 anos, ter o primeiro filho com 27 a 30 anos e ter 1 ou 2 filhos, podendo-se prever que terá, aproximadamente, 500

ciclos ovulatórios durante a menacme, ficando exposta aos estímulos e variações hormonais por períodos longos, de até 20 anos. Esse estímulo permanente de células mamárias ainda imaturas (não diferenciadas), que são mais suscetíveis para se modificarem e, entrarem num processo de carcinogênese, somente diminuirá com a primeira gestação, quando tornam-se diferenciadas. Esse perfil seria uma explicação para o aumento da incidência de câncer de mama (Clemons e Goss , 2001).

Tabela 3 : Fatores de riscos para câncer de mama (adaptada de Clemons e Goss , 2001)

Fatores de risco	Baixo risco	Alto risco	Risco relativo *
Sexo	Masculino	Feminino	150.0
Idade	30-34	70-74	17.0
Idade da menarca	>14	<12	1.5
Uso de anticoncepcionais	Nunca	Previamente ou atual	1.07-1.2
Idade do primeiro parto	<20	≥ 30	1.9-3.5
Aleitamento (meses)	≥16	0	1.37
Paridade	≥5	0	1.4
Idade de Ooforectomia	≤ 35	—	3.0
Idade da menopausa natural	< 45	≥ 55	2.0
Terapia Estrogênica	nunca	Corrente	1.2-1.4
Terapia Combinada de Estrogênio e progesterona	nunca	Corrente	1.4
Índice de massa Corporal pós-menopáusica	<22.9	>30.7	1.6
História familiar de câncer de mama	Negativa	Positiva	2.6
Concentração de estradiol sérico	<8.6pg/ml	>11.5pg/ml	1.8-5.0
Densidade da mama na mamografia (%)	0	≥75	6.0
Densidade óssea	Baixa	Alta	2.7-3.5

*o risco relativo foi calculado com o grupo de baixo risco como o grupo de referência

Estudos epidemiológicos indicam que fatores ambientais são responsáveis por pelo menos 80% da incidência do câncer de mama, significando que a hereditariedade provavelmente tenha um papel menor no câncer de mama do que em outras doenças.

Fatores genéticos contribuem com 5 a 7% da etiologia do câncer de mama (Miki, 1994; Ganguly et al., 1997); podendo chegar a 10% (Biesecker et al., 1994 ; Cohen, 1994; Friedman et al., 1994; King, et al., 1995; Struewing et al. , 1995; Szabo, 1995; Serova O et al., 1996). Porém, quando a doença apresenta-se antes dos 35 anos, o papel dos fatores genéticos chega aos 25%. (Miki, 1994). O câncer de mama hereditário comumente aparece mais cedo, com frequência é bilateral, tem tendência familiar e está relacionado com outros tipos de canceres, como por exemplo, de ovário. Parentes em primeiro grau têm um risco aumentado de duas a três vezes. Algumas observações clínicas têm sugerido que 5 a 10% dos canceres de mama têm comportamento de doença autossômica dominante em certas famílias (Lindblom, 1993)

A partir de descobertas de suscetibilidade para o câncer de mama e ovário foi possível desenvolver testes genéticos para a identificação de alterações em genes relacionados ao aumento do risco de câncer. O desenvolvimento da genética molecular tem auxiliado no entendimento do câncer de mama de componente familiar, sendo que cada vez mais se esclarece a base genética do câncer de mama. Estes estudos deverão contribuir para a compreensão do comportamento biológico da doença e o desenvolvimento de estratégias preventivas.

2.2 GENÉTICA E CÂNCER DE MAMA

Em 1990 o primeiro gene de susceptibilidade para câncer de mama, o BRCA1 foi localizado usando análise de ligação (Hall 1990, Narod 1991, Neuhausen 1994, Andersen 1996), em famílias com diagnóstico de câncer de mama abaixo dos 46 anos.

A análise genética de cromossomos recombinantes, em famílias com história de câncer de mama, permitiu a localização, inicialmente do BRCA1 em uma região de 1 a 2 megabases no cromossomo 17q (Simard et al., 1994). Subseqüentemente, esta localização foi estreitada para uma região de 600Kb (Neuhausen et al., 1994).

Portanto, as primeiras demonstrações convincentes na localização do gene do câncer de mama BRCA1 foram produzidas através de estudos genéticos de ligação, por Hall et al. em 1990 que localizaram o gene à banda 21 no braço longo do cromossomo 17 (17 q 12-21). Informações de estudos com perda de heterozigosidade, em tecido tumoral de casos esporádicos, forneceram evidências que o BRCA1 poderia ser um gene supressor tumoral envolvido tanto, em casos de câncer esporádico, quanto familiar. Estudos de Hall et al., 1990; Miki et al., 1994, Weitzel, 1994 e Easton, 1995, estabeleceram a relação do BRCA1 com o câncer de mama, e ovário.

Em 1994, Miki et al. isolaram o gene, usando clonagem posicional no braço longo do cromossomo 17.

Através do sequenciamento do gene BRCA1, identificou-se uma região codificadora de 22 exons, com extensão de 100kb de DNA genômico e tendo um transcrito único de 7,8kb que codifica uma proteína de 1863 pares de bases (Miki 1994; Neuhausen, 1994; Weber, 1994; Boyd, 1995; Coughlin et al., 1999; Gayther et al., 1996).

Além do gene BRCA1, foi identificado em 1995 por Wooster et al. o BRCA2 (Marks, 1996) que é também um gene extenso, localizado no cromossoma 13

(13q12-13), com 27 exons distribuídos em 70kb, formando uma proteína de 3418 aminoácidos. O BRCA2 parece estar relacionado ao câncer de mama em mulheres jovens e em homens (Szabo, 1995; Wooster, 1995; Andersen, 1996), além de conferir um risco menor para câncer de ovário em comparação ao BRCA1 (Mann et al., 1998) assim como nos tumores do trato digestivo (Berman et al., 1996).

2.3 FREQUÊNCIA DAS MUTAÇÕES NO GENE BRCA1

Pesquisas em famílias com mutações no BRCA1 demonstram que pelo menos 285 diferentes mutações podem alterar esse gene, segundo *The Human Gene Mutation Database, Cardiff*, sendo que são poucas as mutações que se repetem em várias famílias (Friedman, 1995). Isto faz com que poucos indivíduos da população sejam portadores de uma mesma mutação. Este fato, aliado ao fato do gene BRCA1 ser muito extenso, impede que o diagnóstico destas mutações possa se realizar de maneira sistemática e rotineira, na prática clínica laboratorial com a atual tecnologia disponível. Talvez o teste de DNA para rastreamento da população em geral possa até se tornar viável, num futuro próximo, através do seqüenciamento automático ou com o surgimento de novos métodos que possibilitem testar várias mutações concomitantemente.

Estima-se que entre 1:200 e 1:833 mulheres americanas apresentem uma mutação no gene BRCA1 (Ford et al, 1995; Weber, 1994; Clauss, 1994), e que portadoras de mutação no gene BRCA1 têm risco para câncer de mama aos 70 anos de 80-90% e de 40-50% de risco para cancer de ovário (Ford, 1994). Mutações no gene BRCA1 também estão envolvidas no risco maior para câncer de cólon e de próstata (Woostter et al. , 1994; Struewing et al., 1995, Radford el al, 1996).

2.4 POPULAÇÃO JUDAICA

A observação epidemiológica de que mulheres judias podem ser mais vulneráveis ao câncer de mama (Cornelis et al. 1995; Egan et al., 1996; Berman et al., 1996) está sendo agora comprovada e explicada pela análise do DNA dos genes BRCA1 e BRCA2.

Dentre as diferentes mutações identificadas nos genes BRCA1 e BRCA2, até o momento, foi observado que mulheres judias de origem Ashkenazi possuem mutações específicas recorrentes, o que poderia ser uma das causas da frequência significativa desta doença, nesta população. (Coughlin et al., 1999; Hart, 1999)

A primeira pesquisa realizada foi com 858 judeus de origem Ashkenazi, os quais se referem os de origem européia (Moddan et al., 1996; Mansukhani et al., 1997), tendo demonstrado que uma única mutação era responsável pela maioria dos casos em que havia alteração no BRCA1. Uma em cada 100 mulheres judias Ashkenazi é portadora da mutação denominada 185delAG no BRCA1. É estimado que a mutação 185delAG seja encontrada em cerca de 16% dos cânceres de mama e em 39% dos cânceres de ovário em mulheres judias Ashkenazi (Struewing, 1995; Muto, 1996; Modan et al., 1996). Além disto, aproximadamente 20% das mulheres Ashkenazi com câncer de mama, diagnosticado abaixo dos 42 anos também apresentam esta mutação. (Struewing, 1995, Muto, 1996; FitzGerald et al., 1996; Richards et al., 1997; Claus et al. 1998)

Isto significa que, para este subgrupo de mulheres, o rastreamento para câncer de mama por análise de DNA, pode ser viável (Tonin et al., 1995; Offit et al., 1996; Lalloo et al., 1998).

A mutação 185delAG consiste numa deleção (perda) de dois pares de bases nitrogenadas, Adenina e Guanina nas posições 185 e 186, no codon 23 do exon 2 do gene BRCA1, desviando o quadro de leitura do código genético e provocando uma terminação precoce no codon 39. (Struewing,1995. Tonin ,1995. Shattuck-Eidens, 1995; Muto,1996; Lagston et al., 1996 ; Ozcelik et al., 1996) .

Outras mutações, denominadas 5382insC no gene BRCA1e 6174delT no gene BRCA2 foram observadas com uma prevalência relativamente alta na população judaica (Roa, 1996; Struewing, 1997; Oddoux , 1996) . Em estudo realizado por Neuhausen (1996), foi observado que a mutação 6174delT, do tipo *frameshift* no gene BRCA2, aparece na mesma freqüência do que a 185delAG. Em outro estudo, realizado com cerca de 3000, mulheres a freqüência encontrada foi de 1.09% para 185delAG, 0.13% para 5382insC e 1,52% para a 6174delT BRCA2. (Roa, 1996) (tabela 4).

Em comparação, a porcentagem estimada da população de mulheres em geral, nos EUA, de ser portadora de mutação em BRCA1 é de 0.1 a 0.6%.

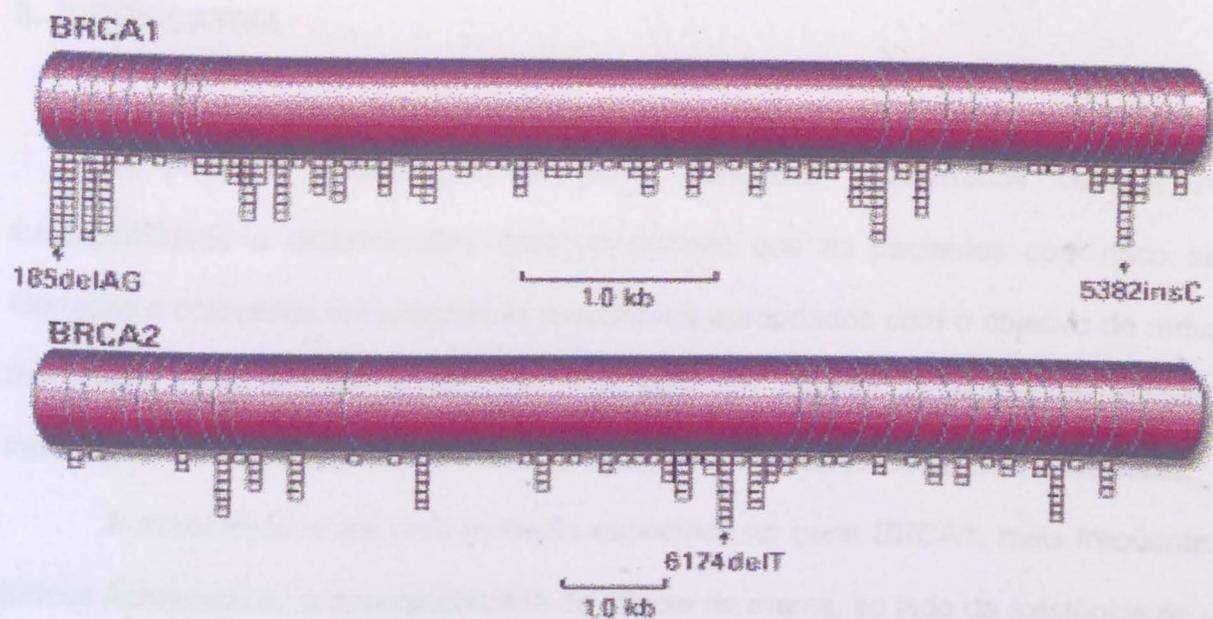


FIGURA 1: Representação esquemática dos genes BRCA1 e BRCA2, indicando a localização das 3 mutações frequentes na população de Judeus Ashkenazi.

TABELA 4: Frequências de mutações na população judaica Ashkenazi (Roa, 1996)

Gene	Mutação	Frequência em Judeus Ashkenazi
BRCA 1	185delAG	1.0 %
	5382insC	0.1 %
BRCA2	6174delT	1.5 %

3. JUSTIFICATIVA

A possível identificação de perfis genéticos relacionados com a maior susceptibilidade a determinadas doenças permite que as pacientes com risco sejam alertadas e colocadas em programas preventivos apropriados com o objetivo de reduzir a morbidade e mortalidade, observadas à doença em questão. Uma vez identificado um indivíduo em risco, a extensão do estudo à família amplifica os benefícios envolvidos.

A associação entre uma mutação específica no gene BRCA1, mais freqüente em judeus Ashkenazi e, a susceptibilidade do câncer de mama, ao lado da existência de uma comunidade deste grupo, em nosso meio, torna possível e importante a realização deste estudo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Principal:

Verificar a frequência de uma mutação específica única (185delAG) no gene BRCA1 em mulheres judias Ashkenazi de Porto Alegre.

4.2 Objetivo Secundário:

Delinear, em relação a diversas variáveis, o perfil epidemiológico das mulheres da população judaica Ashkenazi, de Porto Alegre.

5. POPULAÇÃO E MÉTODOS

5.1. PROTEÇÃO DOS DIREITOS HUMANOS

O trabalho se enquadra, de acordo com as normas de pesquisa em saúde, como pesquisa com risco mínimo.

Fica garantida a confidencialidade e sigilo das informações fornecidas pelas participantes da pesquisa.

Todas as mulheres que participaram do projeto preencheram um termo de consentimento pós-informação (em anexo).

Esta pesquisa foi aprovada pelo Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, estando cadastrada sob o número 96253.

5.2 DELINEAMENTO

Consiste em estudo de prevalência (estudo transversal não controlado), cujo fator em estudo é a população feminina judaica Ashkenazi de Porto Alegre, com idade acima de 18 anos. O desfecho deste é a presença da mutação genética específica 185 delAG no gene BRCA1.

5.3 AMOSTRA ESTUDADA

O presente estudo foi desenvolvido em Porto Alegre, onde a grande maioria das mulheres judias são de origem Ashkenazi (73,4%). (Brumer, 1994).

Participaram voluntariamente desta pesquisa 330 mulheres, da comunidade judaica de Porto Alegre, independente de serem portadoras ou não de câncer mamário.

Após responderem ao questionário com informação epidemiológica, 287 assinaram termo de consentimento pós-informação para coleta de sangue, para análise da mutação 185delAG, no gene BRCA1.

O projeto contou com o apoio da Federação Israelita do Rio Grande do Sul e do Instituto da Mama do Rio Grande do Sul.

A coleta dos dados epidemiológicos, bem como, a coleta de sangue, após consentimento, foram realizadas em diversos eventos promovidos pela Federação Israelita no período de março de 1996 a setembro de 1997, tais como reunião para eleição de diretoria e festas populares da comunidade judaica.

Foram excluídas do trabalho aquelas que eram menores de 18 anos, ou que não tinham origem Ashkenazi (adotivas ou Sepharadi) e ainda, aquelas que não responderam completamente ao questionário epidemiológico.

Realizada a exclusão, pelos critérios acima, 306 questionários foram incluídos na análise epidemiológica e, em 275 amostras sanguíneas foi realizada a pesquisa da mutação 185delAG por biologia molecular.

Os resultados, portanto, foram divididos em duas análises principais: a análise epidemiológica e a análise molecular.

5.4 MÉTODOS

5.4.1 ISOLAMENTO DO DNA

O DNA genômico foi isolado dos leucócitos do sangue periférico por um processo que promove a destruição das proteínas celulares por desidratação e precipitação com acetato de amônio saturado.

As amostras de sangue foram coletadas em tubos com EDTA, retirados de 5 a 15 ml de sangue total que foram congelados a -20°C para posterior extração do DNA, conforme técnica de precipitação com sais (*salting-out*), adaptado de Miller e cols (1988) e descrita abaixo:

As hemácias foram lisadas pela adição de água estéril gelada pelo processo de osmose. Descongelou-se de 5 a 10ml de sangue total. Transferiu-se o sangue para frascos plásticos estéreis de 50ml (tubos Falcon) devidamente etiquetados, logo após o descongelamento. Adicionou-se água destilada esterilizada gelada até completar 50ml. Agitou-se bem ou homogeneizou-se no vortex.

Após, a amostra foi centrifugada por 20 minutos a 4000 rpm, em temperatura ambiente. Descartou-se o sobrenadante e o "*pellet*" ficou sedimentado.

Adicionou-se ao "*pellet*" nuclear 25ml de solução 0,1% de TRITON X-100 (Sigma Chemical Co) (25ul de TRITON + 25ML ÁGUA) para lavar e romper a membrana celular nuclear. Após agitação no vortex por alguns segundos até o "*pellet*" ressuspender completamente, a amostra foi novamente centrifugada por 20 minutos a 4000 rpm.

O sobrenadante foi descartado, adicionou-se ao "*pellet*" nuclear intacto 3 ml de tampão de lise nuclear (NUCLEOLYSIS 1X) e agitou-se no vortex.

Foram adicionados 120ul de Proteinase K (Sigma Chemical Co.) (10mg/ml em

tampão) e 200ul de SDS (Sigma Chemical Co.) 10%, agitou-se no vortex e incubou-se a 60°C por 1 a 2 horas ou a 37°C *overnight*, para que ocorra por um processo enzimático a digestão de proteínas.

Após adição de 1 ml de solução de acetato de amônio 9,6M às amostras digeridas para precipitar as proteínas, os tubos foram agitados no vortex por 15 segundos e depois repousaram à temperatura ambiente por 10 a 15 minutos.

Após centrifugação por 20 minutos a 4000 rpm em temperatura ambiente, o sobrenadante foi removido e colocado em frascos de vidro de 30 ml estéreis.

10 ml de etanol absoluto gelado (Merck) foram adicionados ao sobrenadante a fim de precipitar o DNA. O frasco foi vedado com "*parafilm*" e misturado levemente por inversão.

O DNA foi retirado com microcapilar de vidro e ressuspenso em 150 a 200ul de TE (ou mais, dependendo da quantidade de DNA extraída) em um tubo "*eppendorf*" de 1,5ml.

Depois de ficar 10 a 15 minutos a temperatura ambiente para completa homogeneização o material foi armazenado a - 20°C para posterior análise.

