

**Catarina Gomes Rodrigues Santos**

**Avaliação da patogenicidade de mutações germinativas de significado desconhecido nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em famílias Portuguesas**

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Oncologia submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto e à Thomas Jefferson University.

Orientador: Doutor Manuel António Rodrigues Teixeira

Categoria: Professor Associado Convidado

Afiliação: Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

Co-orientador: Mestre Ana Luísa Pinto da Silva Lobo Peixoto

Categoria: Técnico Superior de Saúde

Afiliação: Instituto Português de Oncologia do Porto



## **AGRADECIMENTOS**



## **Agradecimentos**

Ao Prof. Doutor Manuel Teixeira, Director do Serviço de Genética e do Centro de Investigação do IPO-Porto, um especial agradecimento pela orientação sábia, por toda a disponibilidade e rigor científico, e principalmente por ter acreditado em mim e no meu trabalho.

À Dra. Ana Peixoto, co-orientadora desta tese, por todos os conhecimentos partilhados, as excelentes ideias, e pela imensa ajuda. Obrigada Anita, por tudo o que me ensinaste, pelo apoio em todas as horas e, acima de tudo, pelo privilégio da tua Amizade.

À Dra. Deolinda Pereira, por toda a disponibilidade e carinho com que me acolheu no estágio do Mestrado e por todo o apoio, um obrigada muito sincero.

Ao Prof. Doutor Carlos Lopes e restante comissão coordenadora do Mestrado de Oncologia, assim como a todos os docentes deste mestrado, pelo empenho demonstrado. À D. Maria do Céu por toda a disponibilidade, competência e amabilidade.

Ao Dr. Laranja Pontes, Director do IPO-Porto, aos seus antecessores e colaboradores, pelo apoio concedido ao Mestrado de Oncologia.

À Liga Portuguesa Contra o Cancro e aos Projectos do Ministério da Saúde (209/2001 e 15/2007), pelo apoio financeiro prestado.

Ao Prof. Doutor Rui Henrique, Director do Serviço de Anatomia Patológica do IPO-Porto, pela colaboração prestada.

Ao Nuno, à Vera e à Carmen, agradeço toda a colaboração.

Aos colegas do Serviço de Genética, pelo companheirismo demonstrado e por terem contribuído para a minha formação profissional. Um agradecimento especial à Isabel pela simpatia e carinho com que me acolheu.

À Susana e à Carla, por toda a ajuda, por tudo o que me ensinaram e pelo incentivo constante. Por tudo isso e pela vossa amizade, um obrigada muito sincero.

À Patrícia, à Manela, à Maria José, ao Pedro, à Bárbara e à Sofia, quero agradecer os “desenrascanços” constantes, assim como toda a ajuda e apoio que nunca esquecerei.

À madrinha Célia, à Bela e ao Manel, por todo o carinho e amizade que sempre demonstraram, a minha muito sincera gratidão.

Aos meus Avós e ao Padrinho Arnaldo, por sempre terem acreditado em mim. A vossa memória estará sempre no meu coração...

Aos meus irmãos, por, à sua maneira, sempre me terem acarinhado e apoiado.

Aos meus Pais, por TUDO!!! Devo-vos tudo o que sou.

Ao Diogo, companheiro de sempre e de todos os momentos. Obrigada pelo teu ombro, pelo teu carinho e pela tua inesgotável paciência.

*A meus País*

*Ao Diogo*



## ÍNDICE



---

## Índice

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....	15
RESUMO .....	21
SUMMARY .....	25
INTRODUÇÃO .....	29
1 - Epidemiologia do cancro da mama e ovário .....	31
1.1 - Incidência e mortalidade .....	31
1.2 - Factores de risco .....	31
1.2.1 - Cancro da mama esporádico .....	31
1.2.2 - Cancro do ovário esporádico .....	33
1.2.3 - História familiar .....	33
2 - Base genética do cancro .....	33
2.1 - Oncogenes .....	34
2.2 - Genes supressores tumorais .....	34
3 - Carcinogénese mamária e do ovário .....	36
4 - Cancro da mama/ovário hereditário .....	37
4.1 - Identificação de famílias com mutação no gene <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> .....	39
4.2 - Características clínico-patológicas dos tumores <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> .....	40
4.3 - Seguimento de portadores de mutação no gene <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> .....	41
5 - Funções e mutações dos genes <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> .....	43
5.1 - Funções dos genes <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> .....	43
5.2 - Mutações germinativas patogénicas nos genes <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> .....	47
5.3 - Avaliação da patogenicidade de VSD nos genes <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> .....	47
5.3.1 - Co-segregação da VSD com a doença na família .....	48

---

5.3.2 - Co-ocorrência da VSD com mutação patogénica .....	48
5.3.3 - Frequência das VSD em controlos normais .....	48
5.3.4 - Efeito das VSD ao nível do processamento do mRNA .....	49
5.3.5 - Algoritmos informáticos: <i>SpliceSiteFinder</i> , <i>ESEfinder</i> e <i>Polyphen</i> .....	51
5.3.6 - Perda de heterozigotia e características histopatológicas .....	52
OBJECTIVOS .....	53
MATERIAL E MÉTODOS .....	57
1 - Material biológico .....	59
2 - Métodos .....	62
2.1 - Extracção de ácidos nucleicos .....	62
2.1.1 - Extracção de DNA de sangue periférico .....	62
2.1.2 - Extracção de DNA de tecido incluído em parafina .....	62
2.1.3 - Extracção de RNA de sangue periférico.....	62
2.2 - Reacção em cadeia de polimerase (PCR) .....	63
2.3 - <i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i> (DGGE) .....	63
2.4 - Sequenciação .....	63
2.5 - Algoritmos informáticos .....	64
2.6 - <i>Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction</i> (RT-PCR) .....	64
2.7 - Análise de fragmentos semi-quantitativa .....	65
2.8 - RT-PCR Quantitativo .....	66
2.9 - Perda de heterozigotia e características histopatológicas dos tumores .....	68
RESULTADOS .....	71
1 - Estudos de segregação .....	73
2 - Co-ocorrência de VSD com mutações patogénicas .....	73

---

---

3 - Frequência das VSD em controlos normais .....	73
4 - Algoritmos informáticos: <i>ESEfinder</i> , <i>Polyphen</i> e <i>SpliceSiteFinder</i> .....	77
5 - Efeito de VSD ao nível do processamento do mRNA .....	79
5.1 - VSD do gene <i>BRCA1</i> .....	79
5.2 - VSD do gene <i>BRCA2</i> .....	86
6 - Perda de heterozigotia .....	95
DISCUSSÃO .....	97
1 - Variantes muito provavelmente patogénicas .....	99
2 - Variantes muito provavelmente neutras ou polimorfismos .....	101
3 - Variantes que permanecem como VSD .....	106
4 - Avaliação integrada da patogenicidade das VSD .....	107
5 - Conclusão .....	109
ESTUDOS FUTUROS .....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	115

---



## **ABREVIATURAS E SÍMBOLOS**



**Abreviaturas e símbolos**

<b>A</b>	- Adenina
<b>aa</b>	- Aminoácido
<b>ABL1</b>	- <i>c-ABL oncogene 1</i>
<b>APC</b>	- <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
<b>B2M</b>	- <i>B2 Microglobulin</i>
<b>BARD1</b>	- <i>BRCA1-associated RING domain1</i>
<b>BCR</b>	- <i>Breakpoint cluster region</i>
<b>bp</b>	- <i>Base pairs</i>
<b>BRAF</b>	- <i>V-RAF Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1</i>
<b>BRCA1</b>	- <i>Breast cancer 1, early onset</i>
<b>BRCA2</b>	- <i>Breast cancer 2, early onset</i>
<b>BRCT</b>	- <i>BRCA1 C terminus</i>
<b>BRIP</b>	- <i>BRCA1 interacting protein</i>
<b>C</b>	- Citosina
<b>CA 125</b>	- <i>Cancer antigen 125</i>
<b>CCND1</b>	- <i>cyclin D1</i>
<b>CDH1</b>	- <i>Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)</i>
<b>CM</b>	- Cancro da mama
<b>CMH</b>	- Cancro da mama no homem
<b>CO</b>	- Cancro do ovário
<b>CtIP</b>	- <i>CtBP interacting protein</i>
<b>CTNNB1</b>	- <i>catenin (cadherin-associated protein)</i>
<b>DdNTPs</b>	- Didesoxinucleotídeos trifosfato
<b>DNA</b>	- Ácido desoxirribonucleico
<b>DNTPs</b>	- Desoxinucleotídeos trifosfato
<b>DSB</b>	- <i>Double strand breaks</i>
<b>dsDNA</b>	- <i>double stand DNA</i>
<b>EDTA</b>	- Ácido etilenodiaminotetraacético
<b>ERBB2</b>	- <i>v-erb-b2 erithroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
<b>ESE</b>	- <i>Exonic splicing enhancer</i>
<b>ESS</b>	- <i>Exonic splicing silencer</i>
<b>EUA</b>	- Estados Unidos da América
<b>FANCI</b>	- <i>BRCA1 associated C-terminal helicase (BACH1)</i>
<b>FAP</b>	- <i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
<b>G</b>	- Guanina

<b>cDNA</b>	- Ácido desoxirribonucleico codificante
<b>gDNA</b>	- Ácido desoxirribonucleico genómico
<b>HBOC</b>	- <i>Hereditary breast and ovarian cancer</i>
<b>hnRNPs</b>	- <i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>
<b>HR</b>	- <i>Homologous recombination</i>
<b>ISE</b>	- <i>Intronic splicing enhancer</i>
<b>ISS</b>	- <i>Intronic splicing silencer</i>
<b>KRAS</b>	- <i>Kristen Rat Sarcoma Viral Oncogene homolog</i>
<b>LOH</b>	- <i>Loss of heterozygosity</i>
<b>MBP</b>	- Mastectomia bilateral profiláctica
<b>MCP</b>	- Mastectomia contra-lateral profiláctica
<b>MLH1</b>	- <i>MutL E. Coli homolog of 1</i>
<b>mRNA</b>	- Ácido ribonucleico mensageiro
<b>MSH2</b>	- <i>MutS E. Coli homolog of 2</i>
<b>MSH6</b>	- <i>MutS E. Coli homolog of 6</i>
<b>MYC</b>	- <i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
<b>NLS</b>	- <i>Nuclear localization signal</i>
<b>NMD</b>	- <i>Nonsense mediated decay</i>
<b>OB</b>	- <i>Oligonucleotide/oligosaccharide-binding</i>
<b>PALB2</b>	- <i>Partner and localizer of BRCA2</i>
<b>PCR</b>	- <i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PTEN</b>	- <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
<b>Rad 51</b>	- <i>Rad 51 homolog (REC A homolog, E. coli) (S. Cerevisiae)</i>
<b>RB1</b>	- <i>Retinoblastoma 1</i>
<b>RE</b>	- Receptores de estrogénio
<b>RH</b>	- Receptores hormonais
<b>RM</b>	- Ressonância magnética
<b>RNA</b>	- Ácido ribonucleico
<b>RP</b>	- Receptores de progesterona
<b>rpm</b>	- Rotações por minuto
<b>SA</b>	- <i>Splicing alternativo</i>
<b>SNP</b>	- <i>Single nucleotide polymorphism</i>
<b>snRNPs</b>	- <i>Small nuclear ribonucleoproteins</i>
<b>SOBP</b>	- Salpingo-ooforectomia bilateral profiláctica
<b>SR</b>	- <i>Serine/arginine-rich</i>
<b>ssDNA</b>	- <i>single stand DNA</i>
<b>STK11</b>	- <i>Serine/threonine kinase 11</i>

<b>T</b>	- Timina
<b>TP53</b>	- <i>Tumour Protein 53</i>
<b>VSD</b>	- Variante de significado desconhecido
<b>wt</b>	- <i>wild-type</i>



**RESUMO**



O cancro da mama hereditário representa cerca de 5% de todos os cancros da mama (CM). Mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis pela maioria dos casos de CM hereditário e predisõem para a síndrome de cancro da mama/ovário hereditário (*Hereditary Breast and Ovarian Cancer* – HBOC). Os indivíduos portadores de uma mutação germinativa patogénica no gene *BRCA1* ou *BRCA2* têm um risco cumulativo bastante elevado de desenvolver CM e cancro do ovário (CO), sendo portanto fundamental a identificação das famílias portadoras desta síndrome e da mutação responsável pela mesma. O estudo molecular permite diminuir a ansiedade nos familiares em que se venha a demonstrar não serem portadores da mutação patogénica e a adopção de medidas profilácticas e/ou de diagnóstico precoce nos portadores da referida mutação. No entanto, estima-se que 20% das mutações germinativas detectadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são variantes de significado desconhecido (VSD). Este resultado inconclusivo não permite a realização de diagnóstico pré-sintomático aos familiares em risco. Deste modo, é de extrema importância para estas famílias tentar esclarecer o significado destas variantes. Para avaliar a patogénica de VSD nos genes *BRCA1* e *BRCA2* analisam-se alguns critérios: co-segregação da VSD com a doença na família; co-ocorrência da VSD com mutação patogénica; frequência das VSD em controlos normais; efeito da VSD ao nível do processamento do mRNA; os algoritmos informáticos *SpliceSiteFinder*, *ESEfinder* e *Polyphen*; perda de heterozigotia e características histopatológicas dos tumores. Foram estudadas 18 famílias portadoras de 11 VSD no gene *BRCA1* e 16 famílias portadoras de 14 VSD no gene *BRCA2*. Os resultados obtidos permitiram esclarecer 21 das 25 VSD: doze VSD foram classificadas como muito provavelmente neutras (presentes em 19 famílias), quatro VSD como polimorfismos (presentes em seis famílias), cinco VSD como muito provavelmente patogénicas (presentes em sete famílias) e quatro variantes permanecem classificadas como de significado desconhecido (presentes em seis famílias). Este estudo permitiu, por um lado, realçar a importância da integração dos vários parâmetros de avaliação da patogénica de VSD com os modelos teóricos, nomeadamente programas informáticos, e por outro lado constatar a importância dos estudos de mRNA nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e a sua interpretação por comparação com indivíduos normais. A classificação de cinco VSD como variantes muito provavelmente patogénicas permitiu a realização de diagnóstico pré-sintomático de sete famílias com predisposição hereditária para cancro da mama/ovário.



**SUMMARY**



Hereditary breast cancer accounts for about 5% of all breast cancers (BC). Germline mutations in *BRCA1* and *BRCA2* genes are responsible for most cases of hereditary BC and predispose to the Hereditary Breast and Ovarian Cancer syndrome - HBOC. Individuals carrying pathogenic *BRCA1* or *BRCA2* mutations have a high cumulative risk of developing BC and also ovarian cancer and is therefore crucial to identify the families with this syndrome and the causative mutation. The molecular study allows to reduce anxiety of the family members who are not carriers of the pathogenic mutation and the adoption of prophylactic measures and/or early diagnosis in mutation carriers. However, it is estimated that 20% of the germline mutations found in *BRCA1* and *BRCA2* genes are variants of unknown significance (VUS). This inconclusive result does not allow offering pre-symptomatic diagnosis to family members at risk. Thus, it is of utmost importance for these families to clarify the meaning of these variants. To assess the pathogenicity of VUS in *BRCA1* and *BRCA2* different criteria can be analyzed: co-segregation of VUS with the disease in the family, the co-occurrence of VUS with a pathogenic mutation; frequency of VUS in control individuals; effect of VUS on mRNA processing; the algorithms SpliceSiteFinder, ESEfinder and Polyphen; loss of heterozygosity and histopathologic characteristics of tumors. We studied 18 families carrying 11 VUS in *BRCA1* gene and 16 families carrying 14 VUS in *BRCA2* gene. The results allowed to clarify the pathogenicity of 21 of 25 VUS: 12 VUS were classified as probably neutral (in 19 families), four VUS as polymorphisms (in six families), five VUS as most likely pathogenic (in seven families) and four variants remained classified as VUS (in six families). This study has emphasized the importance of integrating multiple parameters for evaluating the pathogenicity of VUS with theoretical models, namely computer algorithms, and also the importance of mRNA studies of *BRCA1* and *BRCA2* and their interpretation by comparison with controls. The identification of five VUS as most likely pathogenic mutations allowed offering pre-symptomatic diagnosis to seven families with hereditary predisposition to breast/ovarian cancer.



## **INTRODUÇÃO**



## 1. Epidemiologia do cancro da mama e ovário

### 1.1. Incidência e mortalidade

O cancro da mama (CM) é a neoplasia maligna com maior incidência e a segunda causa de morte por cancro em indivíduos do sexo feminino nos Estados Unidos da América (EUA). Em 2008 serão diagnosticados 182460 novos casos de CM nos EUA, que representam 26% de todos os novos casos de cancro diagnosticados em mulheres (Jemal *et al*, 2008). Nos países menos desenvolvidos a incidência é menor, nomeadamente em determinadas regiões do continente africano e nas regiões sul e oriental do continente asiático, onde a probabilidade de desenvolver CM aos 75 anos é um terço da dos restantes países desenvolvidos (Parkin, 2001). Por outro lado, o cancro do ovário (CO) representa aproximadamente 30% dos tumores do aparelho genital feminino. Em países desenvolvidos esta neoplasia é tão comum como o cancro do útero (35%) ou do colo do útero (27%) (Tavassoli e Devilee, 2003). Em 2008 serão diagnosticados 15520 novos casos de CO nos EUA que representam 6% de todos os novos casos de cancro diagnosticados em mulheres (Jemal *et al*, 2008).

Estima-se que em 2002 tenham ocorrido 1151298 novos casos de CM e 204499 novos casos de CO em indivíduos do sexo feminino em todo o mundo e registaram-se 410712 e 124860 mortes por CM e CO, respectivamente. Em Portugal, em 2002, a taxa de incidência de CM nas mulheres foi de  $55,5/10^5$  e de CO foi de  $8,6/10^5$  habitantes. A taxa de mortalidade nesse ano foi de  $17/10^5$  e  $3,8/10^5$  habitantes em indivíduos do sexo feminino para CM e CO, respectivamente (Globocan, 2002). O CM no homem (CMH) é raro, representando menos de 1% de todos os CM, mas tem-se verificado um aumento da sua incidência (Weiss *et al*, 2005).