5.4.2 AMPLIFICAÇÃO DO DNA PELA TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

O DNA extraído foi submetido a amplificação do exon 2 do gene BRCA1, a partir dos primers (iniciadores da reação) descritos abaixo. (Simard, 1994)

Primer 1 – 5' GAA GTT GTC ATT TTA TAA ACC TTT 3' - exon 2 F

Primer 2 – 5' TGT CTT TTC TTC CCT AGT ATG T 3' - exon 2 R

5.4.2.1 Diluição dos primers (iniciadores da reação) e medida da concentração do DNA genômico:

Foram adicionados aos primers liofilizados 300µl água estéril. A solução anterior foi diluída 100 vezes e a concentração de DNA é medida em espectrofotômetro Gene Quant (Pharmacia), específico para dosagens de DNA/RNA. Considerou-se a pureza do DNA pela determinação de absorbância a 260nm. Os primers foram diluídos para obtenção de uma solução de uso de 20pmol/µl.

Tabela 5: CONCENTRAÇÕES DOS REAGENTES UTILIZADOS PARA A PCR

Reagentes	Concentração final
TAMPÃO 10X (Biotools), para a enzima contendo 750mM de Tris-HCl(pH9,0), 20mM de MgCl ₂ , 500mM de KCl, 200mM de (NH ₄) ₂ SO ₄ e 0,01% de Albumina Bovina (BSA)	1x
DNTPs: deoxinucleotídeos trifosfatos dATP, dCTP, dGTP, dTTP com concentração de 2mM (gibco-BRL)	0.2mM
DMSO (Sigma Chemical Co)	10%
PRIMER 1	20pMoles
PRIMER 2	20pMoles
Taq DNA polimerase (Biotools)	1U
DNA	1uL
ÁGUA bidestilada	até volume total 50uL

As reações foram realizadas em Termociclador PTC-100 (MJResearch), as amostras foram inicialmente desnaturadas por 5 minutos a 94°C, e processadas por 35 ciclos constituídos de 3 estágios, de 40 segundos cada: o de desnaturação de dupla fita do DNA a 94°C, o de anelamento dos iniciadores ao DNA de fita simples a 44°C e o estágio de extensão de 5' para 3' a 72°C. Um estágio final de 10 minutos também a 72°C é feito para se obter uma extensão completa.

O tamanho esperado do produto de amplificação do exon 2 do gene BRCA1 é de 257 pb.

Tabela 6: Condições de PCR para o exon 2 do gene BRCA1

Etapas	nome do ciclo	temperatura	tempo
A		94 °C	5 minutos
B:35 ciclos	DESNATURAÇÃO	94 °C	40 segundos
	ANELAMENTO	44 °C	40 segundos
	EXTENSÃO	72 °C	40 segundos
C	EXTENSÃO FINAL	72 °C	10 minutos

5.4.3 ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS POR PCR EM GEL DE AGAROSE

A confirmação da amplificação do fragmento desejado foi conferida pela eletroforese de 5 μ l de amostra em um gel agarose a 2%. As bandas foram comparadas ao padrão de peso molecular de 100pb (DNA ladder, Gibco BRL). Os géis de agarose foram corados com brometo de etídio, permitindo sua observação em luz ultra-violeta. Este procedimento é utilizado também para conferir se não houve contaminação, através de um controle negativo (tubo de reação com água ao invés de DNA).

O gel foi obtido pelo aquecimento em forno microondas de 2.0g de agarose em 100ml de TBE1X, até a dissolução completa. A esta mistura adicionou-se 2,5uL de brometo de etídio com homogeneização. O gel foi colocado em um molde e um pente foi inserido para que se formem os poços para a colocação das amostras. O gel permaneceu em temperatura ambiente até a solidificação (aproximadamente 40min). Transcorrido esse tempo o gel foi colocado na cuba de eletroforese contendo TBE1X. Aos 5ul de produto de PCR foram adicionados 2,5ul de corante e pipetou-se a amostra nos poços do gel. O gel foi submetido a uma eletroforese de 100V por 30 minutos. O gel é visualizado em um transiluminador ultravioleta e fotografado, utilizando uma máquina fotográfica "polaroid" ou registrado em sistema de vídeo documentação acoplado a um transiluminador ultravioleta.

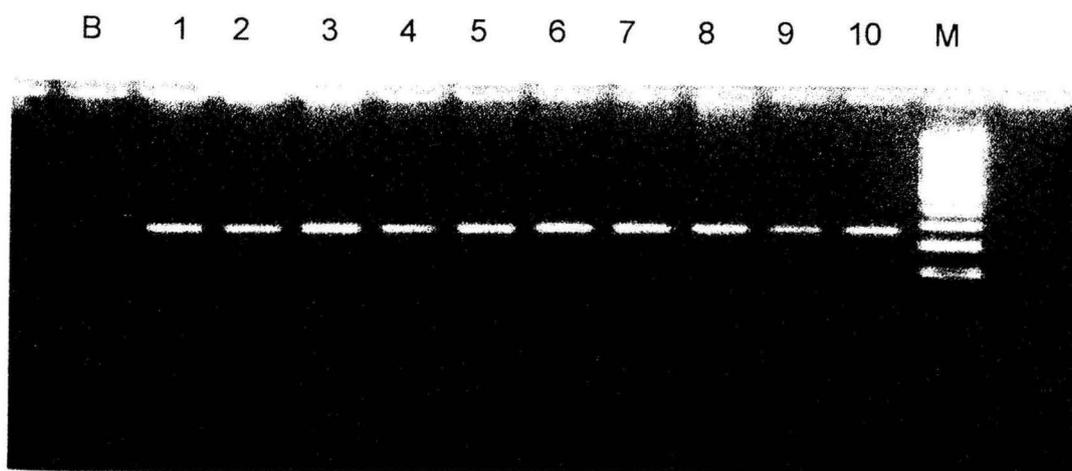


Figura 2 – Amplificação do exon 2 do gene BRCA1

B= controle negativo, para comprovação de que não houve contaminação no processo de amplificação

M= marcador de peso molecular de 100pb (Gibco)

Colunas 1-10= indivíduos que participaram do estudo

5.4.3.1- Soluções Utilizadas:

5.4.3.1.1- Tampão TBE 5X (Tris-Borato-EDTA)

Constituído de 45mM Tris-HCL e 45mM de Ácido Bórico e 10nM de Na₂EDTA (pH 8.0)

5.4.3.1.2- Corante utilizado para a observação da migração

Azul de bromofenol 0.05% (m/v), Cianol-xileno 0.05% (m/v), 0.1M EDTA pH 8.0 e Glicerol 50% (v/v)

5.4.3.1.3- Corante utilizado para a visualização do DNA sob luz ultravioleta

Brometo de etídio (1mg/ml).

5.4.4 IDENTIFICAÇÃO DA MUTAÇÃO POR SSCP (Análise de Polimorfismo de Conformação de Cadeia Simples – “*Single Strand Conformation Polymorphism*”)

A análise molecular utilizando SSCP é um método rápido de triagem para a detecção de alterações presentes em pequenos fragmentos de DNA. A técnica baseia-se no fato de que a mobilidade eletroforética de fitas simples de fragmentos de DNA em gel não desnaturante é alterada pela variação na seqüência de nucleotídeos. As mudanças na migração das fitas simples de DNA são devidas as alterações nas suas conformações. Na análise por SSCP uma simples diferença de um nucleotídeo entre duas seqüências similares é suficiente para alterar a estrutura conformacional de uma em relação a outra. A sensibilidade do método requer produtos de até 400pb. Fragmentos maiores normalmente, não apresentam uma resolução satisfatória na eletroforese e, para que a técnica seja utilizada recomenda-se que sejam digeridos, por enzimas de restrição, antes do SSCP. Os géis de SSCP após migração são revelados, utilizando coloração com nitrato de prata.

5.4.4.1 Preparação das placas de vidro

Duas placas de vidro foram lavadas com detergente diluído, enxaguadas com água destilada e secas. Em seguida, estas foram limpas com etanol 70% para eliminar quaisquer resquícios de detergente e gordura. Após a preparação as placas foram separadas por espaçadores e, foram presas por grampos que as mantêm firmes.

5.4.4.2 Preparação do gel MDE 0.5X

Reagentes: Polímero MDE 2X (Hydrolink), TBE 5X (descrito anteriormente), TEMED (Sigma) e APS 10% (persulfato de amônio)

O gel é constituído de 7,5ml de um polímero MDE 2X, 3,5ml de TBE 5X e 19ml de água. Para induzir a polimerização é adicionado 200ul de APS 10% (persulfato de amônio) e 20ul de TEMED. O gel deve ser imediatamente colocado entre as placas de vidro.

O conjunto (placas e grampos) é colocado horizontalmente sobre uma superfície reta e o gel, após homogeneização, é colocado no espaço entre as placas. Coloca-se o pente, que formará os orifícios, onde serão introduzidas as amostras, na parte superior do gel. A polimerização do gel ocorre em aproximadamente 1 hora. Transcorrido este processo o gel está pronto para o uso. Após a polimerização do gel, os grampos e pente são retirados e as placas contendo o gel são colocadas em uma cuba de eletroforese vertical contendo TBE1X.

5.4.4.3 Preparação das amostras:

12ul de produto de PCR são adicionados a 6ul de tampão de migração (95% de formamida, 20mM de EDTA, 0.05% de azul de bromofenol e 0.05% de cianol xileno). As amostras são desnaturadas a 94°C por 3 minutos e, imediatamente, são colocadas em um recipiente com gelo e, são aplicadas nos poços existentes do gel.

5.4.4.4 Eletroforese:

A eletroforese foi realizada em voltagem de 250V, por 2 horas e 30 minutos., utilizando-se um tampão de corrida de TBE 0.5X (120ml TBE5x com 880ml água).

Estas condições foram otimizadas após várias outras tentativas que incluíram concentrações de poliacrilamida e tempo de corrida diferentes.

5.4.4.5 Revelação do gel com Nitrato de Prata:

Após a eletroforese o gel foi retirado com auxílio de papel Whatman 3MM e, colocado em um recipiente plástico do tipo "tupperware" contendo Etanol 10% (20ml etanol + 180ml água deionizada e destilada) por 5 minutos a fim de fixar o DNA.

A oxidação do DNA foi realizada com ácido nítrico 1% (2 ml ácido nítrico + 198ml água deionizada e destilada) durante 2 minutos. O gel foi então lavado com água deionizada e destilada rapidamente e, impregnado com nitrato de prata (AgNO_3) 0,010M (0,4g AgNO_3 + 200 ml água deionizada e destilada) durante 20 minutos, a fim de corar o DNA. O gel foi lavado novamente com água deionizada e destilada por 3 vezes e, foi adicionado carbonato de sódio 0,28M (6g Na_2CO_3 complementar com 200ml solução), contendo formaldeído 0.019%, para a revelação das bandas (em cerca de 5 minutos inicia o aparecimento e espera-se até 20 minutos).

O processo foi interrompido pela adição de ácido acético 10% (20ml ácido acético + 180 ml solução) durante 2 minutos. O gel é lavado rapidamente com água deionizada e destilada e reduzido pela adição de etanol 50% (100 ml etanol e 100 ml água deionizada e destilada) durante 30 minutos. O gel então é removido com papel Whatman 3MM, coberto com filme plástico e seco à vácuo a 60°C por 30 minutos.

5.4.4.6 Técnicas também testadas

Até ser encontrada uma técnica adequada e confiável, foram testadas outras estratégias para identificação da mutação 185delAG. Estas incluíram análise do produto de PCR em:

GEL POLIACRILAMIDA 12%;

GEL SSCP utilizando MDE 1X ;

GEL SSCP utilizando o Sistema PHASTA da Amersham Pharmacia.

Após diversas tentativas não foi possível identificar padrões de bandas alteradas, utilizando um controle positivo para a mutação, somente após a modificação da concentração do gel de MDE, tempo de corrida e técnica da coloração é que obtivemos um resultado satisfatório, cuja descrição detalhada, encontra-se no item 5.4.4

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi elaborado um questionário específico, digitado em um banco de dados em Fox- Pro para posterior análise com o auxílio do pacote epidemiológico EPI-INFO (anexo 1).

Em relação aos dados epidemiológicos, foram avaliados os seguintes fatores de risco: idade, índice de massa corporal, origem judaica, antecedentes gineco-obstétricos, história pessoal e familiar de câncer.

Foram coletados dados referentes ao padrão alimentar, tabagismo, exposição à radiação, os quais tiveram que ser excluídos desta análise devido a inúmeras respostas anuladas.

Foram criadas tabelas de frequência para todas as variáveis assim como gráficos.

Para variáveis contínuas foram observadas as médias e medianas. Para as variáveis categóricas foram analisadas as proporções.

Foi realizada uma análise em separado para um subgrupo de participantes com história pessoal para câncer de mama ou ovário.

6. RESULTADOS

6.1 RESULTADO DA ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA

6.1.1 IDADE

A idade variou entre 19 e 77 anos, com média e mediana na faixa de 41-50 anos, que foram divididas em grupos diferentes, expostos na tabela 7.

TABELA 7: Faixas etárias das participantes da pesquisa

faixa etária	Frequência	Porcentagem (%)
19-30anos	25	8.2
31-40	65	21.2
41-50	86	28.1
51-60	58	19.0
>61	72	23.5
Total	306	100.0

6.1.2 INDICE DE MASSA CORPORAL

O índice de massa corporal variou de 16 a 41, considerando-se obesidade quando maior que 30. A média e mediana foram, respectivamente, 24 e 23 (tabela 8).

TABELA 8: ÍNDICE DE MASSA CORPORAL (IMC)

Faixa IMC	Frequência	Porcentagem (%)
Não informado	9	3.0
Abaixo peso (<20)	16	5.2
Normal(20-24)	159	52.0
Sobrepeso(25-29)	87	28.4
Obeso(>=30)	35	11.4
Total	306	100.0

6.1.3 ORIGEM JUDAICA ASHKENAZI

Segundo a origem judaica, 291 eram de origem Ashkenazi de ambos genitores, as restantes eram de ascendência mista. (tabela 9)

Das 291 participantes com ascendência Ashkenazi por ambos os genitores, 260 tiveram sua amostra de sangue analisado, as 31 restantes só participaram da análise epidemiológica.

TABELA 9: ORIGEM JUDAICA ASHKENAZI

Origem	Frequência	Porcentagem (%)
1 genitor	15	4.9
2 genitores	291	95.1
Total	306	100.0

6.1.4 ANTECEDENTES GINECO-OBSTÉTRICOS

6.1.4.1 MENARCA

A menarca, variou de 9 a 18 anos, com idade média de 12.2 anos (tabela 10)

TABELA 10: IDADE DA MENARCA

Menarca	Frequência	Porcentagem (%)
Não informado	4	1.3
<12	67	21.9
12-15	232	75.9
>15	3	0.9
Total	306	100.0

6.1.4.2 USO DE ANTICONCEPCIONAL ORAL (ACO)

Um total de 216 mulheres (70,6%) usam ou usaram anticoncepcional oral, com início em média aos 23 e mediana de 21 anos e tempo médio de uso 7,8 anos.

6.1.4.3 MENOPAUSA

Encontravam-se na menopausa 126 mulheres, iniciada em média aos 48.6 anos e mediana de 50 anos, com variação de 37 a 58 anos

Tiveram menopausa espontânea 92 participantes e 34 referiam terem tido menopausa cirúrgica (tabela 11).

TABELA 11. MENOPAUSA

Menopausa	Frequência	Porcentagem (%)
Espontânea	92	73
Cirúrgica (Histerectomia/ooforectomia)	34	27
Total	126	100%

6.1.4.4 USO DE TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL (TRH)

A TRH foi utilizada por 89 mulheres, sendo que 33,7% suspenderam o uso no primeiro ano de tratamento. 6.74% (6) usaram até 5 anos.

O tempo médio de uso de 4,2 anos e mediana de 2 anos. Apenas oito participantes (8.98%) fizeram uso contínuo por mais de 10 anos.

6.1.4.5 PARIDADE

Das 306 participantes, que entraram na análise epidemiológica, 260 gestaram. A média de gestações foi de 2.6 gestações e a mediana de 3 gestações. Dessas, 28 fizeram tratamento para engravidar, com uso de hormônios. Em relação ao número de partos, a média e mediana foram, respectivamente, 1.8 e 2. A média de idade do primeiro parto foi de 24 anos. Apenas 14 participantes tiveram o primeiro parto após os 30 anos de idade (5.38%).

6.1.4.6 AMAMENTAÇÃO

Das mulheres que gestaram 89,5% (225 participantes) amamentaram, com tempo médio de 7 meses.

6.1.5 HISTÓRIA PESSOAL DE DOENÇA BENIGNA MAMÁRIA

Tiveram alguma patologia mamária benigna, 51 mulheres, sendo que as mais comuns foram a presença de nódulos sólidos (17 casos), cistos de mama (12 casos), mastite (4 casos) e mastopatia/displasia (4 casos).

6.1.6 HISTÓRIA FAMILIAR DE CÂNCER

Das 306 participantes da análise epidemiológica, 217 mulheres (70.9%) relataram algum parente (I, II ou III grau) com algum tipo de câncer.

Os principais locais foram mama (147 casos), pulmão (35 casos), aparelho gastrointestinal (88 casos) e pele (26 casos)

As participantes deste estudo foram divididas em subgrupos em relação a história familiar para câncer de mama. (tabela 12)

Grupo A: aquelas que só tinham parentes de I Grau com câncer, incluindo 71 mulheres (23,2%).

Grupo B: aquelas que tinham parentes de I e II Graus com história de câncer, incluindo 18 mulheres (5,9%).

Grupo C: aquelas que tinham parentes de I, II e III Graus, incluindo 20 mulheres (6.5%).

Grupo D: só parentes em II Grau, incluindo 36 mulheres (11,8%).

Grupo E: II e III Graus, incluindo 24 mulheres (7.8%).

Grupo F: só III Grau, incluindo 48 mulheres (15,7%).

Grupo H: Sem história Familiar de Câncer, 89 mulheres (29.1%).

TABELA 12. HISTÓRIA FAMILIAR PARA CÂNCER EM GERAL

Subgrupos conforme a história familiar de câncer	Frequência	Percentagem (%)
A= I GRAU	71	23.2
B= I E II GRAUS	18	5.9
C= I ,II E III GRAUS	20	6.5
D- II GRAU	36	11.8
E= II E III GRAUS	24	7.8
F= III GRAU	48	15.7
H= SEM HF	89	29.1
Total	306	100.0

6.1.7 HISTÓRIA PESSOAL DE CÂNCER

Foi realizada uma análise separada de um subgrupo de participantes que corresponde a 3.9% das participantes, portadoras de câncer de mama ou de ovário. Neste grupo foi evidenciado 12 mulheres com história prévia, pessoal de câncer de mama ou ovário (11 de mama e 1 de ovário).

A idade média foi 54,7 anos e mediana de 56 anos.

O índice de massa corporal média foi de 25 e mediana de 27 (sobrepeso).

Quanto a origem judaica 83.3% eram de ambos genitores e 16.7% apenas origem judaica mista.

A menarca média foi 12.5 anos e mediana de 13.

Nesse grupo, oito mulheres se encontravam na menopausa, com idade média de 47,5 anos e mediana de 48.5, seis tiveram menopausa espontânea e duas menopausa cirúrgica.

A paridade média deste grupo foi de 1.5 com mediana 2.

Em relação a história familiar para câncer em geral 5, das 12 mulheres desse grupo, não apresentavam nenhum parente com história de câncer (41,7%). As restantes, quatro apresentavam um parente de primeiro grau com câncer, duas apresentavam parentes de 2º grau e uma apresentou parente de 3º grau com câncer.

6.2 RESULTADO DA ANÁLISE MOLECULAR

Foram amplificadas pela técnica da PCR, 275 amostras de DNA, utilizando-se primers específicos que flanqueiam o exon 2 do gene BRCA1, que é a região, onde está localizada a mutação 185delAG.