### 1.2. Factores de risco

#### 1.2.1. Cancro da mama esporádico

A grande maioria dos CM incide sobre mulheres sem história familiar da doença. Os factores de risco mais frequentemente apontados são:

- Género: a incidência de CM é 100 vezes superior em indivíduos do sexo feminino (<http://www.cancer.org>).
- Idade: o risco de desenvolver CM aumenta com a idade, sendo que o seu aparecimento é raro antes dos 30 anos de idade, aumenta a partir dos 35 anos e vai

duplicando de 10 em 10 anos até estabilizar por volta dos 80 anos de idade (Hankinson *et al*, 2004; Korde *et al*, 2004).

- Raça e etnia: as mulheres de raça branca apresentam maior incidência de CM relativamente às mulheres afro-americanas, apesar de estas últimas apresentarem maior taxa de mortalidade (<http://www.cancer.org>; Smigal *et al*, 2006).
- Factores hormonais: o risco de CM aumenta com menarca precoce e menopausa tardia devido ao maior período de exposição às hormonas femininas (Kelsey *et al*, 1993). No que respeita à paridade, verificou-se que mulheres que tenham tido pelo menos uma gravidez têm um risco de desenvolver CM 25% menor do que mulheres nulíparas. Esta protecção aumenta com o número de gravidezes, atingindo os 50% em mulheres com cinco ou mais filhos (Layde *et al*, 1989; Ewertz *et al*, 1990). A amamentação tem sido um factor de risco controverso, mas alguns estudos realizados em países menos desenvolvidos (período de amamentação superior) indicam que a amamentação tem um efeito protector (Lipworth *et al*, 2000). Estes resultados estão de acordo com os de países mais desenvolvidos, estando descrita pelo *US Cancer Steroid Hormone Study* uma redução de 33% em mulheres que amamentaram durante pelo menos 25 meses (Layde *et al*, 1989). A menopausa tardia confere também um aumento de risco de 3% por cada ano (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer*, 1997).
- Exposição a hormonas exógenas: os contraceptivos orais assim como a terapia de substituição hormonal, aumentam o risco de CM, mas este efeito diminui bastante após a cessação do seu uso (Magnusson *et al*, 1999).
- Estilos de vida: acredita-se que a obesidade e a ingestão de álcool conferem também risco para desenvolver CM após a menopausa, enquanto a actividade física é provavelmente protectora (Pischon *et al*, 2008). No que respeita ao uso do tabaco, não se verificou associação entre o seu consumo e o risco de CM (Clamp *et al*, 2003; Hankinson *et al*, 2004; Korde *et al*, 2004; Lorincz e Sukumar, 2006; Pischon *et al*, 2008).
- Exposição a radiação: verifica-se uma maior incidência de CM em mulheres que estiveram expostas a radiação, nomeadamente as que desenvolveram doença de Hodgkin e foram tratadas com radioterapia, particularmente antes dos 20 anos de idade (período de maior desenvolvimento do tecido mamário) (McPherson *et al*, 2000; Korde *et al*, 2004; Veronesi *et al*, 2005).

▪ Antecedentes pessoais: a história pessoal de neoplasia da mama constitui também um importante factor de risco para o desenvolvimento de uma segunda neoplasia contralateral ou ipsilateral (McPherson *et al*, 2000; <http://www.cancer.org>).

### **1.2.2. Cancro do ovário esporádico**

Relativamente ao CO existem principalmente dois factores consistentemente associados com esta doença: paridade e uso de contraceptivos orais. O efeito protector das gravidezes e dos contraceptivos orais sugerem uma influência directa da ovulação na origem da doença, mas ainda não existe nenhum mecanismo que estabeleça a ligação entre os factores de risco e a transformação maligna (Fairfield *et al*, 2001). Têm sido também apontados a dieta (Fairfield *et al*, 2001) e o estilo de vida ocidental, em particular a obesidade, como factores de risco para desenvolver CO (Calle *et al*, 2003).

### **1.2.3. História familiar**

As mulheres com história familiar de CM têm um risco aumentado de desenvolver esta neoplasia. Este risco aumenta com o aumento do número de familiares em 1º grau afectados, sendo 1,8 vezes superior em mulheres com um familiar em 1º grau afectado, 2,9 no caso de existirem dois familiares em 1º grau afectados e 3,9 em mulheres com três ou mais familiares em 1º grau afectados. O risco é ainda superior quanto mais jovens são as idades de diagnóstico de CM (*Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer*, 2001).

O risco de desenvolver CO é bastante superior em mulheres com história familiar da doença. Na população em geral é 1,6%, atinge os 5% em mulheres com um familiar em 1º grau afectado e os 7% no caso de dois familiares em 1º grau afectados (Werness *et al*, 2001; Pharoah *et al*, 2002).

## **2. Base genética do cancro**

O cancro é uma doença genética somática que pode resultar de mutações induzidas por factores ambientais (Knudson, 2002). A carcinogénese traduz-se num processo caracterizado por envolver vários eventos que influenciam vias celulares fundamentais para o crescimento e desenvolvimento celulares (Osborne *et al*, 2004).

Existem dois tipos fundamentais de genes que se encontram frequentemente alterados durante o processo de desenvolvimento neoplásico: oncogenes e genes supressores tumorais (Vogelstein e Kinzler, 2004).

### 2.1. Oncogenes

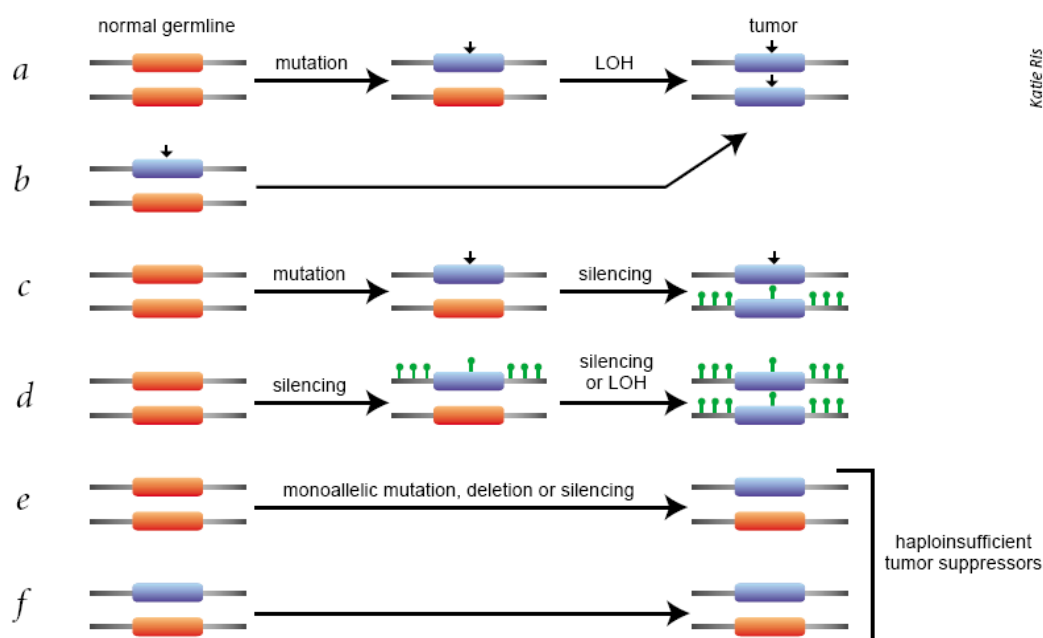
Os oncogenes são formas alteradas dos proto-oncogenes, genes que codificam moléculas reguladoras do crescimento celular e diferenciação normais. Os oncogenes são activados por alteração de apenas um dos alelos, o que por si só pode desencadear um processo de desenvolvimento neoplásico (Weinberg, 1989; Hunter, 1997). A activação dos oncogenes pode ocorrer através de diferentes processos. A amplificação génica origina um aumento dos níveis de proteína expressa, sendo um exemplo de activação por este mecanismo a que ocorre com o gene *ERBB2*. Outro mecanismo de activação é a ocorrência de uma mutação pontual que pode activar constitutivamente a proteína, como é o caso do gene *KRAS*. Os oncogenes podem ainda ser activados por translocação cromossómica, originando genes de fusão com função alterada (como é o caso do *BCR-ABL*) (Osborne *et al*, 2004).

### 2.2. Genes supressores tumorais

Os genes supressores tumorais são genes que codificam proteínas envolvidas na manutenção da estabilidade genómica ou na proliferação celular e cuja perda de função pode permitir o desenvolvimento neoplásico. Segundo a “teoria dos dois eventos” postulada por Knudson em 1971, para que ocorra transformação neoplásica tem de haver inactivação dos dois alelos de um gene supressor tumoral, contrariamente ao que ocorre com os proto-oncogenes. Este modelo foi inicialmente concebido para explicar o desenvolvimento do retinoblastoma, que ocorre tanto em formas esporádicas como hereditárias. No primeiro caso é necessário que ocorra a inactivação somática dos dois alelos do gene *RB1*, enquanto que no segundo caso um dos alelos já se encontra mutado na linha germinativa e basta haver perda do segundo alelo ao nível somático para deixar de se produzir proteína funcional (Levitt e Hickson, 2002).

Os genes supressores tumorais podem ser classificados como *Gatekeepers* ou *Caretakers* (Kinzler e Vogelstein, 1996, 1998). Consideram-se *Gatekeepers* os genes supressores tumorais clássicos, porque actuam directamente, por exemplo, na regulação da proliferação celular e são portanto limitadores da tumorigénese (Levitt e Hickson, 2002). São exemplo destes genes o *RB1*, *APC* e *TP53* (Kinzler e Vogelstein,

1998). Os genes *Caretakers*, por sua vez, estão envolvidos na manutenção da integridade genómica através da reparação de erros de replicação do DNA, actuando indirectamente na carcinogénese. Quando estes genes se encontram mutados conferem um fenótipo de instabilidade genómica devido ao aumento da taxa de mutações, dando origem a variantes que sofrem depois selecção clonal. Esta é a razão pela qual mutações germinativas neste tipo de genes (e.g. *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *BRCA1* ou *BRCA2*) estão associadas a predisposição hereditária para cancro, pois aumentam a probabilidade de ocorrência de mutações que activam proto-oncogenes e inactivam genes supressores tumorais (Lengauer *et al*, 1998; Vogelstein e Kinzler, 2004). Os mecanismos de inactivação de genes supressores tumorais encontram-se representados na Figura 1.



**Figura 1:** Perda de função dos genes supressores tumorais no cancro. *a,b* - Hipótese de Knudson clássica que envolve um evento inicial - mutação (seta vertical) que leva à inactivação do gene durante o desenvolvimento tumoral. As barras a azul representam genes inactivados. A perda de heterozigotia (LOH) resulta na inactivação do 2º alelo. Se a 1ª mutação for germinativa, os indivíduos portadores da mesma têm uma elevada predisposição para desenvolver cancro; *c* - A mutação (seta vertical) pode ser seguida de silenciamento por metilação do promotor, sem LOH; *d* - Silenciamento bialélico de ambas as cópias sem ocorrer LOH ou mutação; *e,f* - Haploinsuficiência em genes supressores tumorais: não necessitam de perder ambas as cópias para que haja aumento de risco. A perda de um dos alelos pode ocorrer por mutação, deleção ou silenciamento e o outro alelo pode permanecer funcional. Em alguns casos (*f*) um alelo parcial ou totalmente não funcional pode ser herdado na linha germinativa, predispondo o indivíduo para o desenvolvimento tumoral sem ser necessária LOH ou inactivação funcional completa (adaptado de Balmain *et al*, 2003).

### 3. Carcinogénese mamária e do ovário

Actualmente ainda não existe um modelo que defina os múltiplos eventos envolvidos na carcinogénese mamária e alguns autores defendem mesmo que existem múltiplas vias de desenvolvimento de CM (Kenemans *et al*, 2004; Simpson *et al*, 2005).

Beckmann e colaboradores (1997) propuseram que a carcinogénese mamária resulta da acumulação de alterações genéticas múltiplas que fazem com que o epitélio mamário normal origine sucessivamente hiperplasia, hiperplasia atípica, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo, o qual se poderá disseminar através dos sistemas linfático e sanguíneo e originar metástases à distância. No entanto, ainda não é consensual se a hiperplasia, a hiperplasia atípica e o carcinoma *in situ* são lesões precursoras obrigatórias de carcinoma invasivo ou se, pelo contrário, este pode desenvolver-se directamente a partir de epitélio normal. Por outro lado, questiona-se também se os diferentes tipos histológicos de tumores da mama resultam de vias de carcinogénese diferentes, desconhecendo-se também até que ponto os modelos propostos para a carcinogénese esporádica se aplicam à carcinogénese mamária no âmbito da predisposição hereditária (Kenemans *et al*, 2004).

Os CM esporádicos resultam da acumulação de mutações a nível somático, sem que exista qualquer mutação germinativa. Pensa-se que a activação de oncogenes, aliada à inactivação de genes supressores tumorais constitui, provavelmente, um evento precoce na origem dos tumores esporádicos, seguido de mutações em vários outros genes que acompanham a progressão da carcinogénese (Kenemans *et al*, 2004). São exemplo de oncogenes envolvidos na progressão tumoral, o gene *MYC* que se encontra amplificado em 20% dos CM (Berns *et al*, 1992), a ciclina D1 (*CCND1*) que se encontra amplificada em 15 a 20% dos CM (Zwijssen *et al*, 1997) e o gene *ERBB2* que está amplificado em 20 a 30% dos CM (Tsuda *et al*, 2001). No que respeita aos genes supressores tumorais, 20% dos CM apresentam mutações no gene *TP53* (Pharoah *et al*, 1999) e a caderina-E (*CDH1*) encontra-se mutada em 60% dos carcinomas lobulares infiltrativos mas não em carcinomas ductais (Bex *et al*, 1996).

Relativamente à carcinogénese do ovário, considera-se que o carcinoma se inicia no ovário, sofre progressiva desdiferenciação de um estado bem diferenciado para um pouco diferenciado e dissemina para as cavidades pélvica e abdominal antes de metastizar à distância (Kurman e Shih, 2008). Estes autores propõem um modelo segundo o qual os tumores do ovário são divididos em dois grupos designados tipo I e

tipo II. Os tumores do tipo I apresentam crescimento lento, geralmente confinado ao ovário na altura do diagnóstico e desenvolvem-se a partir de lesões precursoras designadas tumores *borderline*. Os tumores do tipo I incluem os carcinomas micropapilar seroso de baixo grau, mucinoso, endometrióide, e de células claras. São tumores geneticamente estáveis e podem apresentar mutações em genes como *KRAS*, *BRAF*, *PTEN*, e *CTNNB1*. Os tumores do tipo II são de crescimento rápido e altamente agressivos, para os quais ainda não foram descritas lesões precursoras. Estes tumores incluem o carcinoma seroso de alto grau, carcinosarcomas e tumores indiferenciados. Este grupo apresenta elevada instabilidade genética e caracteriza-se pela ocorrência de mutações no gene *TP53*. No entanto, apenas 25% dos tumores do ovário são do tipo I e a maioria dos CO pertencem mesmo ao tipo II, justificando o insucesso do diagnóstico precoce desta neoplasia e o mau prognóstico que geralmente apresenta (Kurman e Shih, 2008).

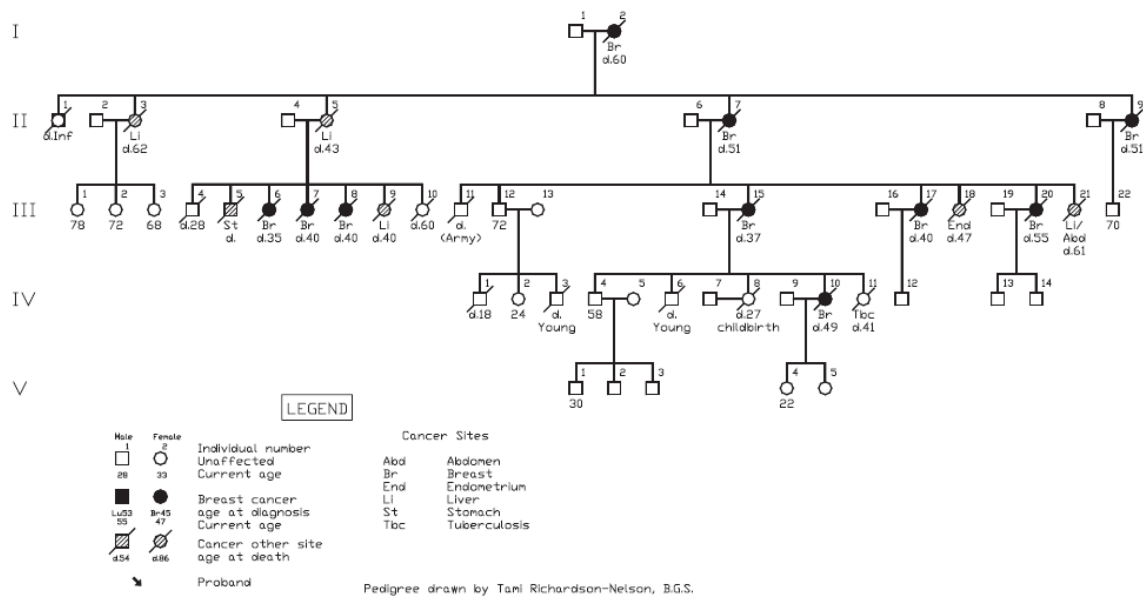
O CM hereditário deve-se à presença de uma mutação germinativa num alelo de um gene de susceptibilidade de alta penetrância (e.g. *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, *STK11* ou *PTEN*) (Kenemans *et al*, 2004), associada à aquisição de várias alterações cromossómicas e mutações pontuais somáticas. O CO hereditário pode resultar de mutações germinativas no gene *BRCA1* ou *BRCA2* tal como o CM hereditário ou pode resultar de mutações nos DNA *mismatch repair genes*, nomeadamente *MLH1* e *MSH2* (pouco frequente) (Kurman e Shih, 2008).