O resultado da amplificação pode ser observado na figura 3, e origina um produto de 257pb. Após a PCR os fragmentos foram analisados para a presença, ou ausência da mutação.

Na maioria dos artigos revisados essa mutação era detectada através da técnica de ASO (Amplificação Alelo Específica) que exige a utilização de radioatividade ou kits para marcação por imuno-peroxidase. Como nosso laboratório de biologia molecular não estava equipado para essas técnicas procuramos encontrar uma outra alternativa para identificarmos a mutação.

Como a mutação é uma deleção de 2pb, inicialmente, tentamos utilizar uma técnica baseada em eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%, semelhante àquela utilizada para a detecção da mutação $\Delta F508$ na fibrose cística (deleção de 3pb).

Através de um controle positivo da mutação 185delAG, gentilmente cedido pelo Dr. Lawrence C. Brody do National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, verificamos que a mutação em questão não podia ser observada com essas condições de gel e procuramos então utilizar outras concentrações de géis mas, com resultados frustrantes.

Como o nosso laboratório já havia desenvolvido a técnica do SSCP para análise de mutações em outras doenças genéticas e, já que a mesma é ideal para fragmentos pequenos (200 - 300pb), resolvemos adaptá-la para análise do gene BRCA1. Como dispúnhamos de um controle positivo para a mutação 185delAG pudemos fazer a validação da mesma (figura 4).

Apenas uma amostra, das 275 analisadas, conferiu a semelhança no padrão de bandas com o controle positivo, o que podemos declarar como portadora para a mutação 185delAG. Para maior confiabilidade dos resultados obtidos por SSCP esta amostra de DNA foi analisada, através de seqüenciamento automatizado, o que confirmou este achado.

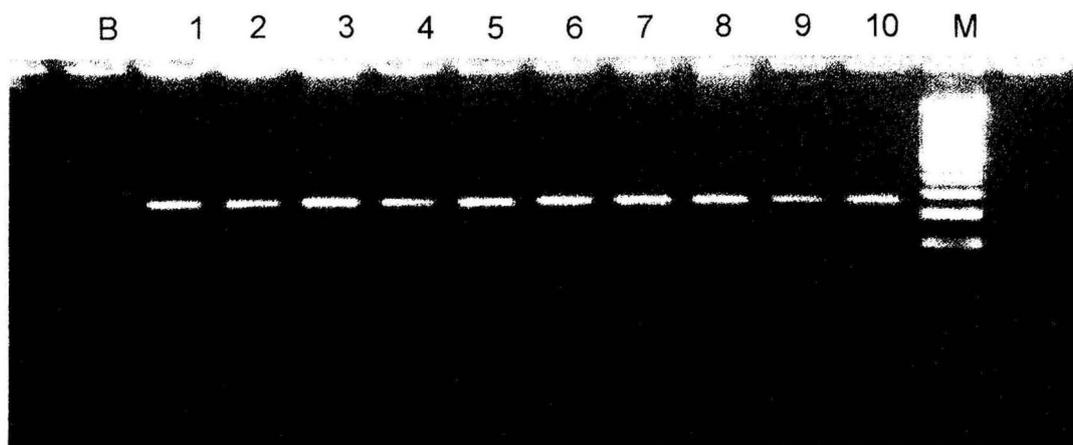


Figura 3: PCR- AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DE CERCA DE 257pb

B= controle negativo, para comprovação de que não houve contaminação

M= marcador de peso molecular de 100pb (Gibco)

Colunas 1-10= indivíduos que participaram do estudo

I

C

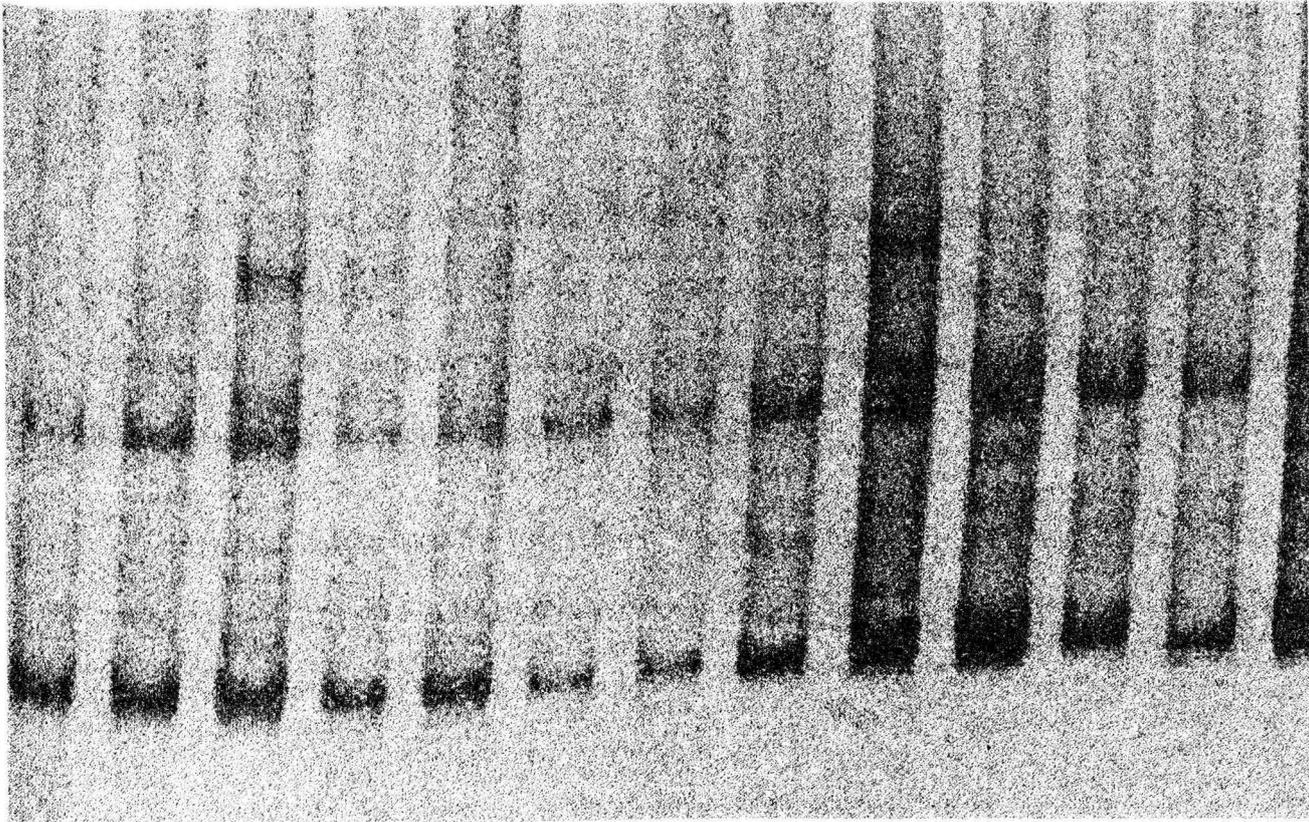


Figura 4: Análise por SSCP do fragmento do exons 2 do gene BRCA1 amplificado por PCR

As letras I e C indicam indivíduo portador da mutação e o controle positivo, respectivamente. Uma semelhança no padrão de bandas pode ser observada nestas duas amostras.

7 DISCUSSÃO

Este estudo de prevalência constituiu em uma análise epidemiológica de 306 mulheres da comunidade judaica Ashkenazi de Porto Alegre, nas quais não foi identificada, em relação à literatura, nenhum fator de risco aumentado para o desenvolvimento do câncer de mama.

Dessas mulheres, 95.1% tinham ascendentes Ashkenazi puros e 4.9% mistos. Todas as participantes entraram no estudo, independentemente, da história pessoal ou familiar para câncer de mama.

Os fatores, segundo o modelo desenvolvido por Gail et al. (Gail, et al., 1989), considerados como essenciais para o aumento de risco no desenvolvimento do câncer de mama foram a idade atual, menarca abaixo dos 12 anos, patologia benigna prévia, idade do 1º parto acima dos 30 anos, história familiar de câncer de mama em parentes de 1º grau (mãe, irmã ou filha).

São fatores consideráveis para o aumento do risco no desenvolvimento do câncer de mama, a obesidade na menopausa, uso moderado ou abusivo de bebida alcoólica, e uso de TRH, por mais de 10 anos.

Nessa amostra, a idade média das participantes, estava na faixa dos 41 a 50 anos. A menarca média não foi precoce (12.2 anos). 260 (78.8%) das participantes gestaram e a idade média do primeiro parto não foi tardia (24 anos). Das mulheres que tiveram filho a taxa de amamentação foi alta, ou seja 86,5% delas amamentaram. A

menopausa média não foi tardia (48.6 anos), e das mulheres que usaram terapia de reposição hormonal apenas 8.9% usaram por um período superior a 10 anos.

História familiar de câncer em geral ocorreu em 70.9% das participantes (217). Histórico de câncer de mama na família ocorreu em 147 mulheres e, dessas apenas 47 (15.35%) tiveram esse histórico em parente de 1º grau. Das 15 que tiveram história de câncer de ovário na família, em apenas 7 (2.28%) foram em parentes de 1º grau.

Possuíam uma história pessoal de câncer de mama ou ovário 12 participantes (11 mama e 1 ovário), o que corresponde a 3.9% da amostra estudada e, estaria relacionada a maior taxa de risco para possuir alteração genética no gene BRCA1.

Em relação a análise molecular foram estudadas 275 amostras sanguíneas e dessas, 260 mulheres eram judias Ashkenazi de ambos os genitores. Foi identificada apenas uma mulher com portadora da mutação 185delAG no gene BRCA1 (0.38%)

Essa participante em especial apresentava uma história familiar positiva para câncer de mama, em irmã gêmea univitelina, diagnosticada na idade de 50 anos. Apresentava também outros 2 casos de câncer na família, um irmão com câncer de pâncreas aos 58 anos e outra irmã com melanoma aos 50 anos.

Referente aos outros fatores de risco para câncer de mama essa participante, se encontrava na faixa etária dos 54 anos, é judia Ashkenazi de ambos genitores, apresentou menarca aos 14 anos, teve 2 filhos, sendo que a primeira gestação foi aos 26 anos, amamentou apenas 1 mês. Usou hormônios anticoncepcionais durante 16 anos,

com início aos 24 anos, nunca teve história pessoal de doença benigna das mamas, não era tabagista, era hígida até o momento da coleta de sangue (em 1996) e nunca foi obesa (IMC 20.6).

Portanto, como fatores principais de risco para câncer de mama, a paciente apresentava a idade (54 anos) e a história familiar positiva para câncer de mama (irmã gêmea univitelina aos 50 anos).

Essa participante foi convidada a realizar aconselhamento genético e neste momento viemos a saber que fora acometida pelo câncer de mama aos 57 anos, encontrava-se em tratamento. Conforme achados na literatura, a frequência da mutação 185delAG em nosso estudo ficou abaixo das estatísticas de outros trabalhos. Talvez, possa ser explicado, devido a uma amostra inferior daquelas utilizadas. Entretanto, como foi um trabalho que envolveu a padronização de uma técnica, utilizando uma amostra que nunca havia sido analisada em nosso meio, consideramos este resultado satisfatório.

Tabela 12. Diferentes trabalhos e percentagem de mutação 185delAG, independentemente da história pessoal ou familiar para câncer de mama.

Autor	Número de amostras estudadas 185delAG	Número de mutação 185delAG identificada	Percentagem de mutação 185delAG identificada
Dias ES – 2001	260	1	0.38%
Struewing JP – Nature Genetics 11, 1995	858	8	0.9%
Roa BB – Nature Genetics, 1996	3108	34	1.09%

Nesta pesquisa, foi apenas analisada a mutação 185delAG, porém, na população judaica já foram observadas a presença de outras duas mutações, uma em BRCA1 e outra em BRCA2 esta inclusive, com maior frequência, não avaliadas no presente trabalho, assim como as outras tantas mutações existentes nos genes BRCA1 e BRCA2 (Roa BB, 1996).

Isso significa que a ausência desta, ou de outra mutação, não confere proteção as participantes (Fodor, 1998). Por isso, foi oferecido a todas as participantes deste trabalho, a oportunidade de aconselhamento genético, para esclarecimento dos potenciais riscos.

O acompanhamento da participante na qual a mutação foi identificada, é extremamente importante, bem como de seus familiares, através de aconselhamento genético, medidas preventivas e, de detecção precoce, ao longo dos anos, para que se tenha uma informação mais detalhada, sobre a importância deste achado molecular. É importante salientar que esse risco aumentado existe, nas portadoras da mutação, mas não podemos quantificar exatamente este risco pois entendemos que há outros fatores que modificam esse risco, tais como os ambientais e outros genes.

O *screening* para risco de câncer de mama, utilizando técnica de análise genética ainda é recente, caro e, necessita mais pesquisas para se chegar a uma maneira mais rápida e, de menor custo para análise.

Atualmente esta análise genética está sendo realizada em protocolos de pesquisas pois ainda não há um consenso sobre o que fazer quando há ou não a mutação (Couglin SS, 1999).

Existe um envolvimento psicossocial, com aumento da ansiedade e alterações nas relações sociais pelo medo do câncer. Não existe ainda comprovado e eficaz um método para a prevenção primária.

Uma das alternativas que tem sido proposta às portadoras de mutação é a detecção precoce de lesões, através da mamografia de rotina. O tamoxifeno ou raloxifeno para quimioprevenção não está totalmente compreendido o seu uso e, eficácia nas mulheres sem a doença. Tanto a mastectomia profilática como a ooforectomia não previnem totalmente que esta mulher não desenvolva a doença (Cughlin,1999; Malone, 1998).

Mesmo na população judaica Ashkenazi não nos parece indicado o *screening* de massa. O *screening* genético, na pesquisa de mutações nos genes BRCA1 e 2, deverá ser considerado em mulheres com fatores de risco elevado para a doença.(Hopper, 1999). Principalmente a história pessoal e familiar de primeiro grau para câncer de mama. Se sabe que quanto maior o número de familiares em 1º grau acometidos por câncer, maior será o risco de ter uma predisposição genética. (Cornelis RS,1995).

Além da história familiar também são considerados fatores de risco para prever a chance de encontrarmos mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, quando estiver presente um ou mais desses achados na história familiar: a) presença de múltiplos casos de câncer de mama diagnosticados em mulheres jovens (abaixo de 45 anos); b) casos de câncer de ovário na família; c) câncer de mama e ovário na mesma paciente; d) câncer de mama bilateral; e) descendência Ashkenazi; f) homem com câncer de mama (BRCA2). (Couch et al. 1997)

A análise por SSCP foi viável, embora ela exija um controle positivo, sendo ideal que a mesma possa ser confirmada através do seqüenciamento do gene (Couchlin SS, 1999).

Muitos estudos ainda serão necessários para desvendarmos os riscos para o desenvolvimento do câncer.

Este trabalho serviu de impulso para qualificar o laboratório de biologia molecular, no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, para análise de genes, envolvidos na carcinogênese. Outros tipos de canceres, além do câncer de mama, puderam beneficiar-se das estratégias propostas neste trabalho.

Sabendo que existem até agora mais de 200 mutações descritas no gene BRCA1, fica difícil a detecção, através de um único teste sensível e específico. É também possível a existência de mutações que possam não conferir o aumento de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (polimorfismos) (Kahn, 1996).

Um resultado negativo no teste genético para o BRCA1 não confere proteção para a mulher, visto que sabemos da existência de outros genes associados com o aumento do câncer de mama (p53, BRCA2), assim como, a grande maioria dos tumores de mama não são herdados geneticamente, e, sim, esporádicos, multifatorial, o que corresponde a um risco estimado de 12.5%, durante a vida.

Um resultado positivo é questionável pelo fato de não existir uma prevenção primária, podemos apenas oferecer a detecção precoce. (Kahn, 1996)

Certamente este será um trabalho inicial e esperamos continuar na busca de informações e conhecimentos para termos um dia a possibilidade de praticarmos o diagnóstico precoce desta doença com vistas a prevenção primária.

Uma estratégia ideal seria a análise, nesta mesma amostra, das outras duas mutações (5382insC no BRCA1 e 6174delT no BRCA2), também comuns em mulheres Ashkenazi, para que possamos identificar a frequência das mesmas na nossa população, em comparação com dados obtidos na literatura internacional.

8 RESUMO

No Brasil, segundo estimativa do INCA para o ano 2000, o câncer de mama atingirá 28.340 mulheres, resultando em 8.245 mortes. A observação epidemiológica de que mulheres judias podem ser mais vulneráveis ao câncer de mama está sendo agora comprovada e, explicada pela análise do DNA dos genes BRCA1 e BRCA2.

Conforme dados da literatura cerca de uma em cada 100 mulheres judias Ashkenazi é portadora da mutação denominada 185delAG em BRCA1.

Este estudo de prevalência teve como objetivos verificar a frequência, através da análise molecular por SSCP, da mutação genética 185delAG no gene BRCA1 em 275 participantes e, delinear, em relação a diversas variáveis, o perfil de 306 mulheres judias Ashkenazi de Porto Alegre, maiores de idade, independente da história pessoal ou familiar para câncer de mama.

Apenas uma das 260 mulheres judias Ashkenazi de descendência pura, dos ambos genitores, apresentou esta deleção específica.

São discutidas a técnica utilizada para análise do DNA e as perspectivas futuras relacionadas com a genética e, câncer de mama.

9 ABSTRACT

In Brazil, according to an estimate of INCA (National Cancer Institute) for 2000, breast cancer will affect 28,340 women, resulting in 8,245 deaths (source: INCA 2000). Epidemiological observation that Jewish women may be more vulnerable to breast cancer is now being proved and explained by DNA analysis of BRCA1 and BRCA2 genes (Cornelis RS, et al. 1995; Egan KM, et al., 1996; Berman DB, et al., 1996).

According to the literature, about one from 100 Jewish Ashkenazi women has a mutation named 185delAG in BRCA1.

The objectives of this prevalence study were to verify frequency through the SSCP molecular analysis of the genetic mutation 185delAG in BRCA1 in 275 participants and, to delineate, according to several variables, the profile of 306 Jewish women in Porto Alegre, aged over 18 and unselected for breast cancer family history.

The present work also discusses the technique used for DNA analysis and future perspectives related to genetics and breast cancer.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andersen-TI. Genetic heterogeneity in breast cancer susceptibility. *Acta-Oncol.* 1996; 35(4): 407-10
2. Berman DB; Costalas J; Schultz DC; Grana G; Daly M; Godwin AK. A Common Mutation in BRCA2 That Predisposes to a Variety of Cancers is Found in Both Jewish Ashkenazi and Non-Jewish Individuals. *Cancer Research* 1996; 56(15):3409-3414.
3. Berman DB; Wagner Costalas J; Schultz DC; Lynch HT; Daly M; Godwin AK. Two distinct origins of a common BRCA1 mutation in breast-ovarian cancer families: a
4. Biesecker BB, et al.. Aconselhamento Genético para Famílias com Susceptibilidade Hereditária a Câncer de Mama e Câncer de Ovário. *JAMA-GO* 1994;2:1094-1107.
5. Bilimoria MM, Morrow M. The Woman at Increased Risk for Breast Cancer: Evaluation and Management Strategies. *Ca Cancer J Clin* 1995; 45:263-278.
6. Boyd-M; Harris-F; McFarlane-R; Davidson-HR; Black-DM A human BRCA1 gene knockout [letter] *Nature.* 1995 Jun 15; 375(6532): 541-2.
7. Brumer, A. Identidade em Mudança. Federação Israelita do RGS, 1994.
8. Castilla LH, Couch FJ, Erdos MR, et al.. Mutations in the BRCA1 gene in families with early-onset breast na ovarian cancer. *Nature Genetics* 1994; 8:387-91.
9. Claus EB, Schildkraut J, Iversen ES, Berry D, Parmigiani G. Effect of BRCA1 and BRCA2 on the Association Between Breast Cancer Risk and Family History. *Journal of the National Cancer Institute,* 1998; 90,23: 1824-1829.
10. Clemons M e Goss P. Estrogen and the risk of breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 2001; 344(4): 276-285
11. Cohen, M.M. Statement of the American Society of Human Genetics on Genetic Testing of Breast and Ovarian Cancer Predisposition. *AM J. Hum. Genet* 1994; 55:I-IV.