#### 4. Cancro da mama/ovário hereditário

O cancro da mama hereditário foi inicialmente referenciado pelo cirurgião francês Paul Broca, que descreveu a história familiar de cancro da sua mulher e a publicou em 1866 (Broca, 1866). A história familiar relatada sugeria já uma predisposição hereditária para cancro nesta família, mas a base genética subjacente permaneceu desconhecida durante várias décadas (Figura 2).

Estudos de *linkage* em famílias com múltiplos casos de CM e CO revelaram uma associação entre este fenótipo e o *locus* 17q21 (King, 1990). Já em 1994 foi clonado o gene de susceptibilidade localizado neste *locus*: *BRCA1* (*breast cancer 1, early onset*) (OMIM 113705) (Miki *et al*, 1994). No mesmo ano foi estabelecida a relação entre o cromossoma 13 e o outro principal gene de susceptibilidade para cancro da mama e/ou ovário hereditário: o gene *BRCA2* (*breast cancer 2, early onset*)

(OMIM 600185) localizado em 13q12.3, que foi clonado um ano mais tarde (OMIM 600185) (Wooster *et al*, 1995).



**Figura 2:** Árvore genealógica da família da mulher de Paul Broca, baseada na descrição original deste autor em 1866 (adaptado de Lynch *et al*, 2008).

Actualmente estima-se que o CM hereditário representa cerca de 5% de todos os CM. Mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis por 50% dos casos de CM hereditário e predis põem para a síndrome de cancro da mama/ovário hereditário (*Hereditary Breast and Ovarian Cancer - HBOC*), cuja transmissão é autossômica dominante (Lynch *et al*, 2008). A penetrância das mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* é incompleta e depende de diferentes factores, como o tipo de mutação, a população e/ou factores exógenos. Em geral, mulheres portadoras de mutações germinativas no gene *BRCA1* apresentam um risco cumulativo de desenvolver CM de 51 a 95% aos 70 anos de idade, enquanto 22 a 66% das portadoras *BRCA1* desenvolvem CO até à mesma idade. Relativamente ao gene *BRCA2*, o risco cumulativo aos 70 anos oscila entre os 33 e 95% para CM e entre 4 e 47% para CO (Narod e Foulkes, 2004; Turner *et al*, 2004; Bermejo-Perez *et al*, 2007).

Existem outras síndromes com transmissão autossômica dominante que conferem também um risco aumentado de desenvolver CM, sendo, no entanto, menos frequentes: Síndrome de Li-Fraumeni (mutações no gene *TP53*), Síndrome de Cowden (mutações no gene *PTEN*) e a Síndrome de Peutz-Jeghers (mutações no gene *STK11*) (Campeau *et al*, 2008).

#### 4.1. Identificação de famílias com mutação no gene *BRCA1* ou *BRCA2*

Indivíduos portadores de uma mutação germinativa patogénica no gene *BRCA1* ou *BRCA2* têm um risco cumulativo bastante elevado de desenvolver CM e CO, sendo portanto fundamental a identificação das famílias portadoras desta síndrome (Antoniou *et al*, 2003; Fackenthal e Olopade, 2007).

Os critérios que sugerem a presença de HBOC numa determinada família encontram-se enumerados na Tabela 1. As famílias que apresentam um fenótipo sugestivo de HBOC são seleccionadas em consulta de aconselhamento genético, durante a qual se explicam as implicações de ser portador de uma mutação germinativa no gene *BRCA1* ou *BRCA2*, as medidas de vigilância e profilaxia adequadas e a possibilidade de realizar a pesquisa da mutação nos restantes familiares em risco (Metcalf *et al*, 2008).

**Tabela 1:** Critérios de Referenciação para Consulta de Risco Familiar / Aconselhamento Genético (VI Reunião de Consenso Nacional do Cancro da Mama, Sociedade Portuguesa de Senologia (SPS), 2008).

- 
1. Familiar de portador de mutação germinativa patogénica;
  2. Três casos de CM em familiares do 1º grau, do mesmo ramo da família e um deles diagnosticado antes dos 50 anos;
  3. Três casos de CM em familiares do 1º ou 2º grau se a linha paterna for a afectada e um deles diagnosticado antes dos 50 anos;
  4. Dois casos de CM em qualquer idade, desde que exista no mesmo ramo da família um caso de CO;
  5. Um caso de CM antes dos 45 anos e de CO em qualquer idade;
  6. CM bilateral antes dos 50 anos e um familiar com CM ou CO;
  7. Duas irmãs com CM antes dos 40 anos ou uma delas com CO antes dos 50 anos;
  8. CM ou CO antes dos 30 anos;
  9. CM antes dos 40 anos com o diagnóstico histológico de carcinoma pouco diferenciado, medular ou com ausência de expressão de receptores hormonais e de HER2;
  10. Homem com CM.
- 

A probabilidade de uma dada família ser portadora de uma mutação germinativa patogénica nestes genes pode ser calculado recorrendo a programas informáticos, como o BRCAPRO, que estima, com base na história familiar, o risco de

determinado indivíduo ser portador de uma mutação germinativa num destes genes (Parmigiani *et al*, 1998; Berry *et al*, 2002).

Sempre que é detectada uma mutação patogénica no gene *BRCA1* ou *BRCA2* num doente, a mesma alteração poderá ser pesquisada nos elementos em risco da família. Este estudo molecular pode contribuir para a diminuição da ansiedade nos familiares em que se venha a demonstrar não serem portadores da mutação patogénica, bem como permitir a adopção de medidas profilácticas e/ou de diagnóstico precoce nos portadores da referida mutação (Lynch *et al*, 2008; Metcalfe *et al*, 2008).

### **4.2. Características clínico-patológicas dos tumores *BRCA1* e *BRCA2***

Os CM de indivíduos portadores de mutação nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* apresentam algumas diferenças relativamente aos CM esporádicos. Apesar das diferentes características clinicopatológicas dos dois grupos, ainda não existem dados suficientes que permitam usar o *status BRCA1/2* como factor de prognóstico nestes indivíduos.

Os CM associados ao gene *BRCA1* são mais frequentemente do que os esporádicos carcinomas medulares, receptores hormonais (RE e RP) e *HER2* negativos, de alto grau histológico e com alta taxa de proliferação (Lakhani *et al*, 1998; Honrado *et al*, 2005). Estes tumores são mais frequentemente aneuplóides e sobreexpressam a proteína TP53 (Honrado *et al*, 2005). É também comum estes tumores apresentarem um fenótipo “*basal-like*”, com expressão de genes associados ao fenótipo das células basais/mioepiteliais da mama, tais como as citoqueratinas CK5/6, CK14 e CK17, vimentina, p-caderina,  $\alpha$ B *crystallin*, fascina e caveolina 1 e 2. Muitos destes tumores “*basal-like*” são, do ponto de vista imuno-histoquímico, “*triple negative*” (RE, RP e *HER2* negativos) (Brekelmans *et al*, 2006; Robson, 2007; Reis-Filho e Tutt, 2008). Apesar de o diagnóstico de um tumor com este fenótipo poder sugerir a presença de mutação germinativa no gene *BRCA1*, os carcinomas da mama “*basal-like*” representam mais de 15% de todos os CM e os associados a mutações germinativas neste gene são apenas uma pequena parte de todos os CM com este fenótipo. Por outro lado, existe uma proporção significativa dos CM hereditários, nomeadamente associados ao *BRCA1*, que não pertencem a este subtipo (Robson, 2007; Reis-Filho e Tutt, 2008). A sobrevivência dos portadores de mutação *BRCA1* é equivalente ou inferior à dos indivíduos que desenvolvem tumores esporádicos (Robson *et al*, 2001; Evans e Howell, 2004; Foulkes, 2006; Campeau *et al*, 2008).

Os CM de portadores de mutação no gene *BRCA2* não têm um fenótipo tão definido como os *BRCA1*, apresentando maior grau de semelhança com os tumores

esporádicos. No entanto, são mais frequentemente RE positivos, HER2 negativos e ciclina D1 positivos do que os tumores esporádicos (Lakhani *et al*, 1998; Honrado *et al*, 2005). Os estudos que avaliaram a sobrevida dos portadores de mutação *BRCA2* não encontraram diferenças relativamente aos indivíduos que desenvolvem tumores esporádicos (Robson *et al*, 2001; Evans e Howell, 2004; Foulkes, 2006; Campeau *et al*, 2008).

No que respeita ao CO, os portadores de mutação no gene *BRCA1* ou *BRCA2* desenvolvem frequentemente tumores serosos de moderado a alto grau, sendo pouco frequente estes indivíduos desenvolverem tumores mucinosos ou tumores *borderline* (Boyd *et al*, 2000).

### **4.3. Seguimento de portadores de mutação no gene *BRCA1* ou *BRCA2***

O seguimento dos portadores de mutação no gene *BRCA1* ou *BRCA2* engloba a adopção de medidas de cirurgia profiláctica ou de medidas preventivas não cirúrgicas.

A cirurgia profiláctica tem como objectivo reduzir o risco de desenvolver cancro e a mortalidade. As opções cirúrgicas de redução de risco incluem a mastectomia bilateral profiláctica (MBP), a mastectomia contra-lateral profiláctica (MCLP, em doentes já diagnosticados com CM), e/ou a salpingo-ooforectomia bilateral profiláctica (SOBP) (Roukos *et al*, 2002).

Diversos estudos demonstraram uma redução de 85-100% do risco de desenvolver CM em mulheres de alto risco que realizaram MBP (Hartmann *et al*, 1999; Hartmann *et al*, 2001; Meijers-Heijboer *et al*, 2001; Rebbeck *et al*, 2004). Adicionalmente Rebbeck *et al* (2004) verificaram uma redução de risco de aproximadamente 95% em mulheres que realizaram previamente ou concomitantemente SOBP, tornando estas as medidas mais eficazes para mulheres portadoras de mutação nos genes *BRCA1* ou *BRCA2*. Um estudo recente comparou a qualidade de vida de mulheres que optaram por cirurgia conservadora ou por mastectomia unilateral com a das que optaram por mastectomia da mama afectada e MCLP e não observou diminuição da qualidade de vida neste último grupo (Tercyak *et al*, 2007). A SOBP é, provavelmente, a opção cirúrgica profiláctica com maior adesão e confere uma redução de risco de CO de aproximadamente 90% e de CM de aproximadamente 50% (Rebbeck *et al*, 2002; Eisen *et al*, 2005). Um estudo mais recente revelou que além da redução de risco de desenvolver CO e CM, a SOBP diminui a mortalidade nestas mulheres (Domchek *et al*, 2006).

As opções de prevenção não cirúrgicas incluem a vigilância, a quimioprevenção e o controlo dos factores de risco não genéticos (semelhantes aos do CM esporádico). No entanto, não existem evidências de que o controlo dos factores de risco seja suficiente como medida preventiva (Roukos e Briasoulis, 2007).

Relativamente às opções de vigilância mamária, recomenda-se o início da realização do exame clínico e dos exames imagiológicos 5 a 10 anos antes da idade de diagnóstico do CM mais precoce na família ou a partir dos 25 anos de idade (VI Reunião de Consenso Nacional do Cancro da Mama, SPS, 2008). Deve ser realizada mamografia anual, auto-exame da mama mensal e exame clínico da mama duas vezes por ano, a partir dos 25 anos (Pichert *et al*, 2003; Smith *et al*, 2003; NCCN, 2008). Em consequência das limitações da mamografia em mulheres jovens, com tecido mamário denso, sugerem-se actualmente outras técnicas de diagnóstico imagiológico, assim como intervalos de realização do mesmo menores do que um ano devido ao rápido desenvolvimento do CM nas portadoras de mutação (Komenaka *et al*, 2004; Kriege *et al*, 2004). A ressonância magnética (RM) tem-se demonstrado uma técnica mais sensível do que a mamografia nas portadoras de mutação. No entanto, apesar desta maior sensibilidade, aproximadamente 40% das mulheres diagnosticadas com CM apresentam já envolvimento ganglionar aquando do diagnóstico (Kriege *et al*, 2004).

A detecção precoce de CO deve iniciar-se a partir dos 35 anos com periodicidade semestral. As medidas aconselhadas são a ecografia transvaginal com *doppler* e o doseamento do CA 125 sérico, mas estas medidas têm-se revelado muito pouco eficazes na detecção precoce desta neoplasia (Madalinska *et al*, 2007; VI Reunião de Consenso Nacional do Cancro da Mama, SPS, 2008). Deste modo, apesar de o risco de CO ser inferior ao de CM em portadores de mutação *BRCA1* ou *BRCA2*, o diagnóstico destes tumores acontece geralmente em estádios avançados, o que, aliado ao facto destas mulheres desenvolverem frequentemente tumores de alto grau, lhes confere uma sobrevida muito baixa (Hogg e Friedlander, 2004).

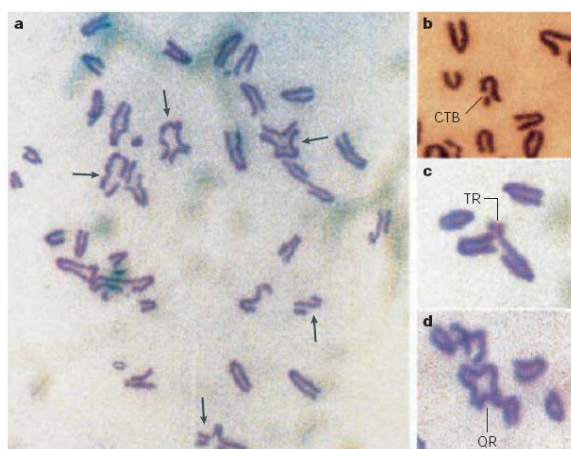
A quimioprevenção baseia-se no facto de os RE terem grande importância na origem e progressão do CM. O tamoxifeno é um inibidor dos RE amplamente usado no tratamento de CM com RE positivos, conferindo-lhes um aumento significativo da sobrevida. No entanto, há alguma evidência de que a eficácia do tamoxifeno na prevenção de CM se verifica apenas em portadoras de mutação *BRCA2*, o que é consistente com o facto de estas desenvolverem maioritariamente tumores que expressam RE (Fisher *et al*, 2005; Bramley *et al*, 2006; Kote-Jarai *et al*, 2007). De referir também que o tamoxifeno possui efeitos secundários graves, como o aumento de risco de cancro do endométrio e de doenças tromboembólicas (Cuzick *et al*, 2003).

Uma vez que a maioria dos estudos acerca da eficácia do tamoxifeno envolvem doentes com CM esporádico e que a sua eficácia ainda não está devidamente demonstrada em portadores de mutação *BRCA1* ou *BRCA2*, ainda não é consensual o seu uso como estratégia de profilaxia nestes indivíduos fora de ensaios clínicos.

## 5. Funções e mutações dos genes *BRCA1* e *BRCA2*

### 5.1. Funções dos genes *BRCA1* e *BRCA2*

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* são considerados genes supressores tumorais (*caretakers*) devido às suas funções de manutenção da estabilidade genómica, como já foi demonstrado por vários estudos que revelaram elevada instabilidade genómica (translocações, duplicações e aneuploidia) entre cromossomas não homólogos em células sem *BRCA1* ou *BRCA2* funcional (Figura 3) (Patel *et al*, 1998; Moynahan *et al*, 2001a, 2001b; Sharan *et al*, 2004).



**Figura 3:** Instabilidade cromossômica em células de rato sem proteína *BRCA2* funcional. Observam-se quebras de cromátides (CTB) e formação de cromossomas tri-radiais (Tr) e quadri-radiais (Qr) (adaptado de Patel *et al*, 1998).

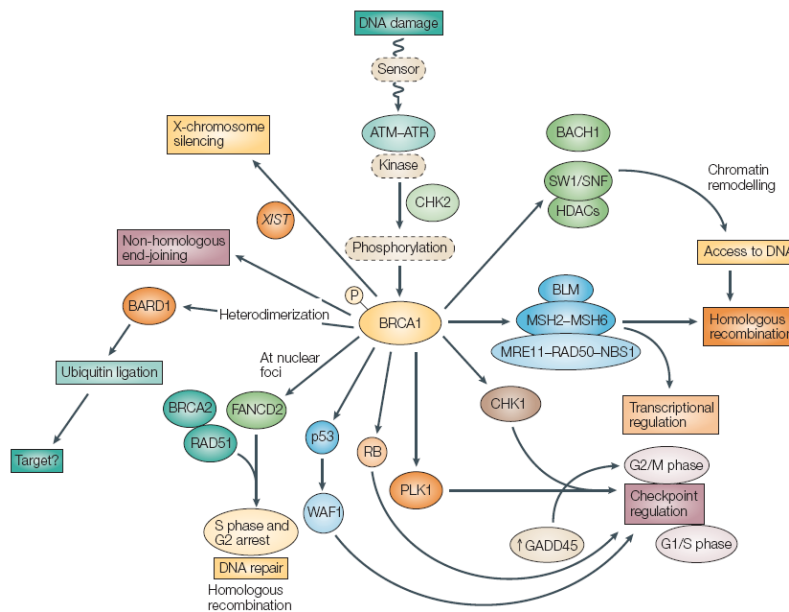
O gene *BRCA1* localiza-se no braço longo do cromossoma 17 (17q21), contém 24 exões e codifica uma proteína (*BRCA1*) com 1863 aminoácidos (aa). A sequência deste gene é, em geral, pouco conservada ao longo das espécies de mamíferos, com excepção de duas regiões altamente conservadas: o domínio *RING-finger* localizado no N-terminal da proteína e os domínios *BRCA1 C terminus* (BRCT) localizados no C-terminal da mesma (Figura 4). O domínio *RING-finger* heterodimeriza com a *BRCA1*-

associated RING domain 1 (BARD1) (Wu *et al*, 1996; Brzovic *et al*, 2001). Os dois domínios BRCT compreendem aproximadamente 100 aa e estão igualmente presentes em outras proteínas de reparação. Estes domínios medeiam a interacção proteína-proteína com fosfoproteínas, como a BRIP/FANCI, CtIP, etc (Yu *et al*, 2003).