12. Cornelis RS; Vasen HF; Meijers Heijboer H; Ford D; et-al. Age at diagnosis as an indicator of eligibility for BRCA1 DNA testing in familial breast cancer. *Hum-Genet.* 1995 May; 95(5): 539-44.
13. Couch FJ, Deshano ML, Blackwood A et al.. BRCA-1 mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 1997; 336: 1409-15.
14. Coughlin SS;Khoury MJ;Steinberg KK. BRCA1 and BRCA2 gene mutations and risk of breast cancer. Public health perspectives. *Am J Prev Med*1999; 16(2):91-8.
15. Easton DF; Ford D; Bishop DT; Breast Cancer Likage Consortium. Breast and Ovarian Cancer Incidence in BRCA1-Mutation Carriers. *Am.J.Hum. Genet* 1995; 56(1):265-271.
16. Egan O; Newcomb PA; Longnecker MP; Trentham Dietz A; et al.. Jewish religion and risk of breast cancer Comment in: *Lancet* 1996 Jun 15;347(9016):1638-9 , *Lancet.* 1996 Jun 15; 347(9016): 1645-6
17. FitzGerald-MG; MacDonald-DJ; Krainer-M; Hoover-I; O'Neil-E; Unsal-H; Silva-Arrieto-S; Finkelstein-DM; Beer-Romero-P; Englert-C; Sgroi-DC; Smith-BL; Younger-JW; Garber-JE; Duda-RB; Mayzel-KA; Isselbacher-KJ; Friend-SH; Haber-DA Germ-line BRCA1 mutations in Jewish and non-Jewish women with early-onset breast cancer . *N-Engl-J-Med.* 1996 Jan 18; 334(3): 143-9 .
18. Fodor FH;Weston A;Bleiweiss IJ;McCurdy LD;Walsh MM;Tartter PI;Brower ST;Eng CM.Frequency and carrier risk associated with common BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer patients.*Am J Hum Genet*1998; 63(1):45-51.
19. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA; Goldgar DE; Breast Cancer Linkage Consortium. Risks of Cancer in BRCA1-mutation carries. *Lancet* 1994;343:692-695.
20. Ford D; Easton DF; Peto J. Estimates of the gene frequency of BRCA1 and its contribution to breast and ovarian cancer incidence. *Am-J-Hum-Genet.* 1995 Dec; 57(6): 1457-62

21. Ford, D. et al.. Risk of Cancer in BRCA1 Mutation Carriers. *Lancet* 1994; 343:692-695.
22. Friedman LS, Ostermeyer EA, Szabo CI, Dowd P, et al. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutation linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet* 1994; 8: 399-404.
23. Friedman LS, et al.. The search for BRCA1. *Cancer Research* 1994 Dec 15; 54(24):6374-82.
24. Friedman, L.S. et al.. Cloning BRCA1: Green pigs, Red Herrings and Golden Hoe. *COLD SPRING HARB SYMP QUANT BIOL* 1994; 59:179.
25. Friedman-LS; Szabo-CI; Ostermeyer-EA; Dowd-P; Butler-L; Park-T; Lee-MK; Goode-EL; Rowell-SE; King-MC Novel inherited mutations and variable expressivity of BRCA1 alleles, including the founder mutation 185delAG in Ashkenazi Jewish families. *Am-J-Hum-Genet.* 1995 Dec; 57(6): 1284-97
26. Gail MH; Brinton LA; Byar DP; et al.. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being screened annually. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1879-1886.
27. Ganguly A; Leahy K; Marshall A; Dhulipala R; Godmilow L; Ganguly T. Genetic Testing for Breast Cancer Susceptibility: Frequency of BRCA1 and BRCA2 Mutations. *Genetic Testing* 1997;1(2)85-90.
28. Gayther-SA; Harrington-P; Russell-P; Kharkevich-G; Garkavtseva-RF; Ponder-BA Rapid detection of regionally clustered germ-line BRCA1 mutations by multiplex heteroduplex analysis. UKCCCR Familial Ovarian Cancer Study Group. *Am-J-Hum-Genet.* 1996 Mar; 58(3): 451-6
genetic study of 15 185delAG-mutation kindreds. *Am-J-Hum-Genet.* 1996 Jun; 58(6):1166-76.
29. Hall JM, Lee MK, Newmann B, et al.. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; 250:1684-9.

30. Hopper JL, Jenkins MA. Modeling the probability that ashkenazi jewish women carry a founder mutation in BRCA1 or BRCA2. *Am.J.Hum.Genet*1999; 65:1771-1775.
31. Hoskins K; Weber BL. Recent advances in breast cancer biology. *Curr Opin Oncol.* 1995 Nov; 7(6): 495-500.
32. Instituto Nacional do Câncer – INCA. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer. *Jornal da Febrasgo* 2000;7: 5-10,
33. Kahn P. Coming to Grips With Genes and Risk. *Science* 1996; 274:496-498.
34. King MC, et al.. Câncer de mama e de ovário hereditários. Quais são os riscos? Quais são as escolhas?. *JAMA/GO* 1995 Abril; 3:1485-1496.
35. Lalloo F;Cochrane S;Bulman B;Varley J;Elles R;Howell A;Evans DG.An evaluation of common breast cancer gene mutations in a population of Ashkenazi Jews.*J Med Genet*1998; 35(1):10-2.
36. Langston AA, et al.. BRCA1 Mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 1996; 334:137-142
37. Lerman C, et al.. Interest in Genetic Testing Among First-Degree Relatives of Breast Cancer Patients. *American Journal of Medical Genetics* 1995; 57: 385-392.
38. Lerman C; Lustbader E; Rimer B; Daly M; Miller S; Sands C; Balshem A. Effects of Individualized Breast Cancer Risk Counseling: a Randomized Trial. *Journal of the National Cancer Institute*1995; 87(4): 286-292.
39. Lindblom A, Skoog Lambert, Andersen T, et al.I. Four separate regions on chromosome 17 show loss of heterozygosity in familial breast carcinomas. *Human Genet* 1993;91: 6-12
40. Mackillop WJ, Zhang-Salomons J, Boyd CJ, Groome PA. Associations between community income and cancer incidence in Canada and United States. *Cancer* 2000 Aug 15; 89(4):901-12.

41. Malone KE; Daling JR; Thompson JD; O'Brien CA; et al.. BRCA1 Mutations and Breast Cancer in the General Population. Analyses in Women Before Age 35 and in Women Before Age 45 Years First-Degree Family History. *JAMA*, 1998. 279(12): 922-929.
42. Mann GB; Borgen PI. Breast Cancer Genes and the Surgeon. *Journal of Surgical Oncology* 1998; 67:267-274.
43. Mansukhani MM; Nastiuk KL, Hibshoosh H, et al.. Convenient, Nonradioactive, Heteroduplex-based Methods for Identifying Recurrent Mutations in the BRCA1 and BRCA2 Genes. *Diagnostic Molecular Pathology* 1997; 6(4): 229-237.
44. Marks J. A Second Breast Cancer Susceptibility Gene is Found. *Science* 1996; 271: 30-31.
45. Miki Y; Swensen J; Shattuck-Eidens D; Futreal PA; Harshmann K; Tavtigian S; Liu Qingyiun; et al.I. A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66-71.
46. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 1988, 16:1215.
47. Modan B; Gak E; Sade-Bruchim RB, et al.. High Frequency of BRCA1 185delAG Mutation in Ovarian Cancer in Israel. *JAMA* 1996; 276(22) 1823-1825.
48. Muto, MG; Cramer, DW; Tangir, J; Berkowitz, R; Mok, S. Frequency of the BRCA1 185delAG Mutation among Jewish Women with Ovarian Cancer and Matched Population Controls. *Cancer Research* 1996; 56(6):1250-1252.
49. Neuhausen S, Marshall C. Loss of heterozygosity in Familial Tumors from Three BRCA1-linked Kindreds. *Cancer Research* 1994, 54: 6069-6072.
50. Oddoux-C; Struewing-JP; Clayton-CM; Neuhausen-S; Brody-LC; Kaback-M; Haas-B; Norton-L; Borgen-P; Jhanwar-S; Goldgar-D; Ostrer-H; Offit-K The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. *Nat-Genet.* 1996 Oct; 14(2): 188-90.

51. Offit-K; Gilewski-T; McGuire-P; Schluger-A; Hampel-H; Brown-K; Swensen-J; Neuhausen-S; Skolnick-M; Norton-L; Goldgar-D Germline BRCA1 185delAG mutations in Jewish women with breast cancer [see comments] Comment in: Lancet 1996 Jun 15;347(9016):1638-9. Lancet. 1996 Jun 15; 347(9016): 1643-5.Lancet 1996 Aug 17;348(9025):477
52. Ozcelik H; Antebi YJ; Cole DEC; Andrulis IL. Heteroduplex and protein truncation analysis of the BRCA1 185delAG mutation. Hum Genet 1996; 98: 310-312.
53. Radford DM, Zehnbauser BA. Inherited Breast Cancer. Surgical Clinics of North America. 1996 Apr; 76 (2): 205-221.
54. Richards CS;Ward PA;Roa BB;Friedman LC;Boyd AA;Kuenzli G;Dunn JK;Plon SE. Screening for 185delAG in the Ashkenazim. Am J Hum Genet1997; 60(5):1085-98.
55. Roa-BB; Boyd-AA; Volcik-K; Richards-CS Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2.; Nat-Genet. 1996 Oct; 14(2): 185-7
56. Serova O; Montagna M; Torchard D; et al.. A High Incidence of BRCA1 Mutations in 20 Breast-ovarian Cancer Families. Am.J.Hum. Genet1996; 58:42-51.
57. Shattuck-Eidens D; McClure M; Simard J; et al.. A Collaborative Survey of 80 Mutations in the BRCA1 Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene. JAMA, Feb 1995; 273: 535-541.
58. Simard J; Tonin P; Durocher F; et al.. Common origins of BRCA1 mutations in Canadian Breast and Ovarian Cancer Families. Nature Genetics 1994;8:392-398.
59. Struwing JP; Hartge P;Wacholder S;Baker SM;Berlin M;McAdams M;Timmerman MM;Brody LC;Tucker MA.The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews [see comments]N Engl J Med; 336(20):1401-8 1997.Comment in:\SS\N Engl J Med\SS\1997 May 15;336(20):1448-9. Comment in:\SS\N Engl J Med\SS\1997 Sep 11;337(11):788-9

60. Struewing-JP; Abeliovich-D; Peretz-T; Avishai-N; Kaback-MM; Collins-FS; Brody-LC
The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. Comment in: Nat Genet 1995 Oct;11(2):113-4 Nat-Genet. 1995 Oct; 11(2): 198-200
61. Szabo CI. Inherited breast and ovarian cancer. Human Molecular Genetics 1995; 4:1811-1817.
62. The Human Gene Mutation Database, Cardiff, (www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg)
63. Tonin P. et al.. Linkege analysis of 26 Canadian breast and breast-ovarian cancer families. Human Genetics 1995; 95:545-550.
64. Tonin P; Serova O; Lenoir G; Lynch H; Durocher F; Simard J; Morgan K; Narod S. BRCA1 mutations in Ashkenazi Jewish women [letter] Am J Hum Genet. 1995 Jul; 57(1):189.
65. Weber B. Clinical implications of Basic Research - Suceptibility Gennes For Breast Cancer. The New England Journal of Medicine Dec 1994; 331(22): 1523-1524.
66. Weber BL, et al.. Familial breast cancer. Approaching the isolation of a susceptibility gene. Cancer 1994 Aug 1; 74 (3-Suppl):1013-20.
67. Weitzel JN; Patel J; Smith DM; Goodman A; Safaii H; Ball H. Molecular Genetic Changes Associated with Ovarian Cancer. Gynecologic Oncology 55, 245-252, 1994.
68. Wooster R et al., Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. Sience 1994 Sep; 265:2088-90.
69. Wooster-R; Stratton-MR Breast cancer susceptibility: a complex disease unravels. Trends-Genet. 1995 Jan; 11(1): 3-5

11. ANEXO 1 QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO PREENCHIDO PELAS PARTICIPANTES

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE MULHERES JUDIAS ASHKENAZI,
DA POPULAÇÃO PORTO ALEGRENSE, EM RELAÇÃO A MUTAÇÃO GENÉTICA ESPECÍFICA PARA CÂNCER DE MAMA
ANAMNESE 01.data: ___/___/___ 02.nº da ficha: N° _____

03.Nome: _____

04.Idade: _____ ANOS 05.Data de nascimento: ___/___/___ 06.Peso: _____ Kg 07.Altura: _____ cm

08.Naturalidade: _____ 09.Profissão: _____

10.Endereço: _____ 11.CEP: _____

12.Bairro: _____ 13.Município: _____ 14.Estado: _____

15.Fone residencial/contato: _____ 16.Fone comercial: _____

Origem Judaica(se é ashkenazi): 17.Materna- _____ 18.Paterna- _____

19.Idade da 1ª menstruação: _____ ANOS 20.Data do início da última menstruação: ___/___/___

21.Padrão menstrual: REGULAR IRREGULAR 22.Idade Menopausa: _____ ANOS

23. Foi Espontânea Cirúrgica 24. Fez ou faz Reposição Hormonal: SIM NÃO

25.Duração: _____ ANOS _____ MESES 26.Nome do hormônio: _____

27.Nº gestações: _____ 28.Nº de partos/cesáreas: _____ 29.Nº de abortos: _____

30. Usa ou já usou anticoncepcional oral? SIM NÃO 31.idade de início do uso do ACO: _____ ANOS

32. Quanto tempo usa/usou: _____ ANOS _____ MESES 33.Nome do ACO: _____

34.Se não engravidou, a causa é: INFERTILIDADE OPÇÃO PRÓPRIA

35. Fez tratamento para poder engravidar?: SIM NÃO 36.Qual: _____

37.Idade do 1º Parto: _____ ANOS 38.Idade do Último Parto: _____ ANOS

39.Amamentou?: SIM NÃO 40. Quanto tempo amamentou?: _____ MESES

41. Já teve alguma doença benigna na mama?: SIM NÃO 42.idade: _____ anos 43.Qual: _____

44. Já teve câncer de mama: SIM NÃO 45.idade: _____ anos 46. Qual: _____

47.Já teve outro tipo de câncer: SIM NÃO 48.idade: _____ anos 49. Qual: _____

50. Na sua família tem história de câncer?: SIM NÃO 51.Número de casos: _____

PARENTESCO:	P:	P:	P:	P:
IDADE DIAGNÓSTICO:	I:	I:	I:	I:
TIPO DE CÂNCER:	T:	T:	T:	T:

52. Fuma ou fumou: SIM NÃO 53.Tempo de fumante: _____ ANOS

54. Consumo de álcool: DIÁRIO EVENTUAL NUNCA 55.Há Quanto Tempo: _____ ANOS

56. Uso regular de café, coca-cola, chá preto: SIM NÃO

57.Medicamentos que usa regularmente: QUAIS?: _____

58.Uso Regular de Tranquilizantes: SIM NÃO QUAIS: _____

59.Quantas vezes? _____ ANO _____ MÊS _____ SEMANA

60. Consumo Regular de Vitaminas nos Últimos dez anos: SIM NÃO

61. Consumo de Frutas há 1 Ano atrás: DIÁRIO 4 A 6 DIAS/SEMANA 1 A 3 DIAS/SEM

RARAMENTE

62. Consumo de Legumes há 1 Ano atrás: DIÁRIO 4 A 6 DIAS/SEMANA

1 A 3 DIAS/SEM RARAMENTE

63. Consumo de Verduras há 1 Ano atrás: DIÁRIO 4 A 6 DIAS/SEM.

1 A 3 DIAS/SEM.

RARAMENTE

64. Consumo de Carnes durante a Adolescência: DIÁRIO 4 6 DIAS/SEM.

1 A 3 DIAS/SEM.

RARAMENTE

65. Nº de Abreugrafias e RX de Torax realizados até os 20 Anos: _____ 66.Peso aos 18 Anos _____ Kg

67. Nº do Soutien que usava aos 18 Anos: _____

12. ANEXO 2 CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO PREENCHIDO PELAS PARTICIPANTES QUE FIZERAM A DOAÇÃO DE SANGUE PARA ANÁLISE DO DNA

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE MULHERES JUDIAS ASHKENAZI, DA POPULAÇÃO PORTO ALEGRENSE EM RELAÇÃO A MUTAÇÃO GENÉTICA ESPECÍFICA PARA CÂNCER DE MAMA

FICHA Nº _____

A observação de que mulheres judias podem ser mais vulneráveis ao câncer de mama está sendo agora comprovada e explicada pela análise do DNA do gene BRCA1. Pesquisas realizadas em 858 judeus de origem Ashkenazi, demonstram que uma única mutação é responsável pela grande maioria dos casos. Uma em cada 100 mulheres judias Ashkenazi apresentam esta mutação única e específica no gene BRCA1, denominada 185delAG. Isto significa em termos práticos, que para este subgrupo de mulheres, o screening para câncer de mama por análise de DNA já é perfeitamente viável. Assumindo que quem apresentar esta mutação tenha um risco de 90% de desenvolver o câncer, esta única mutação poderia responder por 16% dos cânceres de mama em mulheres judias Ashkenazi com menos de 50 anos de idade.

Será realizado um estudo nas mulheres judias, da comunidade judaica Ashkenazi de Porto Alegre, com a finalidade de verificar a presença da mutação específica, citada em vários estudos que sugerem estar relacionada ao risco aumentado de desenvolver câncer de mama.

Para tal necessitamos o seu consentimento em participar deste estudo.

A análise do DNA, em busca do gene BRCA1, se fará através da coleta de 15 ml de sangue total que deverá ser submetido a separação dos leucócitos e posterior congelamento.

Fica garantido que qualquer dúvida a respeito da pesquisa em andamento será esclarecido.

Fica também garantido o sigilo em relação a identificação bem como as informações relacionada a sua privacidade.

PORTO ALEGRE, de de 19.....

Eu,,

RG..... fui informada dos objetivos especificado acima e da justificativa da pesquisa, de forma clara e detalhada. Reccebi informações sobre o procedimento no qual estarei envolvida, dos desconfortos ou riscos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e terei a liberdade de retirar o meu consentimento de participação na pesquisa, face a estas informações.

A(O) profissional certificou-me de que as informações por mim fornecidas terão caráter confidencial.

Fui informada que caso existam danos a minha saúde, causado diretamente pela pesquisa, terei o direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei.

Ciente da Metodologia a ser empregada na pesquisa, bem como a sua posterior publicação.