**Figura 4:** Estrutura e principais domínios funcionais RING-finger, nuclear localization signal (NLS) e domínios BRCT da proteína BRCA1 (adaptado de Boulton, 2006).

A proteína BRCA1 está envolvida em vários processos celulares, como a reparação do DNA e a activação da transcrição (Figura 5).

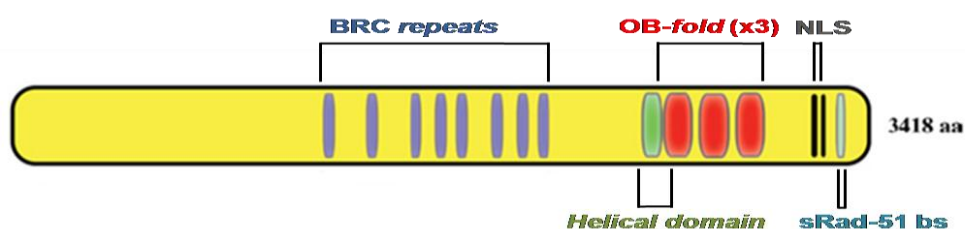


**Figura 5:** Esquema representativo das diferentes interações da proteína BRCA1 e funções celulares em que está envolvida (adaptado de Narod e Foulkes, 2004).

Hartman e Ford (2002) demonstraram que a proteína BRCA1 activa a expressão de diversos genes, mas não se sabe se este efeito é directo ou resulta das suas funções de reparação e regulação do ciclo celular. Adicionalmente, foram descritas funções desta proteína na ubiquitinação de outras proteínas devido à presença do domínio RING-finger no N-terminal, envolvido nesta função, e também presente na proteína BARD1 que interage com a BRCA1 nesse local. Pensa-se que

esta função também decorre do *stress* induzido pela replicação do DNA, estando portanto também relacionada com a função de reparação da proteína BRCA1 (Morris e Solomon, 2004). A remodelação da cromatina é outro dos processos em que a BRCA1 está envolvida. Esta ocorre em torno das quebras da cadeia dupla de DNA (*double-strand breaks* - DSBs) e pensa-se que facilita a reparação do DNA (Narod e Foulkes, 2004; Foulkes, 2007).

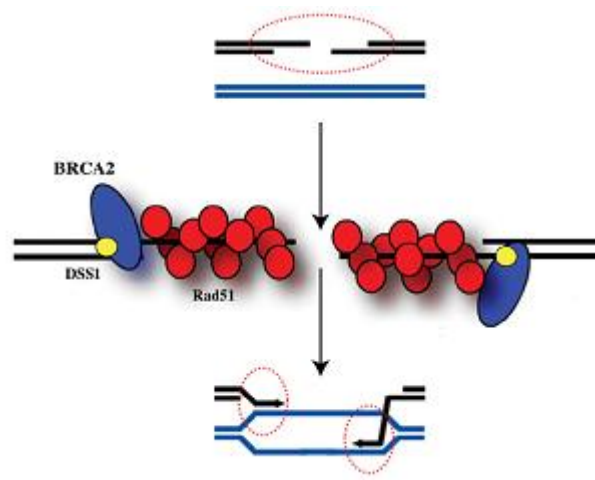
O gene *BRCA2* localiza-se no braço longo do cromossoma 13 (13q12.3), contém 27 exões e codifica uma proteína com 3418 aa, que constitui uma das maiores moléculas do proteoma humano. Na região que compreende o segundo terço da proteína encontram-se os domínios BRC, que se estendem ao longo de 1000 aa. Os domínios BRC medeiam a ligação directa à Rad51 (proteína de reparação do DNA) sendo portanto essenciais para as funções de reparação do DNA desempenhadas pela proteína BRCA2 (Chen *et al*, 1998). Yang e colaboradores (2002) identificaram uma região de 800 aa na região terminal da proteína que se associa ao polipéptido DSS1. A análise estrutural do terminal carboxilo da proteína BRCA2 revelou a presença de alguns domínios importantes, sendo o primeiro o domínio de ligação ao DNA, constituído por hélices  $\alpha$  e designado *helical domain*. Os três seguintes são domínios *oligonucleotide/oligosaccharide-binding* (OB), designados OB1, OB2 e OB3, que apresentam homologia com outras proteínas de ligação ao DNA de cadeia simples em procariontes e eucariotes. Surgem depois os domínios *nuclear localization signal* (NLS) e o *single Rad51-binding site* (Figura 6).



**Figura 6:** Estrutura da proteína *BRCA2* e principais domínios funcionais: *BRC repeats*, o domínio de ligação ao DNA – *helical domain*, os domínios *OB-fold*, o *nuclear localization signal* (NLS) e o *single Rad51-binding site* (sRad-51 bs) (adaptado de Boulton, 2006).

As proteínas BRCA1 e BRCA2 associam-se com a proteína Rad51 para a reparação de DSBs por recombinação homóloga (*homologous recombination* - HR) (Scully *et al*, 1997; Chen *et al*, 1998). As DSBs ocorrem naturalmente devido ao metabolismo celular ou são induzidos por radiação ionizante ou ainda por toxinas

(Foulkes, 2007). As proteínas BRCA1, BRCA2 e Rad51 actuam juntas na reparação do DNA, enquanto que a interacção entre a BRCA1 e Rad51 parece ser indirecta. A proteína BRCA2 interage directamente com a Rad51 formando um complexo da maquinaria de HR em células humanas (Figura 7) (Anderson *et al*, 1998). Além da Rad51, a proteína BRCA2 também interage directamente com pelo menos três proteínas: Rad51, DSS1 e PALB2. A DSS1 parece ter um papel fundamental em proporcionar a associação do complexo BRCA2-Rad51 aos locais de reparação (Gudmundsdottir *et al*, 2004). A PALB2 associa-se com a BRCA2, sendo essencial para a ancoragem desta última às estruturas nucleares para as funções de reparação do DNA (Xia *et al*, 2007).



**Figura 7:** Modelo representivo da acção da proteína BRCA2 na reparação das quebras da cadeia dupla de DNA por recombinação homóloga. A BRCA2 recruta a Rad51 para os locais de DSB, seguindo-se a ligação do complexo BRCA2-DSS1 à junção ssDNA/dsDNA, facilitando a ligação da Rad51 à extremidade ssDNA, formando um fragmento nucleoproteico. A Rad51, tendo como molde um cromosoma homólogo, forma um *loop* e catalisa a junção das cadeias para que se processe a reparação por recombinação homóloga (adaptado de Boulton, 2006).

Apesar de ainda existirem dúvidas acerca das funções, dos mecanismos subjacentes e das proteínas envolvidas nas vias celulares onde actuam a BRCA1 e BRCA2, é consensual que estas duas proteínas desempenham papéis cruciais na manutenção da estabilidade genómica (Boulton, 2006).

## 5.2. Mutações germinativas patogénicas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*

A identificação de mutações patogénicas nas famílias com critérios HBOC é determinante no seu seguimento clínico, de modo a permitir realizar o diagnóstico pré-sintomático (Domchek e Weber, 2008). A patogenicidade de muitas mutações nestes genes pode ser facilmente deduzida pela natureza das mesmas, como é o caso de grandes deleções exónicas e mutações do tipo *frameshift* que originam alteração da grelha de leitura do RNA e formação de um codão de terminação prematuro. Existem também outras mutações designadas *nonsense* que consistem na troca de um nucleótido convertendo o codão em que ocorre essa troca num codão de terminação prematuro. Estes tipos de mutações originam transcritos instáveis ou resultam na perda de domínios funcionais importantes da proteína e são geralmente interpretadas como patogénicas, ou seja, mutações que causam perda de função da proteína (Chenevix-Trench *et al*, 2006).

No entanto, estima-se que 20% das mutações germinativas detectadas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são variantes de significado desconhecido (VSD). As VSD incluem mutações *missense* (que alteram um nucleótido originando a substituição do aminoácido afectado), mutações silenciosas (que consistem na troca de um nucleótido mas não alteram o aminoácido codificado pelo codão afectado), mutações intrónicas, mutações que ocorrem nas regiões de *splicing* e ainda deleções ou inserções *in frame* (não alteram a grelha de leitura do RNA) (Easton *et al*, 2007).

O aconselhamento genético das famílias portadoras de VSD é dificultado pelo facto de o resultado do estudo genético ser inconclusivo, não permitindo a realização de diagnóstico pré-sintomático aos familiares em risco. Deste modo, é de extrema importância para estas famílias tentar esclarecer o significado destas VSD (Goldgar *et al*, 2004; Chenevix-Trench *et al*, 2006).

## 5.3. Avaliação da patogenicidade de VSD nos genes *BRCA1* e *BRCA2*

Existem alguns critérios que permitem avaliar a probabilidade da patogenicidade ou neutralidade das VSD (Goldgar *et al*, 2004; Chenevix-Trench *et al*, 2006; Easton *et al*, 2007; Domchek e Weber, 2008). Cada um destes critérios é discutido a seguir.

### **5.3.1. Co-segregação da VSD com a doença na família**

Assumindo que as VSD têm a mesma penetrância média que as mutações patogénicas em geral, quando uma VSD não segrega com a doença na família (não está presente em pelo menos um familiar afectado com CM ou CO, em idade precoce) torna-se improvável que seja patogénica, podendo tratar-se de uma variante neutra ou de um polimorfismo. Quando uma VSD segrega com a doença na família, é possível que seja patogénica. No entanto, nem sempre o número de familiares afectados vivos é suficientemente grande para se conseguir tirar conclusões a partir dos dados de co-segregação (Goldgar *et al*, 2004; Chenevix-Trench *et al*, 2006; Easton *et al*, 2007; Domchek e Weber, 2008).

### **5.3.2. Co-ocorrência da VSD com mutação patogénica**

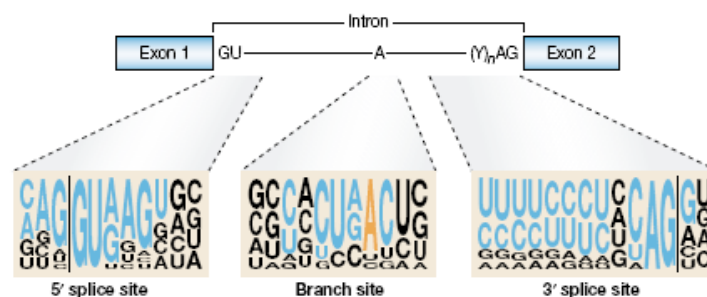
A co-ocorrência de uma VSD com uma mutação patogénica em *trans* (uma mutação em cada alelo) no mesmo gene sugere que a VSD é neutra, uma vez que indivíduos com duas mutações patogénicas no gene *BRCA1* são extremamente raros e dado que existem fortes evidências biológicas e genéticas de que mutações patogénicas homozigóticas neste gene são embrionicamente letais (Gowen *et al*, 1996; Hohenstein *et al*, 2001). É igualmente raro haver indivíduos com duas mutações patogénicas no mesmo alelo (*cis*) (Domchek e Weber, 2008). Relativamente ao gene *BRCA2*, assume-se que indivíduos homozigóticos para mutações patogénicas são igualmente letais ou originam fenótipo de Anemia de *Fanconi* tipo D1 (Howlett *et al*, 2002; Alter *et al*, 2007).

### **5.3.3. Frequência das VSD em controlos normais**

A detecção de uma VSD numa população de controlos normais com frequência igual ou superior a 1% sugere que se trata de um polimorfismo. No entanto, o facto de uma VSD apresentar uma frequência inferior a 1% não exclui a hipótese de se tratar de uma variante neutra pouco frequente na população. Segundo Chenevix-Trench *et al* (2006), dado que a frequência de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* na população caucasiana é inferior a 0,1% e dada a enorme variedade de mutações patogénicas descritas nestes genes, a probabilidade de uma variante com uma frequência de 0,5% na população controlo ser patogénica é igualmente muito pequena.

### 5.3.4. Efeito das VSD ao nível do processamento do mRNA

O *splicing* é o processo que envolve a remoção dos intrões do transcrito primário (pré-mRNA) dando origem ao mRNA maduro. Este processo é realizado por um complexo multiproteico designado spliceosoma. O spliceosoma é constituído por cinco tipos de *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNPs) e centenas de outras proteínas auxiliares que reconhecem as extremidades conservadas dos intrões. Estas sequências são o 5' *splice site* (também designado *donor splice site*), onde o dinucleótido GU é seguido de uma região menos conservada, e o 3' *splice site* (também designado *acceptor splice site*), que consiste num *branch site* (resíduo adenina bastante conservado) seguido de uma região rica em pirimidinas (*pyrimidine-rich region*) e do dinucleótido conservado AG (Figura 8) (Black, 2003).

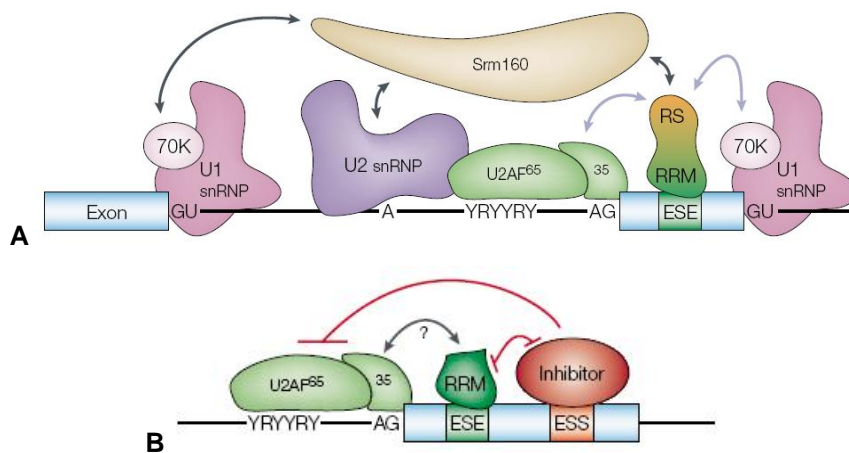


**Figura 8:** Sequências consenso de *splicing* do pré-mRNA: 5' *splice site*, 3' *splice site*, *pyrimidine-rich region* e *branch site*. O tamanho de cada nucleótido conservado é proporcional à frequência com que ocorre em 1683 intrões humanos, estando os nucleótidos que pertencem aos domínios consenso clássicos representados a azul (com excepção do *branch-point A*) (adaptado de Cartegni *et al*, 2002).

Aproximadamente 15% das mutações que causam doenças genéticas afectam o *splicing* do pré-mRNA, sendo que tanto inactivam como criam *splice sites*. Quando um *splice site* é completamente inactivado por mutação, é favorecido o uso de outro mais próximo, originando moléculas de mRNA resultantes de *splicing* aberrante e frequentemente proteínas não funcionais. Quando a alteração é parcial, os *splice sites* crítico e mutado competem, originando moléculas de mRNA normais e aberrantes com conseqüente redução dos níveis de proteína normal produzida (Black, 2003).

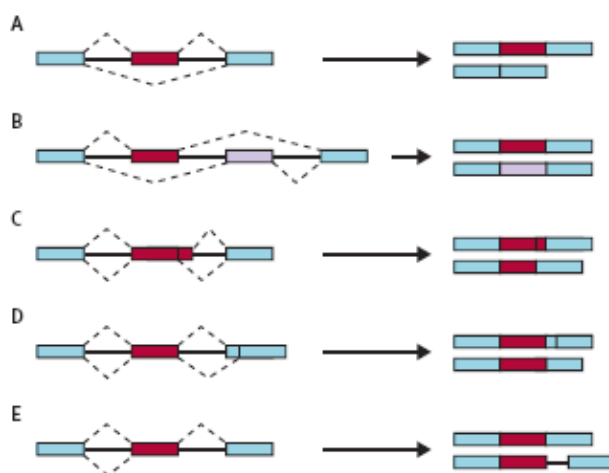
Além das sequências consenso referidas anteriormente, existem elementos exónicos e intrónicos que podem ser activadores – *exonic* e *intronic splicing enhancers* (ESEs e ISEs) ou repressores - *exonic* e *intronic splicing silencers* (ESSs e ISSs). Estas sequências contêm aproximadamente 10 nucleótidos e são locais de

reconhecimento de *heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNPs) e *SR proteins* (*serine/arginine-rich proteins*) que estimulam ou reprimem o uso de outros *splice sites* (Cartegni *et al*, 2002; Srebrow e Kornblihtt, 2006) (Figura 9). Deste modo, além das mutações nas regiões consenso de *splicing*, é importante ter em atenção que as mutações *missense* e silenciosas podem também afectar sequências reguladoras (activadoras e repressoras) ao nível exónico e provocar alterações na proteína produzida. Por exemplo, se uma mutação *missense* abolir uma ESE e causar *skipping* do exão, vai originar não apenas uma proteína com um aa alterado mas uma proteína com uma grande deleção ou, se a grelha de leitura for alterada, a formação de um codão de terminação prematuro (Cartegni *et al*, 2002; Srebrow e Kornblihtt, 2006). Liu *et al* (2001) descreveram mutações *missense* e *nonsense* em vários genes, incluindo o *BRCA1*, que originam *skipping* de exões. Os codões de terminação prematuros, independentemente de resultarem de mutações *nonsense* ou *frameshift* ou de *skipping* de exões induzido por mutações, normalmente despoletam o mecanismo de *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD). Este mecanismo leva à degradação de mRNAs com codões de terminação prematuros (Cartegni *et al*, 2002).



**Figura 9:** Modelo de actuação das *SR proteins* nos mecanismos de *splicing* dependentes de ESEs. A - Mecanismo dependente de *SR proteins* que se ligam às ESEs através dos domínios RRM (RNA recognition motifs) e recrutam toda a maquinaria de *splicing* através do domínio RS (domínio rico em dipéptidos Arg/Ser). B - Mecanismo independente do domínio RS em que a principal função das *SR proteins* é ligarem-se às ESEs e antagonizar o efeito negativo no processo de *splicing* induzido pela ligação de proteínas inibidoras à sequência ESE (adaptado de Cartegni *et al*, 2002).

O *splicing* alternativo (SA) é um mecanismo fundamental que permite a síntese de proteínas estrutural e funcionalmente diferentes a partir do mesmo gene. Este processo ocorre em mais de 70% dos genes humanos, sugerindo que o SA e as modificações pós-tradução são os responsáveis pela complexidade do proteoma humano. Existem pelo menos cinco padrões de SA que podem ser combinados originando múltiplas isoformas de mRNA do mesmo gene (Figura 10) (Cartegni *et al*, 2002; Black, 2003). O SA é controlado de acordo com o tipo celular, o estado de desenvolvimento, processos fisiológicos, determinação do sexo ou em resposta a factores de stress (Pajares *et al*, 2007).



**Figura 10:** Mecanismos de *splicing* alternativo: inclusão de exões (A), exões mutuamente exclusivos (B), 5' *splice sites* alternativos (C), 3' *splice sites* alternativos (D) e retenção de intrão (E) (adaptado de Pajares *et al*, 2007).

### **5.3.5. Algoritmos informáticos: *SpliceSiteFinder*, *ESEfinder* e *Polyphen***

Existem vários programas informáticos disponíveis para prever o efeito de uma mutação *missense* ou de *splicing* baseados no grau de conservação, posição e natureza do aminoácido ou nucleótido alterado.

O *SpliceSiteFinder* é um algoritmo informático baseado em Shapiro e Senapathy (1987), que prevê a presença e eficiência relativa (*score*) dos locais conservados *donor* e *acceptor* após a introdução das sequências nucleotídicas normal e mutada.

Contrariamente às mutações que afectam as regiões consenso de *splicing*, que frequentemente alteram o decurso normal deste processo, o efeito de uma VSD que afecta uma sequência ESE nem sempre é claro (Pettigrew *et al*, 2008). O *ESEfinder* é uma ferramenta informática que permite avaliar se a VSD em causa pode estar

incluída num local ESE e pode comprometer o *splicing* baseando-se na afinidade de SR *proteins* humanas (SF2/ASF, SC35, SRp40 e SRp55) para reconhecerem esse local (Cartegni *et al*, 2003; Pettigrew *et al*, 2005, 2008).

O *PolyPhen* é outra ferramenta informática que prevê o impacto da substituição de um aminoácido na estrutura e função de uma proteína. Este algoritmo classifica o efeito de uma mutação *missense* em três categorias: *probably damaging*, *possibly damaging* e *benign*. Esta classificação baseia-se nas características químicas da substituição, no alinhamento de sequências homólogas e nas características tri-dimensionais da proteína (Ramensky *et al*, 2002).

### **5.3.6. Perda de heterozigotia e características histopatológicas**

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* são considerados genes supressores tumorais clássicos, considerando-se, portanto, a teoria dos dois eventos de Knudson aplicável a estes genes. No entanto, estudos mais recentes revelaram uma elevada heterogeneidade na perda de heterozigotia (*Loss of Heterozigosity* - LOH) em CM de portadores de mutação germinativa, sugerindo que a perda do alelo *wild-type* (*wt*) poderá não constituir um passo fundamental para o desenvolvimento da tumorigénese mamária nestes indivíduos (King *et al*, 2007; Meric-Bernstam, 2007). De referir que grande parte da literatura nesta área refere consistentemente a LOH do alelo *wt* como evento necessário e sugestivo de patogenicidade de uma mutação. Segundo Chenevix-Trench *et al* (2006), este enviesamento deve-se ao facto de a grande maioria dos dados publicados serem referentes a mutações truncantes. Por outro lado, as mutações *missense* patogénicas podem actuar como mutações dominantes-negativas, sendo a perda do alelo *wt* menos comum nesta situação. Portanto, quer a co-existência dos dois alelos, quer a perda do alelo *wt* são consistentes com a patogenicidade. A perda do alelo mutado considera-se um evento menos consistente com a patogenicidade de uma mutação (Chenevix-Trench *et al*, 2006; Domchek e Weber, 2008).

É também importante avaliar as características histopatológicas dos tumores de portadores de uma VSD, no sentido de analisar o grau de semelhança com o fenótipo "*BRCA1-like*" no caso de se tratar de uma VSD no gene *BRCA1* (Domchek e Weber, 2008). No que respeita aos tumores *BRCA2*, esta análise não é tão informativa devido à sua maior semelhança com os tumores esporádicos.

## **OBJECTIVOS**



O presente trabalho tem como objectivos:

1. Investigar o significado de VSD dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, identificadas em famílias Portuguesas.
2. Demonstrar a importância dos diversos parâmetros de avaliação de patogenicidade, nomeadamente os estudos ao nível do processamento de mRNA dos genes *BRCA1* e *BRCA2*.
3. Proporcionar o diagnóstico pré-sintomático aos elementos em risco das famílias portadoras de mutação patogénica, permitindo a adopção das medidas de vigilância e profilaxia adequadas aos portadores e reduzir a ansiedade dos não portadores da mutação da família.



## **MATERIAL E MÉTODOS**



## 1. Material biológico

No presente trabalho foram estudadas 18 famílias portadoras de 11 VSD no gene *BRCA1* e 16 famílias portadoras de 14 VSD no gene *BRCA2* (a família 25 é portadora de uma VSD em cada gene). A identificação destas VSD resultou da pesquisa de mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, realizada no Serviço de Genética do IPO-Porto, nas famílias com critérios para estudo genético seleccionadas previamente em consulta de aconselhamento genético.

Das 25 VSD estudadas, seis não estavam descritas na literatura e dez não tinham patogenicidade avaliada. As restantes nove variantes, apesar de já terem sido classificadas na literatura, foram analisadas para confirmar a respectiva classificação com os dados obtidos a partir das nossas famílias. Para a variante *BRCA1* c.4484G>T apenas havia sido descrito na literatura o efeito ao nível do processamento de mRNA *in vitro* e não existiam dados de co-segregação da variante com a doença. No que respeita à variante *BRCA1* c.211A>G e dado que identificamos três famílias portadoras, tornou-se relevante confirmar a patogenicidade atribuída na literatura.

As VSD do gene *BRCA1* estudadas apresentam-se na Tabela 2 e as VSD do gene *BRCA2* na Tabela 3, estando representada a nomenclatura segundo a *Human Genome Variation Society* (HGVS) e a designação do efeito previsto ao nível da proteína. A história familiar foi classificada segundo cinco categorias, de acordo com os critérios publicados em Peixoto *et al* (2006):

- $\geq 2$ CM - 2 ou mais casos de CM na família (pelo menos 1 antes dos 50 anos);
- CM+CO - CM e CO na família;
- CMH - CM no homem com história familiar de CM/CO;
- CMB - CM bilateral (pelo menos 1 diagnosticado antes dos 50 anos);
- 1CM - CM em idade precoce (antes dos 35 anos).

Apresenta-se também nas Tabelas 2 e 3 a probabilidade da família ter mutação patogénica no gene *BRCA1* ou *BRCA2* estimado através do programa BRCAPRO, a descrição da VSD na literatura e o significado atribuído pelos autores que a descreveram.

**Tabela 2:** Dados referentes às 11 VSD do gene *BRCA1* identificadas em 18 casos índice suspeitos de predisposição hereditária para CM e/ou CO.

Caso índice	Variante (HGVS) <sup>a</sup>	Efeito na proteína <sup>b</sup>	História familiar	BRCAPRO	Significado	Descrição na literatura
22 <sup>c</sup>	c.211A>G	p.Arg71Gly	CM+CO	0,16	Pat	Vega <i>et al</i> (2001)
7			≥2CM	0,20		
12			≥2CM	0,99		
11	c.591C>T	p.Cys197Cys	2CMB	0,94	Poli	Díez <i>et al</i> (2003)
20			≥2CM	0,44		
30			2CMB	0,78		
32	c.1486C>T	p.Arg496Cys	≥2CM	0,32	SD	Meindl (2002)
1	c.2428A>T	p.Asn810Tyr	CM +CO	0,04	SD	Peixoto <i>et al</i> (2006)
6	c.2883C>T	p.Asn961Asn	≥2CM	0,15	ND	Não descrita
9	c.3600G>T	p.Gln1200His	≥2CM	0,33	PN	Anczukow <i>et al</i> (2008)
10			≥2CM	0,36		
4	c.4039A>G	p.Arg1347Gly	≥2CM	0,06	SD; PN	Deffenbaugh <i>et al</i> (2002) Peixoto <i>et al</i> (2006) Tavtigian <i>et al</i> (2006) van der Hout <i>et al</i> (2006) Osorio <i>et al</i> (2007)
8			CMH	0,94		
16			≥2CM	0,98		
25 <sup>d</sup>			≥2CM	0,36		
13	c.4132G>A	p.Val1378Ile	≥2CM	0,05	SD	Peixoto <i>et al</i> (2006)
24	c.4484G>T	p.Arg1495Met	≥2CM	0,52	Pat	Easton <i>et al</i> (2007) Yang <i>et al</i> (2003)
22 <sup>c</sup>	c.4941C>T	p.Asn1647Asn	CM+CO	0,16	ND	Não descrita
3	c.5122G>C	p.Ala1708Pro	CM+CO	0,91	SD	Peixoto <i>et al</i> (2006)

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, *BRCA1*: GenBank U14680.1, com a numeração a começar no A do primeiro ATG. <sup>b</sup>Efeito previsto ao nível da proteína. <sup>c</sup>Caso índice portador de duas VSD. <sup>d</sup>Caso índice portador de uma VSD no gene *BRCA1* e outra no gene *BRCA2*; PN - potencialmente neutra; SD - significado desconhecido; ND - não descrita; Pat - patogénica; Poli - polimorfismo.

**Tabela 3:** Dados referentes às 14 VSD do gene *BRCA2* identificadas em 16 casos índice suspeitos de predisposição hereditária para CM e/ou CO.

Caso índice	Variante (HGVS) <sup>a</sup>	Efeito na proteína <sup>b</sup>	História familiar	BRCAPRO	Significado	Descrição na literatura
21	c.2T>G	p.Met1Arg	≥2CM	0,27	SD	BIC
26	c.68-7T>A	N Cod	1CMB	0,32	SD	Santarosa <i>et al</i> (1999) Milner <i>et al</i> (1999, 2000)
25 <sup>e</sup>			≥2CM	0,36		
23	c.632-2A>C	N Cod	≥2CM	0,88	ND	Não descrita
29	c.2803G>A	p.Asp935Asn	≥2CM	0,32	SD; PN	van der Hout <i>et al</i> (2006) Spurdle <i>et al</i> (2008)
31			≥2CM	0,61		
28 <sup>d</sup>	c.2817C>T	p.Thr940Thr	1CMB	0,25	ND	Não descrita
27	c.4271C>G	p.Ser1424Cys	≥2CM	0,78	SD	BIC
18 <sup>c</sup>	c.4563G>A	p.Leu1521Leu	≥2CM	0,11	Poli	Wagner <i>et al</i> (1999) Giannini <i>et al</i> (2006)
15	c.4670C>G	p.Thr1557Ser	CM+CO	0,99	SD	BIC
17			≥2CM	0,03		
19	c.6347A>G	p.His2116Arg	≥2CM	0,58	SD	BIC
5			≥2CM	NC		
14			≥2CM	0,94		
18 <sup>c</sup>	c.6513C>G	p.Val2171Val	≥2CM	0,11	Poli	Wagner <i>et al</i> (1999) Giannini <i>et al</i> (2006)
2	c.7994A>G	p.Asp2665Gly	≥2CM	0,11	SD; PN	Chenevix-Trench <i>et al</i> (2006) Peixoto <i>et al</i> (2006)
28 <sup>d</sup>	c.8488-1G>A	N Cod	1CMB	0,25	ND	Não descrita
33	c.8954-5A>G	N Cod	≥2CM	0,52	ND	Não descrita
28 <sup>d</sup>	c.9586A>G	p.Lys3196Glu	1CMB	0,25	SD	BIC

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, *BRCA2*: *GenBank* U43746.1, com a numeração a começar no A do primeiro ATG. <sup>b</sup>Efeito previsto ao nível da proteína. NC - BRCAPRO não calculado por falta de dados completos da história familiar. N Cod - Não codificante. <sup>c</sup>Caso índice portador de duas mutações. <sup>d</sup>Caso índice portador de três mutações. <sup>e</sup>Caso índice portador de uma VSD no gene *BRCA1* e outra no gene *BRCA2*; PN - potencialmente neutra; SD - significado desconhecido; ND - não descrita; Pat - patogénica; Poli - polimorfismo; BIC - *Breast Cancer Information Core Database*.

Como controlos, foram analisadas amostras de DNA extraído de sangue periférico de 186 indivíduos saudáveis (dadores de sangue), dos quais 5,9% eram do sexo feminino e 94,1% do sexo masculino, com uma idade média de 46,6 anos e 52,2 anos, respectivamente.

## **2. Métodos**

### **2.1. Extracção de ácidos nucleicos**

#### **2.1.1. Extracção de DNA de sangue periférico**

As amostras de sangue periférico foram colhidas em tubos esterilizados, contendo o anticoagulante EDTA.

O isolamento do DNA genómico a partir de células nucleadas foi realizado recorrendo ao *kit QiAmp® DNA Blood Maxi Kit* (Qiagen) segundo as normas do fabricante.

#### **2.1.2. Extracção de DNA de tecido incluído em parafina**

Sempre que possível, efectuou-se extracção de DNA de cortes de blocos de parafina incluindo exclusivamente tecido tumoral ou tecido normal para evitar a contaminação que possa estar inerente à macrodissecção. Quando não foi possível efectuar cortes independentes, realizou-se macrodissecção das áreas de tumor e tecido normal. A extracção de DNA foi efectuada segundo um método adaptado de Lungu *et al* (1992). A qualidade do DNA extraído foi avaliada através de electroforese em gel de agarose 0,8% (p/v), corado com solução de brometo de etídeo 5µg/µL.

#### **2.1.3. Extracção de RNA de sangue periférico**

Para efectuar a extracção de RNA, efectuou-se primeiro a lise dos eritrócitos com uma solução hipotónica (AKE: NH<sub>4</sub>Cl 155 mM; KHCO<sub>3</sub> 10 mM; EDTA 0,1 mM; pH=7,4). Após a incubação a 4°C e duas centrifugações, obteve-se um sedimento (*pellet*) de células nucleadas. A extracção foi efectuada com solução monofásica de fenol e guanidina tiocianato (Tripure<sup>TM</sup> - Roche) segundo as normas do fabricante.

## 2.2. Reacção em cadeia da polimerase (PCR)

Para as reacções de PCR utilizaram-se os *primers* (oligonucleótidos iniciadores de síntese) e as condições de PCR descritos por van der Hout *et al* (2006). Efectuaram-se electroforeses em gel de agarose a 2% (p/v) corado com brometo de etídeo de todos os produtos amplificados. Posteriormente, procedeu-se à análise dos mesmos por DGGE e/ou sequenciação.

## 2.3. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

O método de *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) foi usado para os estudos de segregação, co-ocorrência e pesquisa das VSD em controlos normais. O protocolo, assim como as condições utilizadas, foram as descritas por van der Hout *et al* (2006).

Na pesquisa de VSD em controlos normais, as amostras cujo padrão diferia do normal (independentemente de terem ou não padrão de migração semelhante ao controlo positivo) foram sequenciadas.

## 2.4. Sequenciação

Para proceder à sequenciação de produtos de PCR ou de bandas excisadas de gel de agarose, efectuou-se a purificação dos mesmos através do *kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham Pharmacia Biotech). Os produtos de PCR ou as bandas excisadas de gel foram purificados segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. Para avaliar a qualidade e quantidade dos produtos purificados, submeteram-se os produtos a electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) corado com brometo de etídeo.

A sequenciação foi realizada em sequenciador automático *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser*, segundo o método de Sanger (Sanger *et al*, 1977). Na reacção de sequenciação usaram-se 30 a 90 ng de DNA purificado com 4µL de *Terminator Ready Reaction Mix* (Applied Biosystems), 0,7µL de *primer* e água bidestilada (Braun) até perfazer o volume de 20µL. Esta reacção, realizada num termociclador, consistiu numa desnaturação inicial a 96°C durante 5 minutos (min), seguido de 35 ciclos de desnaturação a 96°C durante 10 segundos (s), *annealing* a 52°C durante 5s e extensão a 60°C durante 4min.

Os produtos de sequenciação foram precipitados e purificados com acetato de

sódio e etanol (Merck) de acordo com protocolos convencionais. De seguida as amostras foram analisadas num sequenciador automático *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser*.

## 2.5. Algoritmos informáticos

Foram utilizados três algoritmos informáticos acedendo aos respectivos endereços electrónicos:

- *ESEfinder* versão 2.0 - <http://exon.cshl.edu/ESE/>
- *PolyPhen* - <http://coot.embl.de/PolyPhen>
- *SpliceSiteFinder* versão 0.5 - <http://violin.genet.sickkids.on.ca/ali-cgi-bin/splicesitefinder.cgi.pl>

Foram calculadas as respectivas eficiências (*scores*) para a sequência normal e para a sequência com a VSD (do gene em causa), utilizando o algoritmo ou algoritmos adequados a cada situação.

## 2.6. Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction (RT-PCR)

As reacções de RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polimerase Chain Reaction*) foram realizadas recorrendo ao *QIAGEN OneStep RT-PCR Kit* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Os primers usados encontram-se na Tabela 4, assim como a temperatura de *annealing* do RT-PCR e o número de repetições correspondentes. As condições de RT-PCR foram 50°C durante 30min, 95 °C durante 15min, Nx ciclos de 94°C for 30s, Ta (°C) durante 1min e 72°C durante 1min, e extensão final de 72°C durante 10min.