Endereço:

CEP: -

Assinatura da paciente:

Assinatura do investigador:

Assinatura do orientador:

13. ARTIGOS REDIGIDOS E PUBLICADOS

**EPIDEMIOLOGIC STUDY AND ANALYSIS OF THE 185delAG
MUTATION IN THE BRCA1 GENE OF ASHKENAZI JEWISH WOMEN
FROM PORTO ALEGRE**

- **ELEONORA SOUZA DIAS, SANDRA LEISTNER, MAIRA CALEFFI, ANA PAULA
BOHN KASPARY, ROBERTO GUIGLIANI**

ABSTRACT

Transversal study that constituted of epidemiologic analysis of 306 Ashkenazi Jewish women from Porto Alegre, older than 18 years old, independent of personal or family history for cancer. Also, molecular analysis of the 185delAG mutation in the BRCA1 gene for 275 participants was performed. Epidemiologic findings were not statistically different from the general population and only one of the 260 Ashkenazi Jewish women from both genitors, carries this specific deletion.

KEYWORDS: BREAST CANCER, BRCA1 GENE, 185delAG MUTATION, JEWISH ASHKENAZI WOMEN

INTRODUCTION

In Brazil, according to an estimate of INCA (National Cancer Institute) for 2000, breast cancer will affect 28,340 women, resulting in 8,245 deaths (source: INCA 2000). Epidemiological observation that Jewish women may be more vulnerable to breast cancer is now being proved and explained by DNA analysis of BRCA1 and BRCA2 genes (Cornelis RS, et al 1995; Egan KM, et al, 1996; Berman DB, et al, 1996).

According to the literature, approximately 1 out of 100 Ashkenazi Jewish women has a mutation named 185delAG in BRCA1. It is estimated that 185delAG mutation is found in 16% of breast cancers, and in 39% of ovarian cancers in Jewish Ashkenazi women (Struewing, 1995; Muto, 1996; Modan B, et al, 1996). Besides, nearly 20% of Ashkenazi women with breast cancer presented this mutation. (Struewing, 1995, Muto, 1996; FitzGerald MG, et al, 1996; Richards CS, et al, 1997; Claus EB, et al 1998).

185delAG mutation consists of a deletion (loss) of two base pairs, Adenine and Guanine, at positions 185 and 186, codon 23, exon 2 of BRCA1 gene. It deviates the pattern of the genetic code reading and causes an early termination at codon 39. (Struewing, 1995. Tonin P, 1995. Shattuck-Eidens, 1995; Muto, 1996; Lagston et al, 1996; Ozcelik H, et al, 1996).

Other mutations, named 5382insC in BRCA1 gene and 6174delIT in BRCA2 gene were also observed with a relatively high prevalence in Jewish population. (Roa, 1996; Struewing, 1997; Oddoux C, 1996). (table 1)

The aim of this transversal study was to verify the frequency of the 185delAG mutation in 275 women by SSCP analysis and, to delineate, according to several variables, the profile of 306 Jewish women in Porto Alegre, aged over 18 and unselected for breast cancer family history.

The present work also discusses the technique used for DNA analysis and future perspectives related to genetics and breast cancer.

METHODS

The population studied was composed of an initial sample of 330 Jewish women, independently of having breast cancer or not, who voluntarily agreed in participating of the study. After having answered a questionnaire with epidemiological information, they signed a post-information agreement term for blood collection to be used in the analysis of 185delAG mutation in BRCA1 gene.

Women under 18, or who did not have Ashkenazi origin (adopted or Sepharadi) and yet, those who did not answer the epidemiological questionnaire completely were excluded of the work.

Blood samples were collected in tubes with EDTA, 5 to 15 ml of total blood were withdrawn and frozen at -20°C for later DNA extraction, according to Miller and Cols' salting-out procedure (1998). The DNA was submitted to an amplification by PCR using primers described bellow which are specific for exon 2. (Simard, 1994)

Primer 1: 5' GAA GTT GTC ATT TTA TAA ACC TTT 3' – exon 2 F

Primer 2: 5' TGT CTT TTC TTC CCT AGT ATG T 3' – exon 2 R

Molecular analysis using SSCP is a rapid method for detection of changes in small DNA fragments.

RESULTS

A total of 330 women from the Jewish community of Porto Alegre answered an epidemiological questionnaire, 287 had their blood collected for DNA analysis.

Women under 18 years old were excluded from the work, as well as those who did not supply enough identification in the questionnaire, and who were not Ashkenazi descended.

After exclusion, 306 questionnaires were included in the epidemiological analysis. Research on mutation 185delAG by molecular analysis was carried out in 275 blood samples. Therefore, results were divided into two main analysis: epidemiological and molecular.

EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS

Women aged 19 to 77 years, with mean and median at 41 to 50 years. Body Mass Index (BMI) ranged from 16 to 41, considering obesity when higher 30. Mean and median of MC were 24 and 23 respectively. Regarding Jewish origin, 291 had Ashkenazi origin from both parents, the others were mixed.

From 291 participants with Ashkenazi origin from both parents, 260 had their blood analyzed, the other 31 took part only in the epidemiological analysis.

Menarche ranged 9 to 18, with average age 12,2 years old. A total of 216 women (70,6%) takes or took oral contraceptives, starting on average at 23 and median at 21. Average time of use was 7, 8 years. 126 were in menopause period, started on average at 48.6 years and median at 50, with variation of 37 to 58 years old. 92 participants had spontaneous menopause (30,1%) and 34 said to have had surgical menopause (11,1%). 89 women took Hormone Replacement Therapy (HRT), being that 33,7% suspended the use in the first year of treatment and 6,74% took hormones for up to 5 years. The average time of use was 4,2 years and median of 2 years. 8,98% had continuous use for more than 10 years.

260 participants had been pregnant, mean was 2,6 and median 3 gestations. 28 of these undertook a hormone treatment to have babies. In relation to the number of childbirth, mean and median were 1,8 and 2 respectively. The average age of the first parturition was 24. Only 14 participants had the first baby after the age of 30(5,8%).

225 participants breast-fed (86,5% of those who were pregnant), with mean time 7 months and median 5 months.

51 women had some kind of benign mammal pathology, being that most common ones were the presence of solid nodes (17 cases), breast cysts (12 cases), mastitis (4 cases) and mastopathy/malformation (4 cases).

A total of 217 participants (70,9%) reported to have some relative (1st, 2nd, and 3rd degree) with some kind of cancer. Main places were breast (147 cases), lung (35 cases), gastrointestinal (88 cases) and skin (26 cases). Participants of this study were divided into subgroups according to their familial history for breast cancer.

Group A: those who had of 1st degree relatives with cancer, including 71 women (23,2%).

Group B: those who had of 1st and 2nd degree relatives with history of cancer, including 18 women (5,9%)

Group C: those who had of 1st, 2nd, and 3rd degree relatives, including 20 women (6,5%).

Group D: only of 2nd degree, including 36 women (11,8%)

Group E: 1st and 2nd degree, including 24 women (7,8%)

Group F: only 3rd degree, including 48 women (15,7%)

Group H: without family history of Cancer, 89 women (29,1%)

MOLECULAR ANALYSIS

From 275 samples analyzed, only one showed similarity to the positive control for the 185delAG mutation after sscp analysis (figure 1).

To confirm the results obtained, the DNA sample was also analyzed by automated sequencing.

DISCUSSION

This transversal study is an epidemiological analysis of 306 women of the Ashkenazi Jewish community of Porto Alegre. In general, we did not find any increased risk factor for the development of breast cancer.

Menarche under 12, current age, previous benign pathology, first parturition after the age of 30, familial history of breast cancer in relatives of 1st degree (mother, sister, daughter) were considered the main factors for the increase of breast cancer risk. Obesity, moderate or abusive drinking of alcohol, and HRT administration for more than 10 years were also cited as risk enhancing.

In our sample, average age of participants was 41-50 years. Average menarche was not precocious (12,2 years). 84,9% of participants had babies, and breast-feeding rate was high, that is, 86,5%. Average menopause was not late either (48,6 years), and from women who used Hormones Replacement Therapy, only 8,9% took it for a period over 10 years.

From 70,9% that had any relative with cancer history, 147 had breast cancer history in the family and only 47 (15,35%) had breast cancer in a relative of first degree. Only 7 (2,28%) of the 15 who had ovarian cancer history in the family were 1st degree relatives.

Only 12, which corresponds to 3,9% of participants, had a personal history of breast or ovarian cancer (11 breast and 1 ovarian), which would be related to a higher risk rate of presenting genetic change in BRCA1 gene.

In relation to the molecular analysis 275 blood samples were studied, only one woman with 185delAG mutation in BRCA1 gene was found. From these, 260 were Jewish Ashkenazi women descended from both parents, that is, mutation happened in 0,33%.

This participant presented a positive familial history for breast cancer. She had an identical sister, diagnosed at the age of 50. There were also other 2 cases of cancer in the family, a brother with pancreatic cancer at the age of 58 and another sister with melanoma at the age of 50. Concerning other factors for breast cancer risks, this participant was at the age

of 54, she is Ashkenazi Jewish descended of both genitors, presented menarche at 14, and had two children. Her first pregnancy was at the age of 26, and she nursed for 1 month. She used contraceptive hormones during 16 years, beginning at age 24. She never had personal history of breast benign disease, she was not smoker, and healthy until the moment of blood collection (in 1996) and she was never obese (BMI 20,6).

Therefore, as main risk factors for breast cancer, patient presented age (54 years old) and a positive familiar history for breast cancer, her monozygotic sister at the age of 50.

According to literature finds, 185delAG mutation frequency in our study was below statistics of other works. That may be because our sample was small. However, as it was a work comprehending a technique standardization, using a sample that had never been analyzed in our environment, we consider this result satisfactory. (table 3)

We highlight that this research analyzed only 185delAG mutation, and that in this Jewish population the presence of other two mutations are also frequent, as well as many other mutations existent in these genes, which were not evaluated. (Roa BB, Nature Genetics 14, 1996).

Currently, this genetic analysis has been carried out in research protocols because there is not a consensus about what do when the mutation is present or absent. (Coughlin SS, 1999)

There is a psychosocial involvement, with anxiety increase and alterations in social relations because of cancer fear. An efficient method for primary prevention has not been proved yet. What has been proposed for women who present mutation, is the early detection of lesions through mammography, use of tamoxifen or raloxifen for chemical prevention. Administration of these drugs is not totally confirmed as efficient in the treatment of women with this illness. And, even prophylactic mastectomies as well as Oophorectomy do not prevent this women from developing the disease (Cughlin, 1999; Malone, 1998).

Even in the Jewish Ashkenazi population, mass screening does not seem indicated. Genetic screening, in the research of mutation in BRCA1 and 2 genes must be considered for women with high risk factors for the disease (Hopper JL, 1999), such as personal and familial history of first degree relatives for breast cancer. We are aware that the higher the number in relatives of first degree with cancer, the higher will be the risk of having a genetic predisposition. (Cornelis RS, 1995).

Besides familial history, there are other risk factors to consider when we want to predict the chance of founding mutations in genes BRCA1 and BRCA2. When one or more of this aspects are found in the familial history: a) presence of multiple breast cancer cases diagnosed in young women (under 45); b) cases of ovarian cancer in the family; c) breast and ovarian cancer in the same patient; d) bilateral breast cancer; e) Ashkenazi origin ; f) male with breast cancer (BRCA2) (Couch et al 1997).

SSCP analysis was feasible, although it requires a positive control. It is important that it can be confirmed through the gene sequencing (Couchin SS am J of Preventive Medicine, 1999).

A negative result in the genetic test for BRCA1 does not protect women once we know there are other genes associated with the increase of breast cancer cases (p53, BRCA2), as well as the great majority of breast tumors are not genetically inherited but occasional, multifactorial , which corresponds to an estimated risk of 12,5% during life. A positive result is also doubtful because as we don't have a primary prevention yet, we can only offer an early detection (Kahn, 1996).

Many works will have to be developed yet until we clear up the risks of cancer development.

TABLE 1: Frequency of common mutations in the Ashkenazi Jewish population

Gene	Mutation	Frequency in Jewish Ashkenazi
BRCA 1	185delAG	1,0 %
	5382insC	0,1 %
BRCA2	6174delT	1.4 %

TABLE 2: Familial history for cancer in general

Familial history	Frequency	Percent (%)	Cum
A= 1 st DEGREE	71	23,2	23,2
B= 1 st E 2 nd DEGREES	18	5.9	29.1
C= 1 st ,2 nd and 3 rd DEGREES	20	6.5	35.6
D- 2 nd DEGREE	36	11.8	47.4
E= 2 nd and 3 rd DEGREES	24	7.8	55.2
F= 3 rd DEGREE	48	15.7	70.9
H= WITHOUT HF	89	29.1	100.0
Total	306	100.0%	

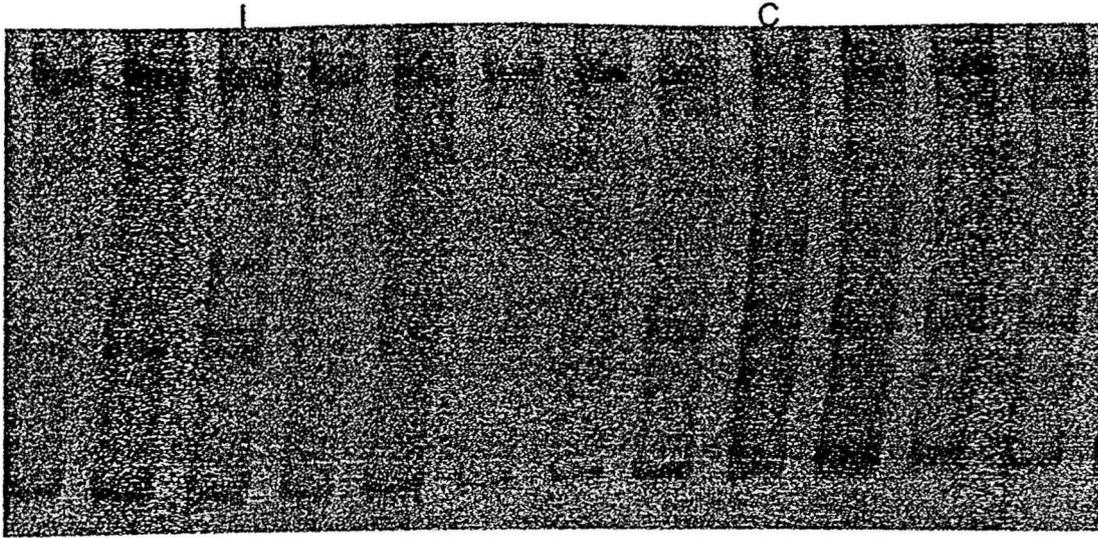


Figure 1: Analysis by SSCP of a fragment of exons 2 of BRCA1 gene amplified by PCR (polymerase chain reaction).

Letters I and C indicate individuals with mutation and positive control, respectively. Similarities in the band pattern may be observed in the two samples bellow.

Table 3: Frequency of 185delAG mutation in different literature reports

Author	Number of samples	Number of 185delAG mutation	Percentage (%)
Dias ES – 2001	260	1	0.38%
Struwing JP – Nature Genetics 11, 1995	858	8	0.9%
Roa BB – Nature Genetics, 1996	3108	34	1.09%

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

1. Berman DB; Costalas J; Schultz DC; Grana G; Daly M; Godwin AK. A Common Mutation in BRCA2 That Predisposes to a Variety of Cancers is Found in Both Jewish Ashkenazi and Non-Jewish Individuals. *Cancer Research* 1996;56(15):3409-3414.
2. Berman DB; Wagner Costalas J; Schultz DC; Lynch HT; Daly M; Godwin AK. Two distinct origins of a common BRCA1 mutation in breast-ovarian cancer families: a genetic study of 15 185delAG-mutation kindreds. *Am-J-Hum-Genet.* 1996 Jun; 58(6): 1166-76
3. Claus EB, Schildkraut J, Iversen ES, Berry D, Parmigiani G. Effect of BRCA1 and BRCA2 on the Association Between Breast Cancer Risk and Family History. *Journal of the National Cancer Institute*, 1998; 90,23: 1824-1829.
4. Comelis-RS; Vasen-HF; Meijers-Heijboer-H; Ford-D; van-Vliet-M; van-Tilborg-AA; Cleton-FJ; Klijn-JG; Menko-FH; Meera-Khan-P; et-al Age at diagnosis as an indicator of eligibility for BRCA1 DNA testing in familial breast cancer. *Hum-Genet.* 1995 May; 95(5): 539-44.
5. Egan-KM; Newcomb-PA; Longnecker-MP; Trentham-Dietz-A; Baron-JA; Trichopoulos-D; Stampfer-MJ; Willett-WC Jewish religion and risk of breast cancer Comment in: *Lancet* 1996 Jun 15;347(9016):1638-9 , *Lancet.* 1996 Jun 15; 347(9016): 1645-6
6. FitzGerald-MG; MacDonald-DJ; Krainer-M; Hoover-I; O'Neil-E; Unsal-H; Silva-Arrieto-S; Finkelstein-DM; Beer-Romero-P; Englert-C; Sgroi-DC; Smith-BL; Younger-JW; Garber-JE; Duda-RB; Mayzel-KA; Isselbacher-KJ; Friend-SH; Haber-DA Germ-line BRCA1 mutations in Jewish and non-Jewish women with early-onset breast cancer . *N-Engl-J-Med.* 1996 Jan 18; 334(3): 143-9
7. Gail MH; Brintonn LA; Byar DP; et al. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being screened annually. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1879-1886.

8. Instituto Nacional do Câncer – INCA. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer. *Jornal da Febrasgo* 2000;7, 5-10.
9. Langston AA, et al. BRCA1 Mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 1996; 334:137-142.
10. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 1988, 16:1215.
11. Muto, MG; Cramer, DW; Tangir, J; Berkowitz, R; Mok, S. Frequency of the BRCA1 185delAG Mutation among Jewish Women with Ovarian Cancer and Matched Population Controls. *Cancer Research* 1996; 56(6):1250-1252.
12. Oddoux-C; Struewing-JP; Clayton-CM; Neuhausen-S; Brody-LC; Kaback-M; Haas-B; Norton-L; Borgen-P; Jhanwar-S; Goldgar-D; Ostrer-H; Offit-K The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. *Nat-Genet.* 1996 Oct; 14(2): 188-90
13. Ozcelik H; Antebi YJ; Cole DEC; Andrulis IL. Heteroduplex and protein truncation analysis of the BRCA1 185delAG mutation. *Hum Genet* 1996;98: 310-312.
14. Roa-BB; Boyd-AA; Volcik-K; Richards-CS Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2.; *Nat-Genet.* 1996 Oct; 14(2): 185-7
15. Shattuck-Eidens D; McClure M; Simard J; et al. A Collaborative Survey of 80 Mutations in the BRCA1 Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene. *JAMA*, Feb 1995; 273: 535-541.
16. Struewing JP; Hartge P; Wacholder S; Baker SM; Berlin M; McAdams M; Timmerman MM; Brody LC; Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews [see comments] *N Engl J Med*; 336(20):1401-8 1997. Comment in: *N Engl J Med* 1997 May 15;336(20):1448-9. Comment in: *N Engl J Med* 1997 Sep 11;337(11):788-9

17. Struewing-JP; Abeliovich-D; Peretz-T; Avishai-N; Kaback-MM; Collins-FS; Brody-LC The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. Comment in: Nat Genet 1995 Oct;11(2):113-4 Nat-Genet. 1995 Oct; 11(2): 198-200
18. Tonin P. et al. Linkege analysis of 26 Canadian breast and breast-ovarian cancer families. Human Genetics 1995;95:545-550.
19. Tonin P; Serova O; Lenoir G; Lynch H; Durocher F; Simard J; Morgan K; Narod S. BRCA1 mutations in Ashkenazi Jewish women [letter] Am J Hum Genet. 1995 Jul. 57(1):189.

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E PESQUISA DA MUTAÇÃO
185delAG NO GENE BRCA1 EM MULHERES JUDIAS ASHKENAZI
DE PORTO ALEGRE**

- **AUTORES: ELEONORA SOUZA DIAS, SANDRA LEISTNER, MAIRA CALEFFI,
ANA PAULA BOHN KASPARY, ROBERTO GUIGLIANI**
- **SERVIÇO ONDE FOI REALIZADO O TRABALHO: SERVIÇO DE GENÉTICA
MÉDICA DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE E PÓS GRADUAÇÃO
EM CLÍNICA MÉDICA NA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL.**
- **ENDEREÇO DO AUTOR PRINCIPAL: ELEONORA SOUZA DIAS – RUA BORORÓ
301 – VILA ASSUNÇÃO – PORTO ALEGRE – RS – CEP: 91900-540.**

- **RESUMO** : Estudo transversal que constituiu de análise epidemiológica de 306 mulheres judias Ashkenazi de Porto Alegre, maiores de idade, independente da história pessoal ou familiar para câncer de mama e da análise molecular da mutação genética 185delAG no gene BRCA1 em 275 participantes. Os dados epidemiológicos não diferem da população em geral e apenas uma das 260 mulheres judias Ashkenazi de descendência pura, dos ambos genitores, possui esta deleção específica.
- **UNITERMOS**: CÂNCER DE MAMA, GENE BRCA1, MUTAÇÃO 185delAG, POPULAÇÃO JUDAICA ASHKENAZI

**EPIDEMIOLOGIC STUDY AND RESEARCH OF THE 185delAG
MUTATION IN THE BRCA1 GENE OF ASHKENAZI JEWISH
WOMAN FROM PORTO ALEGRE**

- **ABSTRACT:** Transversal study that constituted of epidemiologic analysis of 306 Ashkenazi jewish women from Porto Alegre, who were after 18 yers old, independent of personnel or family history for cancer. Also, molecular analysis of the 185delAG mutation in the BRCA1 gene for 275 participants. Was prefermed epidemologic is not statistically different from the general population and only one of the 260 Ashkenazi Jewish women from both genitors, carries this specific deletion.
- **KEYWORDS:** BREAST CANCER, MUTATION IN BRCA1, 185delAG, JEWISH ASHKENAZI

INTRODUÇÃO

No Brasil, segundo estimativa do INCA para o ano 2000, o câncer de mama atingirá 28.340 mulheres, resultando em 8.245 mortes (Dados do Instituto Nacional do Câncer – INCA - 2000). A observação epidemiológica de que mulheres judias podem ser mais vulneráveis ao câncer de mama está sendo agora comprovada e explicada pela análise do DNA dos genes BRCA1 e BRCA2 (Cornelis RS, et al 1995; Egan KM, et al, 1996; Berman DB, et al, 1996).

Conforme dados da literatura cerca de uma em cada 100 mulheres judias Ashkenazi é portadora da mutação denominada 185delAG no gene BRCA1. É estimado que a mutação 185delAG seja encontrada em cerca de 16% dos cânceres de mama e em 39% dos cânceres de ovário em mulheres judias Ashkenazi (Struewing, 1995; Muto, 1996; Modan B, et al, 1996). Além disto, aproximadamente 20% das mulheres Ashkenazi com câncer de mama, diagnosticado abaixo dos 42 anos também apresentam esta mutação. (Struewing, 1995, Muto, 1996; FitzGerald MG, et al, 1996; Richards CS, et al, 1997; Claus EB, et al 1998)

Outras mutações, denominadas 5382insC no gene BRCA1 e 6174delT no gene BRCA2 também foram observadas com uma prevalência relativamente alta na população judaica (Roa, 1996; Struewing, 1997; Oddoux C, 1996). (tabela1)

Este estudo transversal teve como objetivos verificar a frequência, através da análise molecular por SSCP, da mutação genética 185delAG no gene BRCA1 em 275 participantes e, delinear, em relação a diversas variáveis, o perfil de 306 mulheres judias Ashkenazi de Porto Alegre, maiores de idade, independente da história pessoal ou familiar para câncer de mama.

São discutidos a técnica utilizada para análise do DNA e as perspectivas futuras relacionadas a genética e câncer de mama.

MÉTODOS

A população do estudo foi constituída de uma amostra inicial com 330 mulheres judias que participaram voluntariamente, independente de serem portadoras ou não de câncer mamário. Após responderem ao questionário com informação epidemiológica, assinaram termo de consentimento pós-informação para coleta de sangue, para análise da mutação 185 delAG, no gene BRCA1.

Foram excluídas do trabalho aquelas que eram menores do que 18 anos, ou que não tinham origem Ashkenazi (adotivas ou Sepharadi) e ainda, aquelas que não responderam completamente ao questionário epidemiológico.

As amostras de sangue foram coletadas em tubos com EDTA, retirados de 5 a 15 ml de sangue total que foram congelados a -20°C para posterior extração do DNA, conforme técnica de precipitação com sais (*salting-out*), adaptado de Miller e cols (1988). O DNA extraído foi submetido a amplificação do exon 2 do gene BRCA1, a partir dos primers (iniciadores da reação) descritos por Simard, 1994.

A análise molecular utilizando SSCP é um método rápido de triagem para a detecção de alterações presentes em pequenos fragmentos de DNA.

RESULTADOS

Um total de 330 mulheres da comunidade judaica de Porto Alegre responderam o questionário epidemiológico, dessas, 287 coletaram amostra de sangue para análise do DNA.

Foram excluídas do trabalho as menores de 18 anos, as que não tinham identificação completa no questionário, as que tinham mas não eram de origem Ashkenazi e aquelas que eram adotivas.

Após a exclusão, 306 questionários foram incluídos na análise epidemiológica e em 275 amostras sangüíneas foi realizada a pesquisa da mutação 185delAG por biologia molecular.

Os resultados portanto, foram divididos em duas análises principais: a análise epidemiológica e a análise molecular.

ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA

A idade variou entre 19 e 77 anos, com média e mediana na faixa de 41-50 anos. O índice de massa corporal (IMC) variou de 16 a 41, considerando-se obesidade quando maior que 30. A média e mediana do IMC foram, respectivamente, 24 e 23. Segundo a origem judaica, 291 eram de origem Ashkenazi de ambos genitores, as restantes eram de ascendência mista.

Das 291 participantes com ascendência Ashkenazi por ambos os genitores, 260 tiveram sua amostra de sangue analisado, as 31 restantes só participaram da análise epidemiológica.

A menarca, variou de 9 a 18 anos, com idade média de 12.2 anos. Um total de 216 mulheres (70,6%) usam ou usaram anticoncepcional oral, com início em média aos 23 e mediana de 21 anos e tempo médio de uso 7,8 anos. 126 estavam na menopausa, iniciada em média aos 48.6 anos e mediana de 50 anos, com variação de 37 a 58 anos. Tiveram menopausa espontânea 92 participantes (30,1%) e 34 referiam terem tido

menopausa cirúrgica (11,1%). A TRH foi utilizada por 89 mulheres, sendo que 33,7% suspenderam o uso no primeiro ano de tratamento. 6.74% usaram até 5 anos. O tempo médio de uso de 4,2 anos e mediana de 2 anos. 8.98% fizeram uso contínuo por mais de 10 anos.

Gestaram 260 das participantes e a média de gestações foi de 2.6 gestações e a mediana de 3 gestações. Dessas, 28 fizeram tratamento para engravidar, com uso de hormônios. Em relação ao número de partos, a média e mediana foram, respectivamente, 1.8 e 2. Sendo que a média de idade do primeiro parto foi de 24 anos. Apenas 14 participantes tiveram o primeiro parto após os 30 anos de idade (5.8%).

225 participantes amamentaram (86,5 % das que gestaram) , com tempo médio de 7 meses e mediana 5 meses.

51 mulheres tiveram alguma patologia mamária benigna, sendo que as mais comuns foram a presença de nódulos sólidos (17 casos), cistos de mama (12 casos), mastite (4 casos) e mastopatia/displasia (4 casos).

Um total de 217 participantes (70.9%) relataram algum parente (I, II ou III grau) com algum tipo de câncer. Os principais locais foram mama (147 casos), pulmão (35 casos), aparelho gastro- intestinal (88 casos) e pele (26 casos). As participantes deste estudo foram divididas em subgrupos em relação a história familiar para câncer de mama. (tabela2)

Grupo A: aquelas que só tinham parentes de I Grau com câncer, incluindo 71 mulheres (23,2%).

Grupo B: aquelas que tinham parentes de I e II Graus com história de câncer, incluindo 18 mulheres (5,9%).

Grupo C: aquelas que tinham parentes de I, II e III Graus, incluindo 20 mulheres (6.5%).

Grupo D: só parentes em II Grau, incluindo 36 mulheres (11,8%).

Grupo E: II e III Graus, incluindo 24 mulheres (7.8%).

Grupo F: só III Grau, incluindo 48 mulheres (15,7%).

Grupo H: Sem história Familiar de Câncer, 89 mulheres (29.1%).

ANÁLISE MOLECULAR

Das 275 amostras analisadas, apenas uma conferiu a semelhança no padrão de bandas com o controle positivo, o que podemos declarar como portadora para a mutação 185delAG (figura 1). Para maior confiabilidade dos resultados obtidos por SSCP a amostra de DNA foi também analisada através de seqüenciamento automatizado, o que confirmou este achado.

DISCUSSÃO

Este estudo transversal constituiu em uma análise epidemiológica de 306 mulheres da comunidade judaica Ashkenazi de Porto Alegre, nas quais não foi identificada, em geral, nenhum fator de risco aumentado para o desenvolvimento do câncer de mama.

Foram considerados como fatores principais de aumento de risco para câncer de mama, segundo o modelo desenvolvido por Gail e colaboradores (Gail, et al, 1989) a idade atual, menarca abaixo dos 12 anos, patologia benigna prévia, idade do 1º parto acima dos 30 anos, história familiar de câncer de mama em parentes de 1º grau (mãe, irmã ou filha).

Em nossa amostra a idade média das participantes estava na faixa dos 41 a 50 anos. A menarca média não foi precoce (12.2 anos). 84,9% das participantes gestaram e a idade média do primeiro parto não foi tardia (24 anos). Das mulheres que tiveram filho a taxa de amamentação foi alta, ou seja 86,5% delas amamentaram. A menopausa média também não foi tardia (48.6 anos), e das mulheres que usaram terapia de reposição hormonal apenas 8.9% usaram por um período superior a 10 anos.

Das 70.9% que tiveram algum familiar com história de câncer, 147 tiveram histórico de câncer de mama na família e dessas, apenas 47 (15.35%) tiveram este histórico em parente de 1º grau. Das 15 que tiveram história de câncer de ovário na família, em apenas 7 (2.28%) foram em parentes de 1º grau.

Apenas 12, que corresponde a 3.9% das participantes, tinham uma história pessoal de câncer de mama ou ovário (11 mama e 1 ovário), que estaria relacionada a maior taxa de risco para possuir alteração genética no gene BRCA1.

Em relação a análise molecular foram estudadas 275 amostras sanguíneas e encontrada apenas uma mulher portadora da mutação 185delAG no gene BRCA1.

Das 275 mulheres analisadas por biologia molecular, 260 eram judias Ashkenazi de ambos os genitores, ou seja, a mutação ocorreu em 0.38% das de origem Ashkenazi de ambos os genitores.

Esta participante em especial apresentava uma história familiar positiva para câncer de mama, em irmã gêmea univitelina, diagnosticada na idade de 50 anos. Apresentava também outros 2 casos de câncer na família, um irmão com câncer de pâncreas aos 58 anos e outra irmã com melanoma aos 50 anos. Referente aos outros fatores de risco para câncer de mama esta participante, se encontrava na faixa etária do 54 anos, é judia Ashkenazi de ambos genitores, apresentou menarca aos 14 anos, teve 2 filhos, sendo que a primeira gestação foi aos 26 anos, amamentou apenas 1 mês. Usou hormônios anticoncepcionais durante 16 anos, com início aos 24 anos, nunca teve história pessoal de doença benigna das mamas, não era tabagista, era hígida até o momento da coleta de sangue (em 1996) e nunca foi obesa (IMC 20.6).

Portanto, como fatores principais de risco para câncer de mama, a paciente apresentava a idade (54 anos) e a história familiar positiva para câncer de mama (irmã gêmea univitelina aos 50 anos).

Conforme achados da literatura, a frequência da mutação 185delAG em nosso estudo ficou abaixo das estatísticas de outros trabalhos. Isso talvez possa ser explicado devido a uma amostra inferior àquelas utilizadas. Entretanto, como foi um trabalho que envolveu a padronização de uma técnica, utilizando uma amostra que nunca havia sido analisada em nosso meio, consideramos este resultado satisfatório.

Salientamos que nesta pesquisa foi apenas analisada a mutação 185delAG, e que nesta população judaica já esta definida a presença de outras duas mutações também frequentes e que não foram avaliadas, assim como as outras tantas mutações existentes nestes genes, que não foram avaliadas. (Roa BB, Nature Genetics 14, 1996)

Atualmente esta análise genética está sendo realizada em protocolos de pesquisas pois ainda não há um consenso sobre o que fazer quando é ou não observada a mutação. (Coughlin SS, 1999)

Existe um envolvimento psicossocial, com aumento da ansiedade e alterações nas relações sociais pelo medo do câncer. Não existe ainda comprovado um método eficaz para a prevenção primária. O que tem sido proposto as portadoras de mutação é a detecção precoce de lesões através da mamografia de rotina, o uso de tamoxifeno ou raloxifeno para quimioprevenção, que não está totalmente compreendido o seu uso e eficácia nas mulheres sem a doença. E, mesmo a mastectomia profilática assim como a ooforectomia não previnem que esta mulher desenvolva a doença (Cughlin, 1999; Malone, 1998).

Mesmo na população judaica Ashkenazi não nos parece indicado o *screening* de massa. O *screening* genético, na pesquisa de mutações nos genes BRCA1 e 2, deverá ser considerado em mulheres com fatores de risco elevado para a doença. (Hopper JL, 1999) Principalmente a história pessoal e familiar de primeiro grau para câncer de mama. Se sabe que quanto maior o número de familiares em 1º grau acometidos por câncer, maior será o risco de ter uma predisposição genética. (Cornelis RS, 1995).

Além da história familiar também são considerados fatores de risco para prever a chance de encontrarmos mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, quando estiver presente um ou mais desses achados na história familiar: a) presença de múltiplos casos de câncer de mama diagnosticados em mulheres jovens (abaixo de 45 anos); b) casos de câncer de ovário na família; c) câncer de mama e ovário na mesma paciente; d) câncer de mama bilateral; e) descendência Ashkenazi; f) homem com câncer de mama (BRCA2) (Couch et al 1997).

A análise por SSCP foi viável, embora ela exija um controle positivo, sendo ideal que a mesma possa ser confirmada através do seqüenciamento do gene. (Couchlin SS am J of Preventive Medicine, 1999).

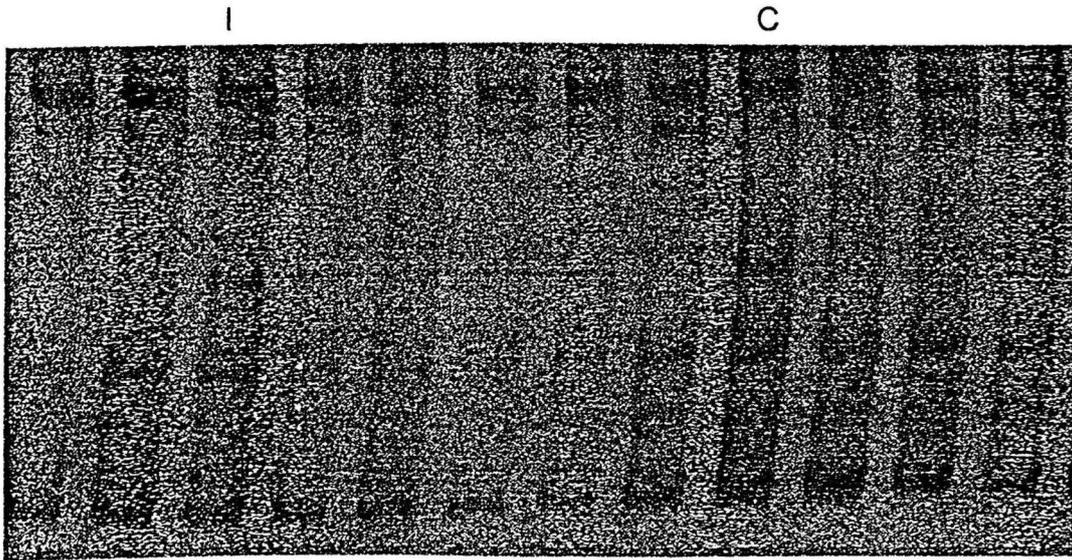
Um resultado negativo no teste genético para o BRCA1 não confere proteção para a mulher visto que sabemos da existência de outros genes associados com o aumento do câncer de mama (p53, BRCA2) assim como a grande maioria dos tumores de mama não são herdados geneticamente e sim esporádicos, multifatorial, o que corresponde a um risco estimado de 12.5%, durante a vida. Um resultado positivo também é questionável pelo fato de que como ainda não temos uma prevenção primária, podemos apenas oferecer a detecção precoce. (Kahn, 1996)

Muitos trabalhos ainda serão necessários para desvendarmos os riscos para o desenvolvimento do câncer.

TABELA 1 : FREQUÊNCIAS DE MUTAÇÕES NA POPULAÇÃO JUDAICA
ASHKENAZI (ROA, 1996)

Gene	Mutação	Frequência em Judeus Ashkenazi
BRCA 1	185delAG	1.0 %
	5382insC	0.1 %
BRCA2	6174delT	1.4 %

Figura 1: Análise por SSCP do fragmento do exons 2 do gene BRCA1 amplificado por PCR



As letras I e C indicam indivíduo portador da mutação e o controle positivo, respectivamente. Uma semelhança no padrão de bandas podem ser observados nestas duas amostras.

TABELA 2. HISTÓRIA FAMILIAR PARA CÂNCER EM GERAL

SGPAR	Freq	Percent	Cum
A= I GRAU	71	23.2	23.2
B= I E II GRAUS	18	5.9	29.1
C= I ,II E IIIGRAUS	20	6.5	35.6
D- II GRAU	36	11.8	47.4
E= II E IIIGRAUS	24	7.8	55.2
F= III GRAU	48	15.7	70.9
H= SEM HF	89	29.1	100.0
Total	306	100.0%	

TABELA 3 : DIFERENTES TRABALHOS E PERCENTAGEM DE MUTAÇÃO 185delAG, independentemente da história pessoal ou familiar para câncer de mama.