**Tabela 4:** *Primers* usados e condições para análise de mRNA por RT-PCR.

Gene	Variante (HGVS) <sup>a</sup>	Sequência dos <i>primers</i> F- <i>forward</i> ; R- <i>reverse</i>	Ta (°C)	Prod. ampl. (bp)	Nº de ciclos (Nx)
BRCA1	c.211A>G	<b>B1Ex3F:</b> GTTGATCAAGGAACCTGTCTC (*) <b>B1Ex6R:</b> ACTCCAAACCTGTGTCAAGCTG (*)	58	214	35
	c.591C>T	<b>B1Ex6F:</b> CTTTTCAGCTTGACACAGTTTGG <b>B1Ex10R:</b> GATTTTCATCCCTGGTTCCTTGAGG	62	374	40
	c.4484G>T	<b>B1Ex13F:</b> GGCTGAACTAGAAGCTGTGTTAGAAC <b>B1Ex16R:</b> TCCATTGCATTATACCCAGCAGTA	57	654	40
BRCA2	c.2T>G	<b>B2Ex1F:</b> GCGCGGTTTTTGTGTCAGCTTA <b>B2Ex3R:</b> ATGGTTTCCTTTGTGGAGTTTTAAA	55	291	40
	c.68-7T>A	<b>B2Ex1F:</b> GCTTACTCCGGCCAAAAAAGA <b>B2Ex6/7R:</b> GGTGTCTGACGACCCTTCACA	55	608	40
	c.632-2A>C	<b>B2Ex7F:</b> TTAGCTACACCACCCACCCTTAGTT <b>B2Ex10R:</b> ATCAGTATCATTTGGTTCCACTTCAGAT	58	501	35
	c.8488-1G>A	<b>B2Ex18F:</b> ACCTCTTGAAGCCCCAGAATC <b>B2Ex21/22R:</b> CTTGCAAAGCACGAACCTTGC	57	401	40
	c.8954-5A>G	<b>B2Ex21F:</b> GTGAAGAATGCAGCAGACCC <b>B2Ex23/24R:</b> GAAACCGGTAGTTGTTGATACTGA	60	401	35

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, *BRCA1*: GenBank U14680.1 e *BRCA2*: GenBank U43746.1 com a numeração a começar no A do primeiro ATG; (\*) *Primers* descritos por Vega *et al* (2001); Ta - Temperatura de *annealing*; Prod. ampl. - produto amplificado.

## 2.7. Análise de fragmentos semi-quantitativa

Para a análise de fragmentos semi-quantitativa, foram realizadas reacções RT-PCR em *multiplex* usando simultaneamente os *primers* de RT-PCR da região alvo do controlo interno beta-2-microglobulina (*B2M*) (Tabela 5).

**Tabela 5:** *Primers* usados para análise de fragmentos semi-quantitativa.

Gene	Variante (HGVS) <sup>a</sup>	Sequência dos <i>primers</i> F- forward; R- reverse	Fluor.	Ta (°C)	Nº de ciclos (Nx)
<i>BRCA1</i>	c.211A>G	<b>B1Ex3F:</b> GTTGATCAAGGAACCTGTCTC <b>B1Ex6R:</b> ACTCCAAACCTGTGTCAAGCTG	TET	58	35
<i>B2M</i>	NA	<b>B<sub>2</sub>MF:</b> CCTCCATGATGCTGCTTACATGTC <b>B<sub>2</sub>MR:</b> ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCT	6-FAM		

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, *BRCA1*: *GenBank* U14680.1 com a numeração a começar no A do primeiro ATG; TET - 4,7,2',7'-tetracloro-6-carboxifluoresceína e 6-FAM - 6-carboxifluoresceína. NA - não aplicável; Fluor. - Fluorocromo; Ta - Temperatura de *annealing*.

A reacção ocorreu sob as condições acima descritas para o RT-PCR. Submeteram-se os produtos amplificados a electroforese em gel de agarose a 2% (p/v) corado com brometo de etídeo. Uma vez verificada a amplificação dos produtos do RT-PCR, colocou-se 24µL de formamida (Merck) e 1µL de *standard* TAMRA (*internal fluorescence size standard* - N,N,N,N'-tetrametil-6-carboxirodamina) (Applied Biosystems), adicionou-se 0,1µL do produto de RT-PCR, homogeneizando-se suavemente. Após desnaturação (95°C, 5min), os produtos de RT-PCR foram sujeitos a análise de fragmentos num sequenciador automático *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser*.

As áreas dos diagramas obtidos por análise de fragmentos foram normalizadas com a área do controlo interno (*B2M*) amplificado em *multiplex*.

A análise estatística dos resultados foi efectuada recorrendo ao programa *SPSS for Windows* (versão 11), considerando-se diferenças significativas quando  $p < 0,05$ .

## 2.8. RT-PCR Quantitativo

O RT-PCR Quantitativo foi realizado utilizando *primers* e sondas TaqMan MGB desenhados com base no programa *Primer Express 2.0* (Applied Biosystems) e adquiridos à Applied Biosystems. A sequência dos *primers* e sondas usadas encontram-se na Tabela 6. Foi usado como gene de referência o gene *c-abl oncogene 1 (ABL1)*, cujos *primers* e sonda se encontram disponíveis comercialmente (Applied Biosystems).

Para a realização da reacção de transcrição reversa, sintetizou-se cDNA com o *kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Cada amostra foi testada em triplicado, foram incluídas vários controlos negativos com água destilada e em cada análise foram incluídas várias diluições em série de forma a construir as respectivas curvas padrão. As reacções ocorreram num aparelho TaqMan® ABI PRISM 7000 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems).

As reacções foram efectuadas em volume final de 25µL, contendo 5µL de cDNA, 12,5µl de *TaqMan Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 0,3µM de cada *primer* e 0,2µM de sonda. As condições de RT-PCR quantitativo foram as seguintes: 2 min a 50°C, 10min a 95°C, seguidos de 50 ciclos de 15s a 95°C e *annealing* a 60°C durante 1min.

Para determinar a expressão relativa dos transcritos alvo utilizou-se o método *Comparative C<sub>T</sub> Method* descrito por Schmittgen e Livak (2008). A análise estatística dos resultados foi efectuada recorrendo ao programa *SPSS for Windows* (versão 11), considerando-se diferenças significativas se  $p < 0,05$ .

**Tabela 6:** *Primers* e sondas usados para RT-PCR quantitativo.

Gene	Variante (HGVS) <sup>a</sup>	Transcrito	Sequência dos <i>primers</i> : F- forward; R- reverse; Sequência das sondas:S
BRCA1	c.211A>G	BRCA1-ex5FL	F: GGGCCTTCACAGTGCCTTTAT
			R: CACAAATGATTTTCAATAGCTCTTCAAC
		BRCA1-Δ22ntex5	S: 5'-FAM-TAAGAATGATATAACCAAA-MGB-3'
			F: ACCAGAAGAAAGGGCCTTCA
		R: CACAAATGATTTTCAATAGCTCTTCAAC	
		S: 5'-FAM-TGTCCTTTATGAGCCTACAA-MGB-3'	

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, BRCA1: *GenBank* U14680.1 com a numeração a começar no A do primeiro ATG.

## 2.9. Perda de heterozigotia e características histopatológicas dos tumores

Foram obtidas amostras de tecido de blocos de parafina dos portadores de VSD tratados no IPO-Porto para estudo de LOH, sendo os dados histopatológicos obtidos a partir do respectivo relatório histológico (Tabelas 7 e 8). De referir que muitos dos doentes ou familiares estudados não tinham sido operados nesta instituição, não tendo sido possível a obtenção de amostra de tumor nestes casos.

Para o estudo de LOH nos portadores de VSD, procedeu-se à extracção de DNA segundo os protocolos acima descritos. A análise da perda de heterozigotia foi efectuada por sequenciação (quando possível também por DGGE) do amplicão que englobasse a VSD.

**Tabela 7:** Dados histopatológicos dos tumores de portadores de VSD no gene *BRCA1*.

Família	Variante (HGVS) <sup>a</sup>	Tipo histológico	Origem	Receptores de estrogénio	Receptores de progesterona
22 (caso índice)	c.211A>G	Carcinoma invasor grau 3, c/ características de medular atípico	Mama esq.	ND	ND
22 (caso índice)	c.211A>G	Carcinoma medular atípico grau 3	Mama dta.	Negativo	Negativo
7 (irmã)	c.211A>G	Carcinoma invasor grau 3, c/ características medulares	Mama esq.	Negativo	Negativo
24 (caso índice)	c.4484G>T	Carcinoma lobular invasor grau 2	Mama dta.	Positivo	Positivo
24 (irmã)	c.4484G>T	Carcinoma ductal invasor grau 3 (dois nódulos independentes)	Mama esq.	Negativo	Negativo

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, *BRCA1*: GenBank U14680.1 com a numeração a começar no A do primeiro ATG; ND: Não disponível.

**Tabela 8:** Dados histopatológicos dos tumores de portadores de VSD no gene *BRCA2*.

Família	Variante (HGVS) <sup>a</sup>	Tipo histológico	Origem	Receptores de estrogênio	Receptores de progesterona
23 (irmã)	c.632-2A>C	Carcinoma invasor multifocal (carcinoma ductal invasor grau 2 e carcinoma mucinoso grau 1)	Mama	Positivo	Positivo
23 (caso índice)	c.632-2A>C	Carcinoma ductal invasor grau 3 com aspectos medulares	Mama esq.	Positivo	Positivo
18 (caso índice)	c.4563G>A	Carcinoma ductal invasor grau 2	Mama	Positivo	Positivo
18 (caso índice)	c.6513C>G	Carcinoma ductal invasor grau 2	Mama	Positivo	Positivo

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, *BRCA2*: GenBank U43746.1 com a numeração a começar no A do primeiro ATG; ND: Não disponível.

Analisaram-se também com a mesma metodologia cinco tumores de portadores de mutações patogênicas do tipo *frameshift* nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, para posterior comparação e validação de resultados (Tabela 9).

**Tabela 9:** Dados histopatológicos dos tumores de portadores de mutações patogênicas do tipo *frameshift* no gene *BRCA1* ou *BRCA2*.

Família	Mutação patogênica (HGVS) <sup>a</sup>	Tipo histológico	Origem	Receptores de estrogênio	Receptores de progesterona
34 (irmã)	<i>BRCA1</i> c.2155delG2155insCC	Carcinoma ductal invasor grau 3	Mama	Negativo	Negativo
34 (caso índice)	<i>BRCA1</i> c.2155delG2155insCC	Carcinoma ductal invasor grau 3	Mama	ND	ND
35 (caso índice)	<i>BRCA1</i> c.2155delG2155insCC	Carcinoma papilar seroso	Ovário	NA	NA
36 (caso índice)	<i>BRCA2</i> c.9097_9098insA	Carcinoma ductal invasor	Mama esq.	ND	ND
37 (caso índice)	<i>BRCA2</i> c.9097_9098insA	Carcinoma ductal invasor grau 3	Mama dta.	ND	ND

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, *BRCA1*: GenBank U14680.1, *BRCA2*: GenBank U43746.1 com a numeração a começar no A do primeiro ATG; NA - Não aplicável; ND - Não disponível.



## **RESULTADOS**



## 1. Estudos de segregação

Nas famílias portadoras de VSD em que existiam familiares vivos afectados com CM e/ou CO, efectuaram-se estudos de segregação da respectiva VSD com a doença. Verificou-se que dez VSD segregavam com a doença na família e oito VSD não segregavam. Os resultados obtidos encontram-se resumidos nas Tabelas 10 e 11.

## 2. Co-ocorrência de VSD com mutações patogénicas

Verificou-se que cinco VSD co-ocorriam com mutação patogénica no mesmo gene e três VSD co-ocorriam com mutação no outro gene (*BRCA1* ou *BRCA2*). Em duas famílias foi possível verificar que as VSD co-ocorriam em *trans* com a mutação patogénica no mesmo gene. Os resultados desta pesquisa encontram-se resumidos nas Tabelas 10 e 11.

## 3. Frequência das VSD em controlos normais

A frequência das VSD na população controlo foi avaliada em cinco VSD que segregaram com a doença na família e nas quais não foi estudado o efeito ao nível de mRNA. Esta pesquisa foi efectuada por DGGE numa população controlo de 186 indivíduos. Os resultados desta pesquisa encontram-se resumidos nas Tabelas 10 e 11.

## RESULTADOS

**Tabela 10:** Resultados dos estudos de segregação, co-ocorrência com mutações patogênicas e frequência na população controle das VSD do gene *BRCA1*.

Caso índice	Variante (HGVS) <sup>a</sup>	Efeito na proteína <sup>b</sup>	Co-segregação da VSD na família	Co-ocorrência com mutação patogênica na família	Frequência da VSD na população controle
7	c.211A>G	p.Arg71Gly	S em irmã CM 49 anos	Não co-ocorre com MP	Não analisada
32	c.1486C>T	p.Arg496Cys	NS em irmã CM 51 anos	Não co-ocorre com MP	Não analisada
1	c.2428A>T	p.Asn810Tyr	NS em prima CM 38 anos	Não co-ocorre com MP	Não analisada
6	c.2883C>T	p.Asn961Asn	NS em prima CM 45 anos	Não co-ocorre com MP	Não analisada
9	c.3600G>T	p.Gln1200His	Não foi possível estudar	Co-ocorre com <i>BRCA1</i> c.2088C>T <sup>1</sup> ( <i>trans?</i> )	Não analisada
8			Não foi possível estudar	Co-ocorre com <i>BRCA2</i> c.156_157insAlu	Não analisada
16	c.4039A>G	p.Arg1347Gly	Não foi possível estudar	Co-ocorre com <i>BRCA2</i> c.156_157insAlu	Não analisada
25			NS em prima CM 42 anos	Não co-ocorre com MP	Não analisada
13	c.4132G>A	p.Val1378Ile	NS em tia CM 40 e prima CM 46 anos	Não co-ocorre com MP	Não analisada
24	c.4484G>T	p.Arg1495Met	S em irmã CM 50 e sobrinha CM 43 anos	Não co-ocorre com MP	Não analisada
22	c.4941C>T	p.Asn1647Asn	Não foi possível estudar	Co-ocorre com <i>BRCA1</i> c.211A>G <sup>2</sup> ( <i>trans</i> )	Não analisada
3	c.5122G>C	p.Ala1708Pro	S na mãe CMB 37 e 39 anos	Não co-ocorre com MP	0/186

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, *BRCA1*: GenBank U14680.1, com a numeração a começar no A do primeiro ATG; <sup>b</sup>Efeito previsto ao nível da proteína; S - segrega; NS - não segrega; CM - Cancro da mama; CMB - Cancro da mama bilateral; MP - Mutação patogênica; <sup>1</sup>Mutação *nonsense*; <sup>2</sup>Mutação *missense*, cuja patogenicidade é esclarecida no presente trabalho.

**Tabela 11:** Resultados dos estudos de segregação, co-ocorrência com mutações patogênicas e frequência na população controle das VSD do gene *BRCA2*.

Caso índice	Variante (HGVS) <sup>a</sup>	Efeito na proteína <sup>b</sup>	Co-segregação da VSD na família	Co-ocorrência com mutação patogênica na família	Frequência da VSD na população controle
21	c.2T>G	p.Met1Arg	S em sobrinha CM 38 anos	Não co-ocorre com MP	Não analisada
23	c.632-2A>C	N Cod	S em irmã CM 45 anos	Não co-ocorre com MP	Não analisada
29	c.2803G>A	p.Asp935Asn	S na mãe CM 80 anos	Não co-ocorre com MP	2/186
31			Não foi possível estudar	Não co-ocorre com MP	
28 <sup>c</sup>	c.2817C>T	p.Thr940Thr	Não foi possível estudar	Co-ocorre com <i>BRCA2</i> c.8488-1G>A ( <i>trans?</i> )	Não analisada
27	c.4271C>G	p.Ser1424Cys	NS em prima CO 38 anos	Co-ocorre com <i>BRCA1</i> c.3817C>T <sup>1</sup>	Não analisada
18 <sup>d</sup>	c.4563G>A	p.Leu1521Leu	S na mãe CM 54 anos	Não co-ocorre com MP	0/186
15	c.4670C>G	p.Thr1557Ser	NS em prima CMB 47 e 50 anos	Co-ocorre com <i>BRCA2</i> c.156_157insAlu ( <i>trans</i> )	Não analisada
19			NS em prima CM 33 anos	Não co-ocorre com MP	
14	c.6347A>G	p.His2116Arg	NS em irmã CM 39 anos	Co-ocorre com <i>BRCA1</i> c.2156delinsCC	Não analisada
5			Não foi possível estudar	Co-ocorre com <i>BRCA1</i> c.2156delinsCC	

## RESULTADOS

Caso índice	Variante (HGVS) <sup>a</sup>	Efeito na proteína <sup>b</sup>	Co-segregação da VSD na família	Co-ocorrência com mutação patogénica na família	Frequência da VSD na população controle
18 <sup>d</sup>	c.6513C>G	p.Val2171Val	S na mãe CM 54 anos	Não co-ocorre com MP	0/186
2	c.7994A>G	p.Asp2665Gly	S em irmã CM 60 anos	Não co-ocorre com MP	0/186
28 <sup>c</sup>	c.9586A>G	p.Lys3196Glu	Não foi possível estudar	Co-ocorre com <i>BRCA2</i> c.8488-1G>A ( <i>trans?</i> )	Não analisada
33	c.8954-5A>G	N Cod	S em irmã CMB 52 e 56 anos	Não co-ocorre com MP	Não analisada

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, *BRCA2*: *GenBank* U43746.1, com a numeração a começar no A do primeiro ATG; <sup>b</sup>Efeito previsto ao nível da proteína; <sup>c</sup>, <sup>d</sup>Casos índice portadores de duas VSD; S - segrega; NS - não segrega; CM - Cancro da mama; CMB - Cancro da mama bilateral; CO - Cancro do ovário; MP - Mutação patogénica; <sup>1</sup>Mutação *nonsense*; N Cod - Não codificante.

#### 4. Algoritmos informáticos: *ESEfinder*, *Polyphen* e *SpliceSiteFinder*

No caso das VSD do tipo exónico (*missense*) que não afectam regiões consenso de *splicing* (exão-intrão) foram aplicados os algoritmos *ESEfinder* e *Polyphen*. No caso das VSD silenciosas foi apenas usado o *ESEfinder* (Tabelas 12 e 13). Para as VSD que afectam regiões consenso de *splicing* ou regiões intrónicas foi usado o *SpliceSiteFinder* (Tabelas 14 e 15).