Autor	Número de amostras estudadas 185delAG	Número de mutação 185delAG identificada	Percentagem de mutação 185delAG identificada
Dias ES – 2001	260	1	0.38%
Struewing JP – Nature Genetics 11, 1995	858	8	0.9%
Roa BB – Nature Genetics, 1996	3108	34	1.09%

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Biblioteca
FAMED/HCPA

1. Berman DB; Costalas J; Schultz DC; Grana G; Daly M; Godwin AK. A Common Mutation in BRCA2 That Predisposes to a Variety of Cancers is Found in Both Jewish Ashkenazi and Non-Jewish Individuals. *Cancer Research* 1996;56(15):3409-3414.
2. Berman DB; Wagner Costalas J; Schultz DC; Lynch HT; Daly M; Godwin AK. Two distinct origins of a common BRCA1 mutation in breast-ovarian cancer families: a genetic study of 15 185delAG-mutation kindreds. *Am-J-Hum-Genet.* 1996 Jun; 58(6): 1166-76
3. Claus EB, Schildkraut J, Iversen ES, Berry D, Parmigiani G. Effect of BRCA1 and BRCA2 on the Association Between Breast Cancer Risk and Family History. *Journal of the National Cancer Institute*, 1998; 90,23: 1824-1829.
4. Comelis-RS; Vasen-HF; Meijers-Heijboer-H; Ford-D; van-Vliet-M; van-Tilborg-AA; Cleton-FJ; Klijn-JG; Menko-FH; Meera-Khan-P; et-al Age at diagnosis as an indicator of eligibility for BRCA1 DNA testing in familial breast cancer. *Hum-Genet.* 1995 May; 95(5): 539-44.
5. Egan-KM; Newcomb-PA; Longnecker-MP; Trentham-Dietz-A; Baron-JA; Trichopoulos-D; Stampfer-MJ; Willett-WC Jewish religion and risk of breast cancer Comment in: *Lancet* 1996 Jun 15;347(9016):1638-9 , *Lancet.* 1996 Jun 15; 347(9016): 1645-6
6. FitzGerald-MG; MacDonald-DJ; Krainer-M; Hoover-I; O'Neil-E; Unsal-H; Silva-Arrieto-S; Finkelstein-DM; Beer-Romero-P; Englert-C; Sgroi-DC; Smith-BL; Younger-JW; Garber-JE; Duda-RB; Mayzel-KA; Isselbacher-KJ; Friend-SH; Haber-DA Germ-line BRCA1 mutations in Jewish and non-Jewish women with early-onset breast cancer . *N-Engl-J-Med.* 1996 Jan 18; 334(3): 143-9

7. Gail MH; Brinton LA; Byar DP; et al. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being screened annually. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1879-1886.
8. Instituto Nacional do Câncer – INCA. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer. *Jornal da Febrasgo* 2000;7, 5-10.
9. Langston AA, et al. BRCA1 Mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *The New England Journal of Medicine* 1996; 334:137-142.
10. Miller AS, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting-out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res.* 1988, 16:1215.
11. Muto, MG; Cramer, DW; Tangir, J; Berkowitz, R; Mok, S. Frequency of the BRCA1 185delAG Mutation among Jewish Women with Ovarian Cancer and Matched Population Controls. *Cancer Research* 1996; 56(6):1250-1252.
12. Oddoux-C; Struwing-JP; Clayton-CM; Neuhausen-S; Brody-LC; Kaback-M; Haas-B; Norton-L; Borgen-P; Jhanwar-S; Goldgar-D; Ostrer-H; Offit-K The carrier frequency of the BRCA2 6174delT mutation among Ashkenazi Jewish individuals is approximately 1%. *Nat-Genet.* 1996 Oct; 14(2): 188-90
13. Ozcelik H; Antebi YJ; Cole DEC; Andrulis IL. Heteroduplex and protein truncation analysis of the BRCA1 185delAG mutation. *Hum Genet* 1996;98: 310-312.
14. Roa-BB; Boyd-AA; Volcik-K; Richards-CS Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2.; *Nat-Genet.* 1996 Oct; 14(2): 185-7
15. Shattuck-Eidens D; McClure M; Simard J; et al. A Collaborative Survey of 80 Mutations in the BRCA1 Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene. *JAMA*, Feb 1995; 273: 535-541.

16. Struewing JP; Hartge P; Wacholder S; Baker SM; Berlin M; McAdams M; Timmerman MM; Brody LC; Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews [see comments] *N Engl J Med*; 336(20):1401-8 1997. Comment in: *N Engl J Med* 1997 May 15; 336(20):1448-9. Comment in: *N Engl J Med* 1997 Sep 11; 337(11):788-9
17. Struewing-JP; Abeliovich-D; Peretz-T; Avishai-N; Kaback-MM; Collins-FS; Brody-LC
The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1 percent in Ashkenazi Jewish individuals. Comment in: *Nat Genet* 1995 Oct; 11(2):113-4 *Nat-Genet*. 1995 Oct; 11(2): 198-200
18. Tonin P. et al. Linkage analysis of 26 Canadian breast and breast-ovarian cancer families. *Human Genetics* 1995;95:545-550.
19. Tonin P; Serova O; Lenoir G; Lynch H; Durocher F; Simard J; Morgan K; Narod S. BRCA1 mutations in Ashkenazi Jewish women [letter] *Am J Hum Genet*. 1995 Jul. 57(1):189.

Tratado de Ginecologia

VOLUME II **FEBRASGO** 

COMISSÃO DE EDUCAÇÃO CONTINUADA
DA FEBRASGO – 1993/1997

Editores

Hildoberto Carneiro de Oliveira

Professor Titular de Ginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro – FCM-UERJ
Professor Titular de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade
de Medicina de Petrópolis

Ivan Lemgruber

Membro Titular da Academia Nacional de Medicina
Professor Titular de Ginecologia da Escola Médica de Pós-Graduação da
Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro – PUC-RJ

Osmar Teixeira Costa

Professor Emérito de Ginecologia da Universidade do Rio de Janeiro - UNIRIO
Professor Titular de Ginecologia da Escola de Medicina Sousa Marques
Titular da Academia Nacional de Medicina
Secretário Executivo da FEBRASGO

REVINTER

108. Aspectos Genéticos do Câncer de Mama

Maira Caleffi
Eleonora Souza Dias

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a principal neoplasia em mulheres americanas, sendo que no Brasil ainda o câncer de colo uterino é mais comum na maioria dos estados. No entanto, aproximadamente uma em cada 10 mulheres desenvolverá a doença durante a sua vida. No Rio Grande do Sul, dados da Secretaria Estadual de Saúde e Meio Ambiente (1995) mostram que o câncer de mama é a principal causa de morte em mulheres entre 20 e 49 anos.

De todos os tipos de câncer de mama, apenas 5% a 10% dos casos estão associados a fatores hereditários transmitidos através de alterações em células germinativas.^{2,4,15,17,32,33} Esses, comumente, aparecem em pacientes mais jovens, com frequência são bilaterais e têm alta incidência familiar, podendo estar relacionados com outros tipos de câncer, como exemplo, o câncer de ovário. A imensa maioria dos tumores são decorrentes de alterações, também genéticas, mas do tipo esporádico, estando relacionadas, principalmente a fatores ambientais ou ainda a outros não conhecidos, como comportamento, estilo de vida, dieta, sedentarismo, alterações na vida reprodutiva, ou possivelmente a exposição à radiação, vírus e substâncias químicas carcinogênicas.

A industrialização e a tecnologia estão associadas ao aumento da incidência de vários tipos de câncer. No entanto, diz-se que todo câncer é genético, pois o processo da carcinogênese que percorre múltiplos estágios ocorre em nível de transformações de DNA, dentro da célula. Estas modificações ou mutações nos genes pode ocorrer a nível somático (mutações adquiridas) ou em nível da linhagem de células germinativas do indivíduo (mutações herdadas). Portanto, o câncer é uma doença do genoma, resultante de um acúmulo de deficiências genéticas hereditárias ou adquiridas através de uma série de insultos ambientais.

Com os novos conhecimentos de biologia molecular, sabe-se que cada tipo de câncer possui suas características típicas, embora o processo básico que provoca os diversos tumores seja muito similar. Para que um tumor possa formar-se, faz-se necessário que uma célula ancestral em um determinado momento — geralmente décadas antes que o tumor seja palpável — inicie um programa de reprodução inapropriada, não obedecendo instruções de células vizinhas normais. A transformação maligna de uma célula acontece devido ao acúmulo de mutações em classes especiais de genes, que são moléculas de DNA dos cromossomos do núcleo da célula. Os genes especificam uma seqüência de aminoácidos interligados que vão expressar-se através de uma proteína especial, que em última análise exercerá a função do gene. Quando o gene é acionado, a célula sintetiza a proteína que traz o código. Por isso, mutações em um gene podem perturbar uma

célula mudando a quantidade ou a atividade do produto proteico. A informação contida num gene específico (DNA) passa por uma estrutura molecular (mRNA) para transformar-se na proteína correspondente, aí então exercendo o comportamento biológico através de uma reação bioquímica.

Existem duas classes de genes que possuem um papel importante no processo de carcinogênese, que quando não mutados fazem parte do ciclo celular numa seqüência organizada de eventos na qual aumenta e divide a célula: os proto-oncogenes que estimulam este crescimento e os supressores oncogênicos que o inibem. Quando mutados, os proto-oncogenes são ativados tornando-se oncogenes causadores de uma multiplicação celular excessiva, por exemplo. Os supressores tumorais quando mutados perdem a sua função de verdadeiros frenadores de células alteradas, não conseguindo deter o crescimento desordenado.

RECENTES INSIGHTS NA EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

Epidemiologistas e geneticistas sugerem ser o câncer de mama uma doença heterogênea e que vários fatores ambientais e genéticos estão envolvidos.² Os dois principais fatores de risco são idade e história familiar. Observações clínicas sugerem que o câncer de mama tem comportamento de doença autossômica dominante em certas famílias.^{2,23,39} O risco para o câncer de mama tem aumentado devido, em grande parte, a mudanças graduais de fatores de riscos já estabelecidos;^{17,26} podem ser citados como exemplos: o aumento do intervalo entre a menarca (primeira menstruação) e o primeiro filho, mudanças nos fatores ambientais (dieta, exposição a substâncias cancerígenas, agrotóxicos, dioxinas, etc.) e os fatores psicológicos, estes ainda menos confirmados. Os hormônios, indiscutivelmente, participam da carcinogênese como um fator promotor e não como fator iniciador. Evidências da relação dos hormônios com câncer datam de mais de um século. É sabido que a ooforectomia antes dos 40 anos diminui o risco de desenvolver câncer de mama para menos de 10%, mesmo em mulheres com história familiar importante. Sabe-se que antigamente a mulher tinha em média 50 ciclos ovulatórios durante sua vida, pois passava a maior parte do tempo de sua vida reprodutiva grávida ou amamentando. Ela menstruava tarde e com 40-45 anos parava de menstruar naturalmente. Hoje em dia, o perfil da vida reprodutiva de uma menina de país desenvolvido é menstruar com 11-12 anos, ter o primeiro filho com 27-30 anos, 1 ou 2 filhos, sendo possível estimar que ela terá, aproximadamente, 300 ciclos ovulatórios durante a menarca. Além disso, estará exposta a variações hor-

monais por longo período de tempo (quase 20 anos), propiciando um estímulo permanente de células mamárias ainda imaturas (não diferenciadas), pois estas só se tornarão mais diferenciadas, e portanto menos sensíveis, com a primeira gestação completa. Até então, essas células são mais suscetíveis para se modificarem, e talvez sofrerem mutações, propensas a entrarem num processo de carcinogênese.

O câncer de mama é uma doença insidiosa, ou seja, o processo é muito lento. Um tumor de 1 cm, segundo estudos de tempo de duplicação celular (*doubling time*) teria 10 anos de evolução no corpo de uma mulher, e ainda assim de difícil diagnóstico por não ser palpável. Outros estudos recentes sugerem que alterações genéticas ocorridas antes do primeiro filho ou mesmo na adolescência podem contribuir para um aumento do risco na fase adulta. A obesidade na adolescência também é apontada como um fator predisponente.

O desenvolvimento da biologia molecular tem auxiliado no entendimento do câncer de mama de componente familiar. Somente com a evolução nesta área, aprendendo o comportamento biológico da doença desde o seu processo inicial poderemos desenvolver estratégias realmente preventivas.

Uma grande aplicação destes avanços poderá ser na área de detecção precoce, por exemplo, combinando técnicas de biologia molecular que identificam a presença de células com seqüência conhecida que apresentam seus aminoácidos alterados. Esta seqüência marcada com algum tipo de substância, por exemplo radioativa, poderia ser detectada com exames de imagem, como o exame mamográfico ou medicina nuclear. Desta maneira, através de sondas moleculares específicas, poderia detectar mulheres assintomáticas, com ductos mamários com células com atipias ou com células ainda normais, mas predispostas a câncer. Outra aplicação seria a terapia genética, que já está sendo testada hoje em dia, que procura tratar células de câncer através da identificação de sua proteína alterada e usá-las como células alvo para tratamento, por exemplo, quimioterápicos acoplados a sondas moleculares ou anticorpos monoclonais.

Ainda, segundo conceitos de biologia molecular na forma de engenharia genética, seria possível reverter o fenótipo, corrigindo a alteração conhecida no gene. Estes testes já estão sendo feitos *in vitro* com o supressor tumoral p53, onde células com p53 não mutado (*wild* ou *original*), quando em contato com células com este gene mutado teriam a capacidade de reinstaurar as células anormais, fazendo com que elas voltem a funcionar normalmente.

GENES SUPRESSORES TUMORAIS NO CÂNCER DE MAMA

Os mais conhecidos supressores oncogênicos envolvidos com a carcinogênese mamária até o presente momento são: p53,^{8,22} BRCA1^{12,16,28} e BRCA2.²³

A ação normal deste gene e sua proteína é a prevenção do câncer agindo ao nível do ciclo celular, como um sensor de DNA danificado, atuando basicamente de duas maneiras: impedindo crescimento celular, retendo, por exemplo, o DNA em G1, e assim ativando mecanismos de reparo; ou fazendo a reprogração para que a célula morra (estimulando a apoptose). Quando mutado, não funcionando, ele permite que ocorra o crescimento da célula anormal.

Mutações no gene p53 são as mais comumente encontradas em tumores humanos, sendo que a metade dos tumores apresenta mutações neste gene. Está localizado no cromossomo 17p13.1 e possui 16-20 kB de DNA celular. É uma fosfoproteína nuclear de 375 aminoácidos, possuindo uma meia-vida muito curta (5-45 min).

Mutações germinativas no gene p53 são responsáveis pela síndrome de câncer Li-Fraumeni, caracterizada por elevado risco de câncer de mama de início precoce, sarcomas na infância e outras neoplasias.

BRCA1

O gene BRCA1 ou gene do câncer de mama 1, é um gene supressor tumoral, contém 5.592 nucleotídeos distribuídos em 7.000 pares de bases de DNA genômico; composto de 22 exons codificadores e produzindo uma proteína com 1.863 aminoácidos.³⁹ Está localizado no braço longo do cromossomo 17 (17q21).^{1,2,4,6,35,42} Foi isolado em outubro de 1994,³⁹ e sua seqüência está disponível na literatura.³⁸ Ele não está apenas envolvido com o câncer de mama. Mulheres com o gene têm risco de 83% na vida de desenvolver câncer de mama, assim como eleva o risco de câncer de ovário para 63% na idade de 70 anos.¹³ Aos 60 anos, a chance da doença acontecer é de 54%¹⁰ e de 30% de câncer ovariano. Dados recentes sugerem que o BRCA1 mutado não está relacionado ao aparecimento do câncer de mama masculino, mas está associado com um aumento de 3-4 vezes no câncer de próstata.

A inativação do BRCA1 por um tipo de mutação, como a perda da heterozigose, torna-o responsável pela predisposição genética para câncer de mama e ovário.^{14,15,24,31} É relatado que este gene mutado se relaciona, principalmente, com cânceres de mama/ovário em mulheres jovens (pré-menopáusicas). Há vários tipos de mutações;²⁸ já foram descritas mais de 100 diferentes mutações. Também foi observada a presença de translocações entre os braços longos dos cromossomos 11 e 22 (11q;22q) na tumorigênese do câncer de mama. Atualmente tem-se observado que uma mutação do tipo "frameshift" na posição 185 no exon 2, envolvendo uma deleção da adenina e guanina, denominada 185delAG, está relacionada a famílias judias descendentes Ashkenazi. Em recente trabalho foi observado que 1% dos judeus carrega a mutação, o que pode sugerir que são descendentes de um ancestral em comum.

O BRCA1 também foi identificado na sua forma alterada em cânceres de mama esporádicos,³⁴ podendo funcionar como um regulador negativo de proliferação celular. A diminuição de sua expressão estaria relacionada com graus variáveis de atipias até o câncer invasor.³⁶ Esta hipótese ainda precisa ser confirmada em outros estudos.

BRCA2

O gene BRCA2 localizado no cromossomo 13q12-13,⁵ é composto por 26 exons codificando 3.418 aminoácidos. Parece estar relacionado ao câncer de mama em mulheres jovens e ao câncer de mama em homens,³³ além de conferir um risco menor para câncer de ovário em comparação ao BRCA1.²⁴ Ainda não são bem conhecidos os mecanismos pelos quais este gene funciona.

ANÁLISE CRÍTICA DOS TESTES GENÉTICOS PARA CÂNCER DE MAMA

A utilização dos testes de rastreamento genético para a população em geral depende de três fatores: probabilidade de ter doença, sensibilidade e especificidade do teste.⁴¹

A probabilidade de herdarmos uma mutação genética relacionada ao câncer de mama é pequena, de acordo com o conhecimento disponível em janeiro de 1997.

A utilização do teste genético de forma comercial deve ser desestimulada por enquanto, pois o resultado na maioria das vezes não é definitivo, ou seja, os testes disponíveis, até o presente momento, não podem garantir que a pessoa não seja portadora de mutações para o câncer de mama, a menos que todo o gene seja testado (o que geralmente não é feito). O resultado só teria valor se fosse positivo para mutações; comumente os laboratórios que comercializam estes testes, somente testam cinco ou seis tipos de mutações que corresponderiam a 30% das mutações conhecidas. Portanto, o teste negativo não significa nada, a menos que todo o gene em questão seja analisado por sequenciamento.

De posse da informação de um teste genético poderia ser oferecido à portadora de mutações drogas do tipo anti-hormonais, por exemplo, ou ainda métodos para estimular a diferenciação celular mamária mais precocemente. Estes são estudos em andamento. Um estudo de Los Angeles, utilizando injeções de preparações hormonais na adolescente mimetizariam uma gravidez, sem ela precisar ter filho, amadurecendo assim as células. Isso parece estar bem encaminhado, porque não teria efeitos colaterais importantes e seria por um período pequeno que "iludiria" a mama, como se ela engravidasse.

A proposta para que as portadoras de mutações realizem mastectomia bilateral e ainda ooforectomia bilateral devido ao gene estar envolvido em câncer de mama e ovário deve ser cautelosamente estudada. Isso vem sendo feito nos Estados Unidos em larga escala. As mulheres não suportam a idéia de ter risco e os cirurgiões muitas vezes na tentativa de propor alguma saída para a paciente acabam cedendo e realizando cirurgias ablativas. Este certamente não é o caminho para ajudar a diminuir o estigma do câncer de mama; as mulheres estão ficando mais mutiladas do que se tivessem câncer. Como o câncer de mama se trata atualmente conservando a mama, é inaceitável que para uma mulher de risco elevado a proposta seja retirar as duas mamas e os dois ovários.

Estamos vivendo tempos de muitos questionamentos em relação a um novo paradigma: será que poderemos mudar o destino de nossos genes? Será que a melhor maneira de evitar o câncer é se livrando do órgão ainda saudável (e útil)? Como parar de ter câncer e continuar moderno e cada vez mais desenvolvido?

CONCLUSÃO

De um lado o conhecimento, que certamente está nos desvendando uma série de fenômenos que nos ajudarão a diminuir, curar e até mesmo extinguir muitas doenças. De outro o desafio, de sabermos utilizar todo este conhecimento baseado em princípios éticos ainda não escritos, ainda desconhecidos.

IMPLICAÇÕES ÉTICAS E LEGAIS DE TESTES GENÉTICOS

A partir destas descobertas de suscetibilidade para o câncer de mama e ovário foi possível desenvolver um teste genéti-

co. No entanto até agora não foi determinado o manejo para as mulheres portadoras do gene mutado.^{20,28}

A possível aplicação clínica do teste BRCA1 ainda é um dilema. Até agora só está liberado pelas Sociedades Americanas: American Society of Human Genetics, National Breast Cancer Coalition, Advisory Council of the National Center for Human Genome Research para atividades de pesquisas.³²

O *screening* com o BRCA1 ainda não pode ser usado pela população em geral.⁴ Ainda não se conseguiu detectar todos os alelos relacionados à doença, pois o gene é muito grande, tem diferentes mutações e a chance de ocorrer falsos-positivos ainda é alta devido a dificuldade em distinguir polimorfismo benigno e mutação patológica.⁴¹

Como ainda está em fase de pesquisa sugerem-se critérios importantes para sua aplicação que é história familiar com muitos casos de câncer de mama e/ou de ovário em mulheres jovens (menos de 45 anos). Testes pré-sintomáticos, para doenças de aparecimento na idade adulta são muito significativos e incluem privacidade, termo de consentimento, envolvimento com seguro/emprego, e ação penal proveniente de testes ou predisposição de risco incorreta.³⁸

Há critérios para o teste do DNA como câncer de mama com o diagnóstico em idade inferior ao 45 anos e o que pode ser oferecido para mulheres com risco elevado, já que não se tem muito a oferecer em termos preventivos é:

1. Avaliação de idéias pré-concebidas sobre o câncer, discussão da percepção do risco, pois na realidade, esse risco de 85% não é absoluto e sim cumulativo durante a vida da mulher e depende da idade, ou seja, uma mulher com 35 anos não tem 85 vezes mais chance que a população em geral, tem bem menos, e ela vai acumulando risco.
2. Construção de um pedigree detalhado, para que se conheça pessoas que podem ser beneficiadas com o teste.
3. Orientação de famílias a respeito do rastreamento, *screening* mamográfico, exames periódicos e aconselhamento psicológico para grupo que se beneficiaria com isso (um tema para comprovação científica). Sugere-se que o diagnóstico genético, quando disponível, seja após os 20 anos de idade, pois as identificações básicas, psíquicas já ocorreram e a mulher poderia tomar atitudes que a protegeriam contra o câncer de mama, como, por exemplo, ter um filho mais precocemente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBERTSEN H et al. Genetic mapping of the BRCA1 region on chromosome 17q21. *American Journal of Human Genetics*. 54(3): 516-25, mar 1994.
2. BIESECKER BB et al. Aconselhamento genético para famílias com suscetibilidade hereditária a câncer de mama e câncer ovariano. *JAMA-GO*, 2:1094-1107, set 1994.
3. CLAUS EB et al. Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. *Cancer*, 73:643-51, 1994.
4. COHEN MM. Statement of the American society of human genetics on genetic testing for breast and ovarian cancer predisposition. *Am J Hum Genet*, 55:i-iv, 1994.
5. COLLINS FS. BRCA1-Lots of mutations, lots of dilemmas.
6. CORNELIS RS et al. Age at diagnosis as an indicator of eligibility for BRCA1 DNA testing in familial breast cancer. *Hum Genet*, 95: 539-544, 1995.
7. CROPP CS et al. Evidence for involvement of BRCA1 in sporadic breast carcinomas. *Cancer Research*, 54(10): 2548-51, mai 15 1994.
8. CULOTA E et al. P53 sweeps through cancer research. *Science*, 262:321-76.
9. DEN OW et al. Exclusion from mammographic screening of women genetically predisposed to breast cancer will probably eliminate

- mammographically induced breast cancer. *Anticancer-Res*, 13(4): 1113-1115, 1993.
10. EASTON DF et al. Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genetics*, 56(1):265-71, jan 1995.
 11. EBYN et al. Familial risk and genetics susceptibility for breast cancer. *Cancer Causes & Control*, 5(5):458-70, set 1994.
 12. ECCLES D et al. Genetic epidemiology of early onset breast cancer. *J Med Genet*, 31:944-949, 1994.
 13. FORD D et al. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Lancet*, 343:692-95, 1994.
 14. FRIEDMAN LS et al. Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nature Genetics*, 8:399-404, Dec 1994.
 15. FRIEDMAN LS et al. The search for BRCA1. *Cancer Research*, 54(24): 6374-82, Dec 15 1994.
 16. HOSKINS KF et al. Assessment and counseling for women with a family history of breast cancer. A guide for clinicians. *JAMA*, 273(7): 577-85, fev 15 1995.
 17. KING MC et al. Câncer de mama e de ovário hereditários. Quais são os riscos? Quais são as escolhas?. *JAMA/GO*, 3:1485-1496, abr 1995.
 18. KRAINER M. Genetic predisposition for breast cancer: from epidemiologic studies to molecular genetics. *Onkologie*, 17(5):470-4 1994.
 19. LANGSTON AA et al. BRCA1 Mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 334:137-142.
 20. LERMAN C et al. Interest in genetic testing among first-degree relatives of breast cancer patients. *Am J M Genetics*, 57:385-392, 1995.
 21. LINDBLOM A et al. Predisposition for breast cancer in carriers of constitutional translocation 11q;22q. *Am J Human Genet*, 54(5): 871-876, 1994.
 22. MALKIN D et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and other neoplasms. *Science*, 250: 1233-1238, 1990.
 23. MIKI Y et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA. *Science*, 266:66-71, out 1994.
 24. NAGAI MA. Câncer de mama familiar: Heterogeneidade genética. *Oncologia Atual*, 5(1):8-14.
 25. NAROD SA et al. An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer families. Breast cancer linkage consortium. *Am J Hum Genetics*, 56(1):254-64, jan 1995.
 26. ROWELL S et al. Inherited predisposition to breast an ovarian cancer. *Am J Hum Genet*, 55:861-865, 1994.
 27. SCHILDKRAUT JM et al. Loss of heterozygosity on chromosome 17q11-21 in cancers of women who have both breast and ovarian cancer. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 172(3): 908-13, mar 1995.
 28. SHATTUCK-EIDENS D et al. A collaborative survey of 80 mutations in the BRCA1 breast and ovarian cancer susceptibility gene. *JAMA*, 273(7):535-541, fev 1995.
 29. SKOLNICK MH et al. Genetic predispositions to breast cancer. *Cancer (suppl)* 70(6):1747-1754, 1992.
 30. SMITH SA et al. Predisposing genes in breast and ovarian cancer: An overview. *TUMORI*, 79(5):291-296, 1993.
 31. STEICHEN-GESDORF E et al. Familial site-specific ovarian cancer is linked to BRCA1 on 17q12-21. *Am J Human Genet*, 55:870-875, 1994.
 32. STRUEWING JP et al. Detection of eight BRCA1 mutations in 10 breast/ovarian cancer families, including 1 family with male breast cancer. *Am J Hum Genet*, 57:1-7, 1995.
 33. SZABO CI. Inherited breast and ovarian cancer. *Human Molecular Genetics*, 4:1811-1817, 1995.
 34. THOMPSON ME et al. Decreased expression of BRCA1 accelerates growth an is often present during sporadic breast cancer progression. *Nature Genetics*, 9:444-450, abr 1995.
 35. TONIN P et al. Linkege analysis of 26 Canadian breast and breast-ovarian cancer families. *Human Genetics*, 95:545-550, 1995.
 36. URBA WJ. Definindo BRCA1: Câncer de mama ou câncer de ovário? *Clinical Oncol Alert* 10:44, jun 1995.
 37. VASEN HFA. Screening in breast cancer families: Is it useful? *ANN-MED*, 26(3):185-190, 1994.
 38. WEBER BL et al. Familial breast cancer. Approaching the isolation of a susceptibility gene. *Cancer*, 74(suppl 3):1013-20, ago 1994.
 39. WOOSTER R et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 265:2088-90, set 1994.
 40. WOOSTER R et al. Breast cancer susceptibility: a complex disease unravels. *TIG*, (11):3-5, 1995.
 41. SKOLNICK M et al. Breast and ovarian cancer susceptibility genes: implications for presymptomatic testing and screening. *Breast cancer advances in biology and therapeutics*: 3-9, 1996.
 42. STRONG LC. The cloning of BRCA1 and localization of BRCA2: the race is over, but the long search to understand the genes' roles in breast cancer is just beginning. *Breast Diseases*, 6(2):139-141, 1995.

REVISTA DE LA FEDERACION LATINOAMERICANA DE
MASTOLOGIA

Volumen 1, Número 1, 1997

Publicación editada por la Escuela Latinoamericana de Mastología

Reservados todos los derechos. Ninguna parte de ésta publicación puede ser reproducida en ninguna forma o medio alguno, electrónico o mecánico, incluyendo fotocopias, grabaciones u otros sistemas de información sin la autorización por escrito del titular del Copyright **REVISTA DE LA FEDERACION LATINOAMERICANA DE MASTOLOGIA** se distribuye exclusivamente entre los profesionales de la medicina.

GENETICA E CANCER DE MAMA: O QUE FAZER QUANDO O GENE BRCA1 ESTA MUTADO ?



Caleffi M., Dias E.

Instituto da Mama do Rio Grande do Sul - Porto Alegre

INTRODUÇÃO

mulher, desde o final do século, está vivendo uma mudança cada vez mais propícia ao câncer de mama. Com a vida desenvolvida, os tipos de comportamentos sociais, padrão hormonal, dieta e a falta de exercícios, entre outros motivos, fazem com que o risco aumente com ou sem fatores hereditários associados. Um dos grandes debates atuais, a nível internacional é o problema do câncer de mama nos países em desenvolvimento, que apresentam uma incidência crescente semelhante ao primeiro mundo e com uma pirâmide populacional brasileira também está se modificando. Estamos com configuração semelhante à inglesa, com a porção central da pirâmide mais larga (30-50 anos), estreitando-se na base, também pela diminuição da natalidade.

Brasil a perspectiva é que em 10 a 15 anos 40% das mulheres estarão na fase pós-menopáusia, onde a incidência do câncer de mama aumenta. A falta de diagnóstico precoce e de assistência só tende a agravar essa perspectiva.

Quando dos aspectos genéticos do câncer de mama se falará por outro lado, identificar mulheres de alto risco e diminuir a incidência de casos através de medidas preventivas para modificar essa situação, da conscientização de profissionais e entidades governamentais com poder de decisão.

EPIDEMIOLOGIA

O risco de ter câncer de mama na vida de uma mulher era, em 1970, cerca de uma em cada 26.

Hoje este risco no Brasil é cerca de uma em cada 20 e no Rio Grande do Sul é uma em cada 12. Epidemiologistas consideram este fenômeno uma epidemia. O que se observa é que o risco de desenvolver a doença aumenta com a idade. No entanto, é cada vez mais freqüente o aumento no índice em mulheres abaixo dos 35 anos. No Rio Grande do Sul cerca de 20% dos cânceres de mama diagnosticados ocorrem abaixo dos 35 anos, isto pode ser devido também a uma maior conscientização das mulheres nesta faixa etária,

O GEN BRCA1

Até 1990 se pensava que um dos principais fatores de risco para o câncer de mama familiar fosse a relação de parente de primeiro ou segundo grau. Após 1990, quando o gen específico para câncer de mama (locus no cromossomo 17), foi pela primeira vez estudado através de estudos de ligação de famílias, determinou-se que as mulheres portadoras de mutações nesse cromossomo, tinham uma maior predisposição para ter câncer de mama.

A partir daí calculou-se o risco destas portadoras que chega a ser 85 vezes maior do que na população geral.

Esse gen (BRCA1) também está envolvido no câncer de ovário.

Somente em 1994 é que foi realmente identificado e publicado, propiciando estudos no mundo inteiro. Já se sabe que cerca de uma em cada 200 mulheres carregam esse gen mutado nos Estados Unidos.

O gen parece estar envolvido na regulação da proliferação de células mamárias epiteliais, apontado como sendo um mecanismo regulador, tendo sido observado diferentes níveis de expressão gênica desde células normais a formas atípicas, câncer *in situ* e invasor.

Com o conhecimento estudos sobre esses supressores oncogênicos (BRCA1) poderemos descobrir também uma relação com o tumor não familiar, esporádico.

O TESTE GENETICO

A partir destas descobertas de suscetibilidade para o câncer de mama e ovário foi possível desenvolver um teste genético. No entanto até agora não foi determinado o manejo para as mulheres portadoras do gen mutado.

Um artigo recente mostrou uma pesquisa realizada por telefone onde eram avaliados o interesse e expectativas sobre o eminente teste genético em mulheres com história familiar para o câncer de mama. 105 mulheres completaram duas entrevistas para avaliar: demografia, fatores de risco, fatores psicológicos e atitudes. Após essas entrevistas foi perguntado se elas aceitavam ou não doar sangue para a pesquisa. 91 % disseram que queriam submeter-se ao teste, 4% não quiseram, e 5% ficaram indecisas. A maioria queria fazer o teste para saber o risco das suas crianças e para tomar maior cuidado consigo mesmas, podendo melhorar a sua qualidade de vida objetivamente. A maioria antecipou um impacto negativo frente a um teste positivo. Quando foram perguntadas: e se der positivo? Aí o pânico foi geral. 83% disseram que iriam ter depressão, 40% que teriam pior qualidade de vida e a maioria respondeu que ficariam preocupadas mesmo se o teste fosse negativo.

O que se entende com esse trabalho é que ainda esse teste não é definitivo. É por isso não deve ser usado como rastreamento de população.

Ha muita demanda para o teste porém, antes de o tornar viável como método de rastreamento populacional, se faz necessário identificar um grupo específico para que se consiga desenvolver estratégias de prevenção propriamente dita. Deve-se lembrar

que o câncer de mama familiar ocorre em 5 a 10% da população em geral mas, no momento em que se conseguir estudar melhor esses supressores oncogênicos, estaremos também estudando o câncer não-familiar.

OUTROS FATORES DE RISCO

O risco para o câncer de mama tem aumentado devido, em grande parte, a mudanças graduais de fatores de riscos já estabelecidos. O aumento do intervalo entre a menarca e o primeiro filho, mudanças nos fatores ambientais (dieta, exposição a substâncias cancerígenas, agrotóxicos, dioxinas, etc) e os fatores psicológicos.

Os hormônios participam da carcinogênese não como fator iniciador mas sim como fator promotor. É sabido que a ooforectomia antes dos 40 anos diminui o risco de desenvolver câncer de mama para menos de 10%, mesmo em mulheres com história familiar importante.

Sabe-se que antigamente a mulher tinha em média 50 ciclos ovulatórios durante sua vida. Pois ou estavam grávidas ou estavam amamentando. Menstruavam tarde e com 40-45 anos paravam de menstruar. Atualmente calcula-se que uma menina de país desenvolvido menstrue com 12 anos e que tenha o primeiro filho com 27-30 anos, apresentando 500 ciclos ovulatórios, o que é dramático no que diz respeito a exposição a variações hormonais por longo período, principalmente estímulos constantes em células mamárias imaturas (não diferenciadas) antes da primeira gestação. Essas células são mais suscetíveis para ir por um caminho de carcinogênese. Mas o que se tem a favor é que o câncer de mama é uma doença insidiosa ou seja, e muito lenta. Um tumor de um centímetro teria 10 anos de evolução no corpo de uma mulher, e ainda não é palpável.

Estudos recentes sugerem que alterações genéticas ocorridas nesta fase podem contribuir para um aumento do risco na fase adulta.

A obesidade na adolescência também é apontada como um fator predisponente.

O QUE ESTA SENDO OFERECIDO

Está ocorrendo coisas graves como:

- A utilização de teste genético de forma comercial sem ainda ter resultados definitivos ou seja, o teste disponível até agora não garante que a pessoa não seja portadora de mutações para o câncer de

mama pois até agora o resultado só tem valor se for positivo para mutações. Ou seja, o teste negativo não significa nada.

Tem-se oferecido também uso de drogas anti-hormonais, que seria uma castração precoce.

A proposta para mastectomia bilateral e ooforectomia bilateral devido ao gene estar envolvido em câncer de mama e ovário. Isso vem sendo feito nos Estados Unidos em larga escala. As mulheres não suportam a idéia de ter risco e os cirurgiões estão muito contentes pois estão faturando bastante, mas é muito grave pois as mulheres estão ficando mais mutiladas do que si tivessem que ter câncer. Como o câncer de mama se trata atualmente conservando a mama, é inaceitável de que para um risco a proposta seja retirar as duas mamas e os dois ovários.

Está em estudo uma outra proposta que vem de Los Angeles que são injeções na adolescente e que mimetizaria uma gravidez sem ela precisar ter filho, amadurecendo assim as células. Isso parece ser uma coisa muito bem encaminhada porque não teria efeitos colaterais importantes porque é por um período pequeno que «iludiria» a mama, como se ela engravidasse. Mas isso é, apenas proposta, sujeita a confirmação.

O QUE PODE SER OFERECIDO

O que pode ser oferecido para mulheres com risco elevado, já que não se tem muito a oferecer em termos preventivos é:

- Avaliação de idéias pré-concebidas sobre o câncer,
- Discussão da percepção do risco pois na realidade, esse risco de 85% não é absoluto e sim cumulativo durante a vida da mulher e depende da idade. Ou seja, uma mulher com 35 anos não tem 85 vezes mais que a população em geral, tem bem menos, e ela vai acumulando risco.
- A construção de um pedigree detalhado, para que se conheça pessoas que podem ser beneficiadas com o teste.
- Orientação de famílias a respeito do rastreamento, screening mamográfico e examen periódicos.
- Aconselhamento psicológico para grupo que se beneficiaria com isso (um tema para comprovação científica).
- Sugere-se que o diagnóstico genético, quando disponível, seja após os 20 anos de idade pois as identificações básicas, psíquicas já ocorreram. E a mulher poderia tomar atitudes que a protegeriam contra o câncer de mama, por exemplo ter um filho mais precocemente. Devemos lembrar-nos que estas mulheres com história familiar importante já são muito angustiadas e todas pensam que vai ter câncer de mama durante a sua vida. Portanto, se o teste genético de uma mutação conhecida na sua família for negativo, ela pode se tranquilizar porque provavelmente seu risco é igual á população em geral.

Todas essas propostas estão ainda em fase de aperfeiçoamento e somente com mais estudos é que encontraremos as respostas para a nossa pergunta: o que fazer quando o gen BRCA1 está mutado ?

LEITURA RECOMENDADA

1. Friedman LS, et al. The search for BRCA 1. *Cancer Research* 54,6374-6382,1994. -
2. Nagai MA. Câncer de Mama Familiar: Heterogeneidade Genética. *Oncologia Atual* 5 (1). 8-14 -
3. Biesecker BB, et al. Aconselhamento Genético para Famílias com Susceptibilidade Hereditária a Câncer de Mama e Câncer de Ovário. *JAMA-GO* 2,1094-1 107,1994
4. Hoosleins KF, et al. Assessment and counseling for women with a family history of breast cancer. *JAMA* 273(?). 577-

- 585, 1995.
5. Lerman C, et al. Interest in Genetic Testing Among First-Degree Relatives of Breast Cancer Patients. *American Journal of Medical Genetics* 57, 3885-392, 1995..
6. Coe K, et al. The Human Breast and the Ancestral Reproductive Cycle - A Preliminary Inquiry into Breast Cancer Etiology. *Human Nature* 6 (3), 197-220, 1995.
7. Weber BL, et al. *Familial Breast Cancer* . chapter 7.