**Tabela 12:** Resultados da previsão dos algoritmos informáticos *ESEfinder* e *Polyphen* para as VSD do gene *BRCA1*.

Caso índice	Variante (HGVS) <sup>a</sup>	Efeito na proteína <sup>b</sup>	<i>ESEfinder</i>	<i>Polyphen</i>
11; 20; 30	c.591C>T	p.Cys197Cys	não altera ESEs	NA
32	c.1486C>T	p.Arg496Cys	diminui 1 SRp55	<i>benign</i>
1	c.2428A>T	p.Asn809Tyr	ganha 1 SRp55	<i>probably damaging</i>
6	c.2883C>T	p.Asn961Asn	não altera ESEs	NA
9;10	c.3600G>T	p.Gln1200His	perde 1 SRp40, diminui 1 SF2/ASF e aumenta 1 SC53	<i>benign</i>
4; 8; 16; 25	c.4039A>G	p.Arg1347Gly	diminui 1 SF2/ASF	<i>probably damaging</i>
13	c.4132G>A	p.Val1378Ile	diminui SC35	<i>benign</i>
22	c.4941C>T	p.Asn1647Asn	diminui 1 SC35 e aumenta SRp40	NA
3	c.5122G>C	p.Ala1708Pro	perde 1 SRp55 e aumenta SC35	<i>probably damaging</i>

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, *BRCA1*: *GenBank* U14680.1, com a numeração a começar no A do primeiro ATG; <sup>b</sup>Efeito previsto ao nível da proteína; NA- não aplicável; *SR proteins*: SRp55, SC35, SF2/ASF, SRp40.

## RESULTADOS

**Tabela 13:** Resultados da previsão dos algoritmos informáticos *ESEfinder* e *Polyphen* para as VSD do gene *BRCA2*.

Caso índice	Variante (HGVS) <sup>a</sup>	Efeito na proteína <sup>b</sup>	<i>ESEfinder</i>		<i>Polyphen</i>
			WT	VSD	
21	c.2T>G	p.Met1Arg		perde 1 SRp55	<i>probably damaging</i>
29; 31	c.2803G>A	p.Asp935Asn		não altera ESEs	<i>possibly damaging</i>
28	c.2817C>T	p.Thr940Thr		perde 1 SF2/ASF	NA
27	c.4271C>G	p.Ser1424Cys		diminui 1 SC35	<i>benign</i>
18	c.4563G>A	p.Leu1521Leu		perde 1 SRp40	NA
15; 17	c.4670C>G	p.Thr1557Ser		perde 1 SRp40	<i>benign</i>
5; 14; 19	c.6347A>G	p.His2116Arg		diminui 1SF2/ASF e 1SC35	<i>probably damaging</i>
18	c.6513C>G	p.Val2171Val		perde 1 SF2/ASF e ganha SRp55	NA
2	c.7994A>G	p.Asp2665Gly		perde 1 SRp40	<i>probably damaging</i>
28	c.9586A>G	p.Lys3196Glu		ganha 1SF2/ASF	<i>benign</i>

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, *BRCA2*: *GenBank* U43746.1, com a numeração a começar no A do primeiro ATG; <sup>b</sup>Efeito previsto ao nível da proteína; NA- não aplicável; *SR proteins*: SRp55, SC35, SF2/ASF, SRp40.

**Tabela 14:** Resultados das eficiências (*scores*) dos *splice sites* previstas pelo algoritmo informático *SpliceSiteFinder* para as VSD do gene *BRCA1*.

Caso índice	Variante (HGVS) <sup>a</sup>	Efeito na proteína <sup>b</sup>	<i>SpliceSiteFinder</i>		Eficiência ( <i>score</i> )	
			WT	VSD	WT	VSD
7; 12; 22	c.211A>G	p.Arg71Gly	AG gtatat	GG gtatat	74,3	66,4
11; 20; 30	c.591C>T	p.Cys197Cys	CAG gtgagt	TAG gtgagt	96,7	96,7
24	c.4484G>T	p.Arg1495Met	AG gtaaga	AT gtaaga	94,4	81,6

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, *BRCA1*: *GenBank* U14680.1, com a numeração a começar no A do primeiro ATG; <sup>b</sup>Efeito previsto ao nível da proteína.

**Tabela 15:** Resultados das eficiências (scores) dos *splice sites* previstas pelo algoritmo informático *SpliceSiteFinder* para as VSD do gene *BRCA2*.

Caso índice	Variante (HGVS) <sup>a</sup>	Efeito na proteína <sup>b</sup>	<i>SpliceSiteFinder</i>		Eficiência (score)	
			WT	VSD	WT	VSD
26; 25	c.68-7T>A	N Cod	ttaaataag A	taaaataag A	86,7	81,6
23	c.632-2A>C	N Cod	ttttgcag A	ttttgccg A	89,0	0
28	c.8488-1G>A	N Cod	tattacag T	tattacaa T	76,6	0
33	c.8954-5A>G	N Cod	caaacag T	cagacag T	88,1	88,1
			-----	tctccag A	0	91,5

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, *BRCA2*: *GenBank* U43746.1, com a numeração a começar no A do primeiro ATG; <sup>b</sup>Efeito previsto ao nível da proteína; N Cod - Não codificante.

## 5. Efeito de VSD ao nível do processamento do mRNA

O efeito das VSD que afectam as regiões consenso (exão-intrão) foi testado ao nível do processamento de mRNA.

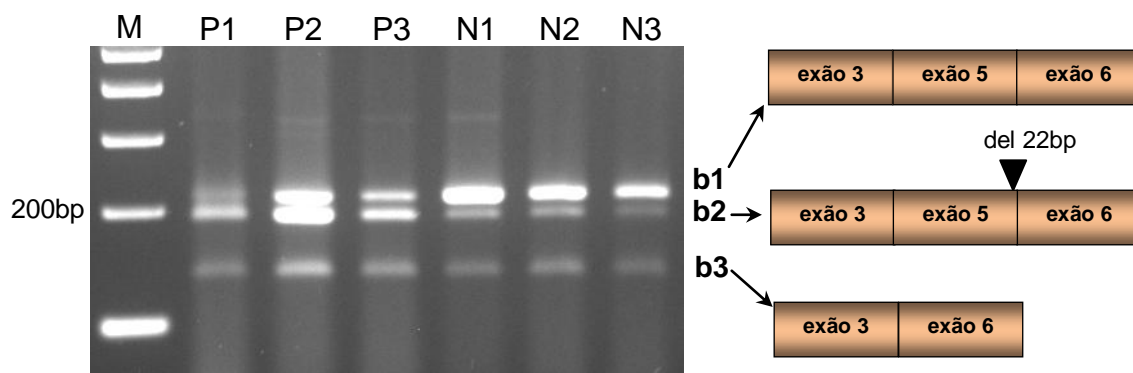
### 5.1. VSD do gene *BRCA1*

#### ➤ c.211A>G

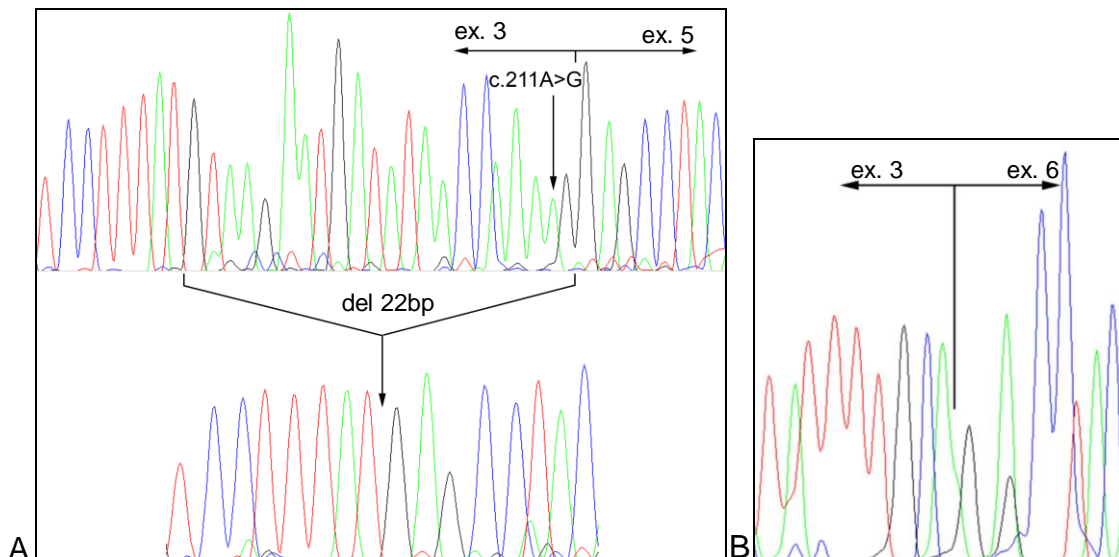
Esta mutação foi identificada em três famílias aparentemente não relacionadas, estudadas no Serviço de Genética do IPO-Porto. Trata-se de uma mutação localizada na penúltima base do exão 5 do gene *BRCA1*, que havia sido descrita por Vega *et al* (2001) como tratando-se de uma mutação patogénica fundadora da Galiza (Espanha). Deste modo, tornou-se relevante quantificar o efeito deletério da referida alteração a nível do RNA e verificar se havia partilha de um ancestral comum entre as famílias portuguesas e espanholas (Santos *et al*, enviado para publicação).

Realizou-se inicialmente RT-PCR com *primers* que amplificam do exão 3 ao exão 6 e obtiveram-se os resultados ilustrados na Figura 11. Após sequenciação das bandas excisadas do gel de agarose, obteve-se a sequência dos referidos produtos:

- **b1:** transcrito com a sequência íntegra entre os exões 3 a 6 quer nos indivíduos normais quer nos portadores de c.211A>G, sendo que estes últimos apresentam apenas alelo normal a codificar o transcrito “normal” (Figura 12A).
- **b2:** transcrito com deleção *out of frame* de 22bp a 3’ do exão 5 (r.191\_212del ou p.Cys64X) que está presente nos indivíduos normais e nos portadores de c.211A>G, (Figura 12A).
- **b3:** transcrito com deleção *in frame* do exão 5 (r.135\_212del ou p.Phe46\_Arg71del) presente nos indivíduos normais e nos portadores de c.211A>G (Figura 12B).



**Figura 11:** Padrão electroforético dos produtos de RT-PCR obtidos para três indivíduos portadores da VSD c.211A>G (P1, P2 e P3) e três controles normais (N1, N2 e N3), sendo M o marcador de pesos moleculares. À direita apresenta-se de forma esquemática a sequência correspondente às bandas obtidas no gel de agarose. De referir que o gene *BRCA1* não apresenta exão 4 porque quando foi clonado designou-se erradamente como exão 4 uma inserção Alu.



**Figura 12:** Electroforogramas dos produtos de RT-PCR obtidos para a VSD c.211A>G. A - sequenciação da banda b1 de um portador de c.211A>G (em cima), estando assinalado o local da mutação que apresenta apenas o alelo normal. Em baixo está representada a sequenciação da banda b2 (igual nos indivíduos normais e nos portadores da VSD); B - sequenciação da banda b3 (igual nos indivíduos normais e nos portadores da VSD).

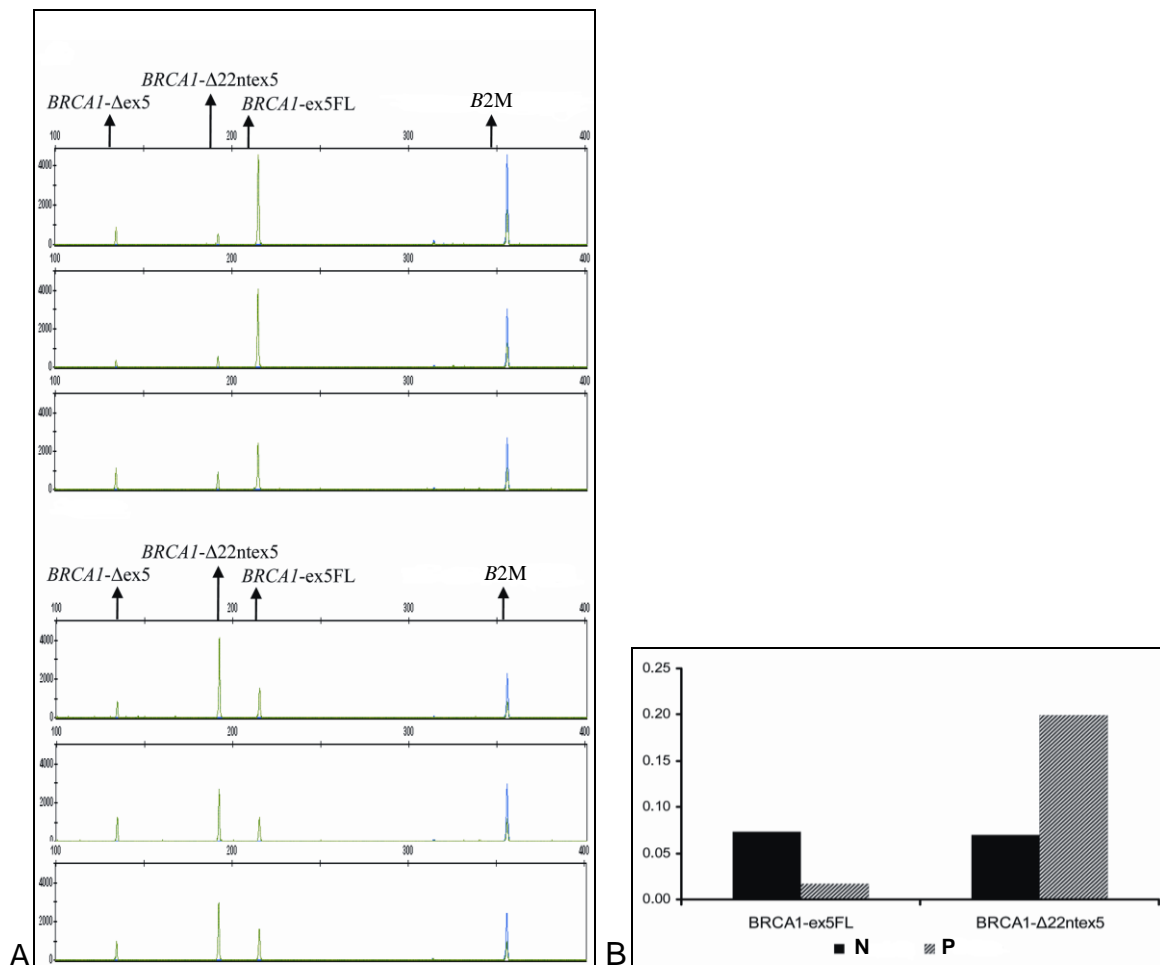
Para confirmar as diferenças de quantidade de transcritos observadas na electroforese dos produtos de RT-PCR entre os indivíduos portadores de c.211A>G e os indivíduos normais, realizaram-se duas abordagens de quantificação dos referidos transcritos:

#### ✓ Análise de fragmentos semi-quantitativa

Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na Figura 13A. Verificou-se que o transcrito “normal” (designado *BRCA1*-ex5FL) apresentava uma expressão média relativa de 0,79 e 0,28 nos indivíduos normais e nos portadores de c.211A>G, respectivamente ( $p=0,046$ ). O transcrito com deleção de 22bp a jusante do exão 5 (*BRCA1*- $\Delta$ 22ntex5) representava 0,10 e 0,52 da expressão total do gene *BRCA1* em controlos e portadores da mutação, respectivamente ( $p=0,046$ ). O transcrito com deleção do exão 5 (*BRCA1*- $\Delta$ ex5) representava 0,11 nos controlos e 0,20 nos portadores de mutação, não sendo a diferença estatisticamente significativa.

✓ RT-PCR Quantitativo

Utilizou-se RT-PCR quantitativo para confirmar por uma técnica independente as diferenças observadas para os transcritos *BRCA1*-ex5FL e *BRCA1*- $\Delta$ 22ntex5 entre os portadores de mutação e os controlos normais. Verificou-se que a expressão relativa do transcrito *BRCA1*-ex5FL era cinco vezes inferior nos portadores relativamente aos normais, enquanto que o transcrito *BRCA1*- $\Delta$ 22ntex5 apresentava uma expressão três vezes superior nos portadores da mutação relativamente aos normais (Figura 13B). Esta diferença é estatisticamente significativa ( $p=0,014$ ).



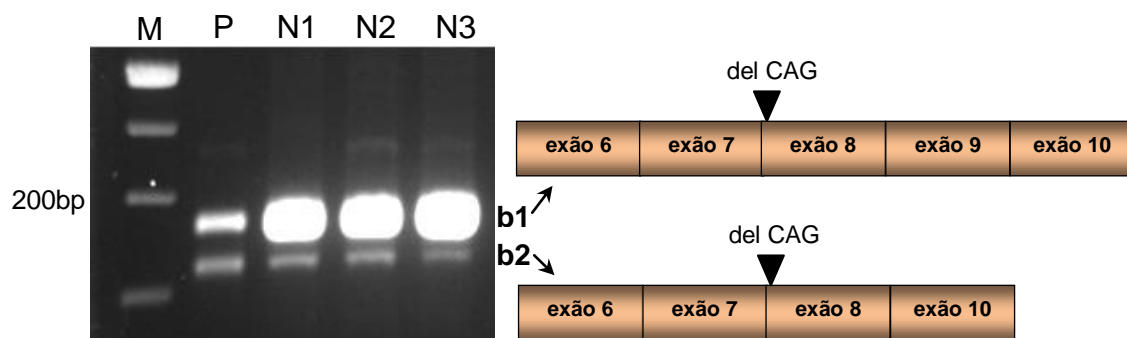
**Figura 13:** A - Análise de fragmentos semi-quantitativa dos produtos de RT-PCR do exão 3-6, demonstrando a expressão relativa de cada transcrito e do controlo interno (*B2M*) em controlos normais (em cima) e em portadores de c.211A>G (em baixo). B - Expressão relativa dos transcritos (*BRCA1*-ex5FL e *BRCA1*- $\Delta$ 22ntex5) por RT-PCR quantitativo em controlos normais (N) e em portadores de c.211A>G (P). Ambos os métodos demonstram um aumento da expressão de *BRCA1*- $\Delta$ 22ntex5 e uma diminuição de *BRCA1*-ex5FL nos portadores de c.211A>G comparativamente aos controlos normais.

### ➤ c.591C>T

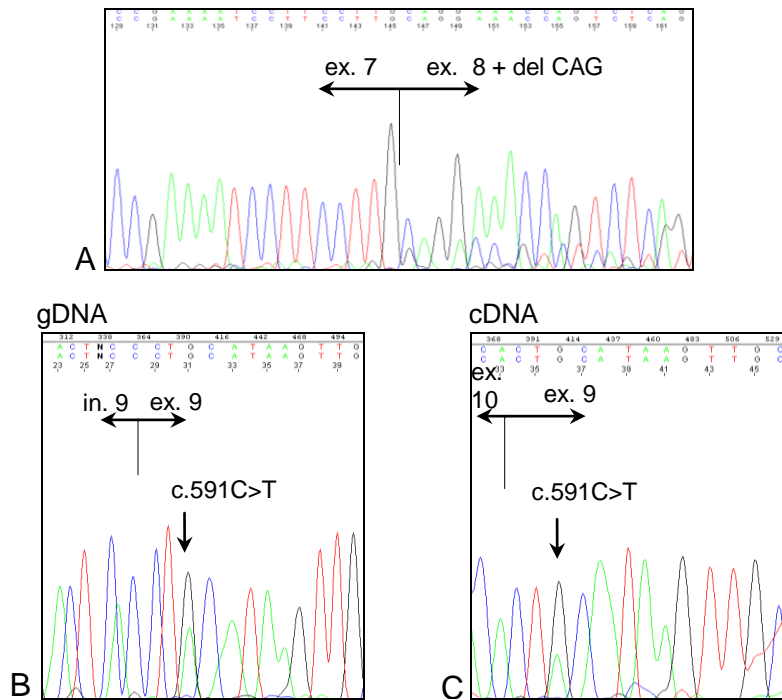
A VSD c.591C>T localiza-se na antepenúltima base do exão 9 e foi estudada por RT-PCR usando *primers* que amplificam os exões 6 a 10. Da análise por RT-PCR de um portador da VSD c.591C>T e de controlos normais, obtiveram-se duas bandas em ambos. Após a excisão e sequenciação das referidas bandas (b1 e b2 na Figura 14) obteve-se:

- **b1:** banda de maior peso molecular correspondendo ao transcrito do exão 6-10 íntegro e também a um transcrito com deleção dos três primeiros nucleótidos do exão 8 (CAG) (r.442\_444del ou p.Gln148del) com manutenção da grelha de leitura (*in frame*).
- **b2:** banda de menor peso molecular correspondendo a um transcrito com deleção do exão 9 (r.548\_593del) e alteração da grelha de leitura (*out of frame*) com formação de um codão de terminação prematuro na posição 36 (p.Gly183ValfsX36). Identificou-se também a deleção referida para b1 (r.442\_444del).

De referir também que, como esta se trata de uma mutação exónica (localizada a -3 no exão 9), foi possível verificar a presença dos dois alelos, ao nível de cDNA, no local da mutação no transcrito “normal” (Figura 15C).



**Figura 14:** Padrão electroforético dos produtos de RT-PCR obtidos para um indivíduo portador da VSD c.591C>T (P) e três controlos normais (N1, N2 e N3), sendo M o marcador de peso molecular. À direita apresenta-se de forma esquemática a sequência correspondente às bandas obtidas no gel de agarose.



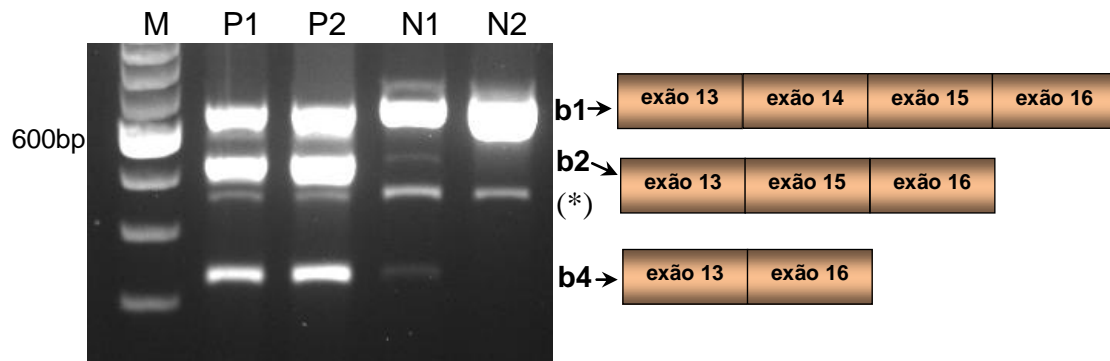
**Figura 15:** A - Electroforograma da banda b1 (comum aos portadores da VSD e ao indivíduos normais) obtida por RT-PCR para a VSD c.591C>T; B - electroforograma do DNA genómico de c.591C>T onde está assinalado o local da mutação (G>A na cadeia *reverse*); C - electroforograma do DNA codificante de c.591C>T onde está assinalado o local da mutação (G>A na cadeia *reverse*).

➤ **c.4484G>T**

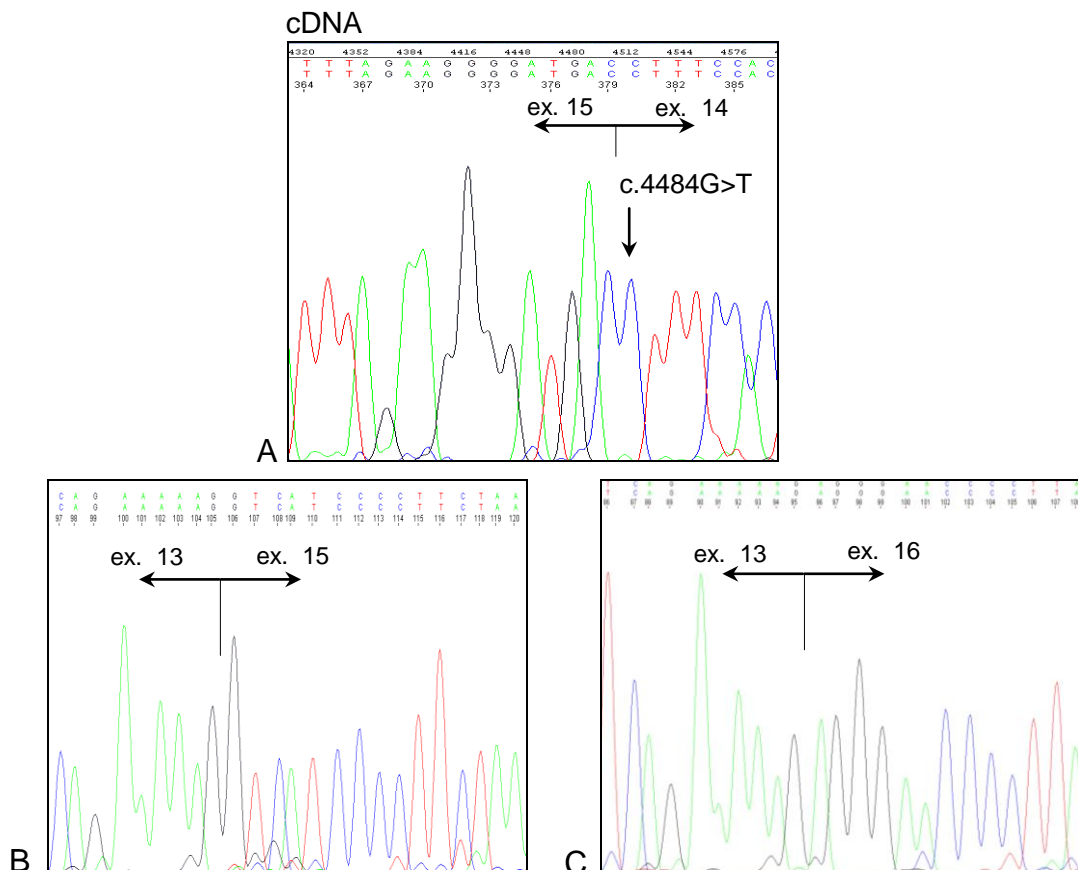
Para o estudo do efeito ao nível de RNA da mutação c.4484G>T (localizada na última base do exão 14) utilizaram-se *primers* do exão 13-16 do gene *BRCA1* e estudaram-se dois indivíduos portadores da referida alteração (o caso índice e uma irmã afectada na qual a VSD segregava) e cinco controlos normais. Da análise de RT-PCR obtiveram-se os transcritos ilustrados no gel de agarose (Figura 16), a saber:

- **b1:** banda de maior peso molecular correspondendo ao transcrito que engloba a sequência íntegra dos exões 13 a 16. De referir que no local da mutação (última base do exão 14), apenas se observa o alelo normal (eletroforograma da sequenciação em *reverse* assinalado com uma seta na Figura 17A).
- **b2:** transcrito correspondendo à deleção do exão 14 *out of frame* (r.4358\_4484del) com formação de um codão de terminação prematuro na posição 10 (p.Ala1453GlyfsX10) (Figura 17B).
- **(\*):** não foi possível caracterizar este transcrito.

- **b4:** este transcrito corresponde à deleção *in frame* dos exões 14 e 15 (r.4358\_4675del ou p.Ala1453\_Leu1558del) (Figura 17C).



**Figura 16:** Padrão electroforético dos produtos de RT-PCR obtidos para 2 indivíduos portadores da VSD c.4484G>T (P1 e P2) e dois controlos normais (N1 e N2), sendo M o marcador de pesos moleculares. À direita apresenta-se de forma esquemática a sequência correspondente às bandas obtidas no gel de agarose.

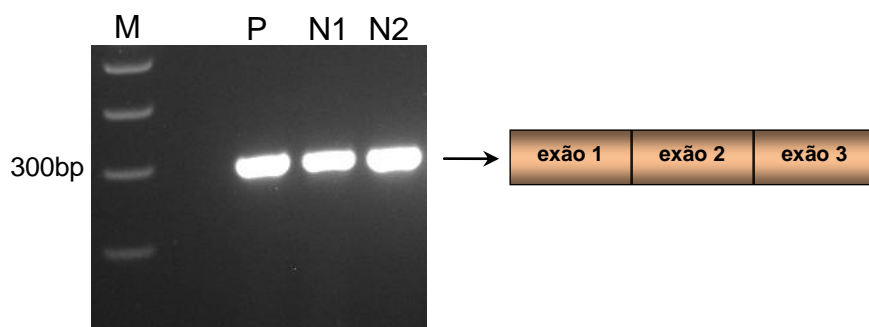


**Figura 17:** Electroforogramas dos produtos de RT-PCR obtidos para a VSD c.4484G>T. A - sequenciação da banda b1 de um portador da VSD onde se observa apenas o alelo normal (C na cadeia *reverse*, assinalado com uma seta); B - sequenciação da banda b2 onde se observa a deleção do exão 14; C - sequenciação da banda b4 revelando a deleção dos exões 14 e 15.

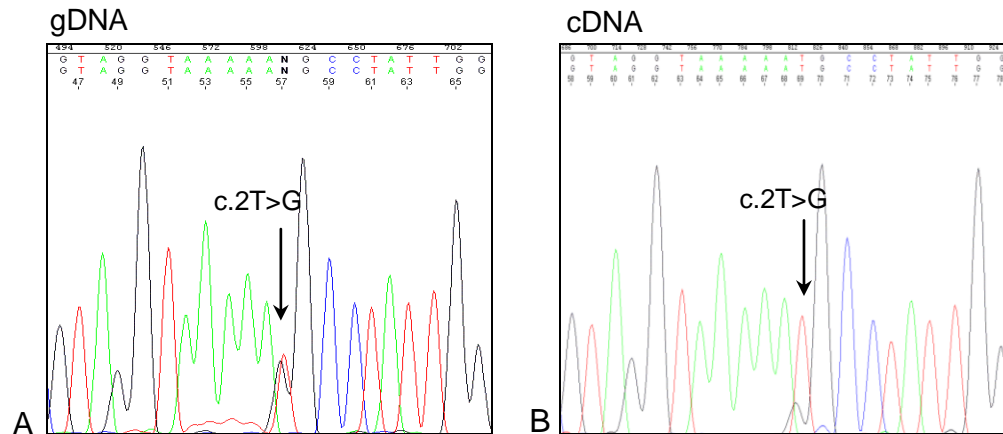
## 5.2. VSD do gene *BRCA2*

### ➤ c.2T>G

A VSD c.2T>G afecta o codão de iniciação do gene *BRCA2*, consistindo na troca da metionina iniciadora por uma arginina. Dada a localização da mutação, e mesmo não se tratando de uma mutação de *splicing*, decidiu-se avaliar se esta produzia algum efeito ao nível do processamento do mRNA e se os dois alelos eram efectivamente transcritos. Com este objectivo realizou-se RT-PCR com primers do exão 1-3 e obteve-se o resultado ilustrado no gel de agarose da Figura 18. Depois de sequenciados os produtos de RT-PCR (Figura 19), verificou-se que tanto os indivíduos normais como o portador de c.2T>G apresentavam a sequência íntegra do exão 1 a 3, verificando-se que o pico do alelo mutado (G) ao nível do cDNA (Figura 19B) se apresenta bastante menor do que ao nível do DNA genómico (gDNA) (Figura 19A).



**Figura 18:** Padrão electroforético dos produtos de RT-PCR obtidos para um indivíduo portador da VSD c.2T>G (P) e dois controlos normais (N1 e N2), sendo M o marcador de pesos moleculares. À direita apresenta-se de forma esquemática a sequência correspondente ao transcrito obtido no gel de agarose.



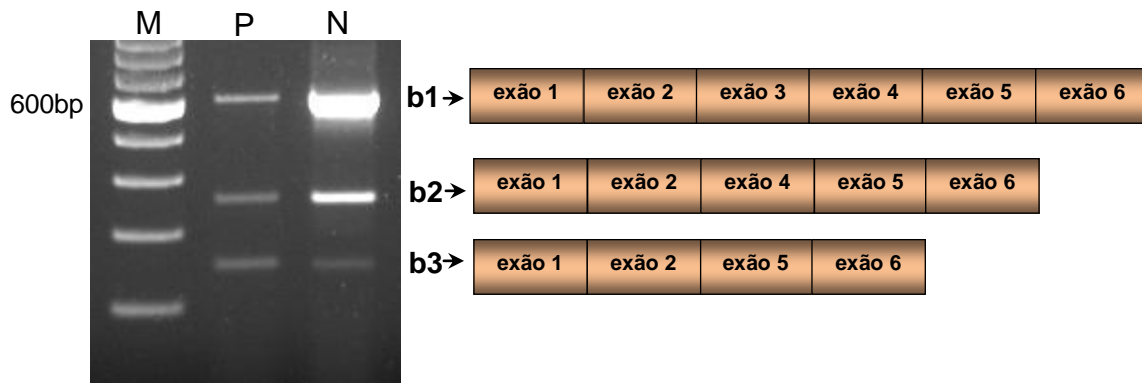
**Figura 19:** A - Electroforograma da VSD c.2T>G onde se encontra assinalado o local da mutação no DNA genómico; B - Electroforograma do produto de RT-PCR obtido para a VSD c.2T>G onde se encontra assinalado o local da mutação no cDNA.

### ➤ c.68-7T>A

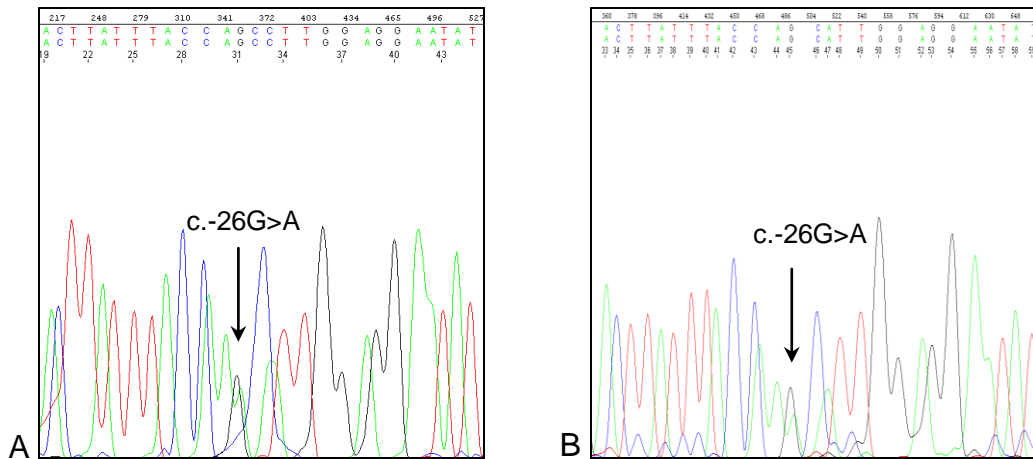
A VSD c.68-7T>A afecta a posição -7 no intrão 2 e foi identificada em duas famílias aparentemente não relacionadas. Foi efectuado RT-PCR com primers do exão 1 ao 6 e obtiveram-se três transcritos (Figura 20) nos indivíduos portadores da VSD e nos controlos normais, cujas sequências se apresentam a seguir:

- **b1:** transcrito “normal” (exão 1-6).
- **b2:** transcrito com deleção *in frame* do exão 3 (r.68\_316del ou p.Asp23\_Leu105del).
- **b3:** transcrito com deleção *out of frame* dos exões 3 e 4 (r.68\_425del), com formação de um codão de terminação prematuro na posição 10 (p.Asp23ValfsX10).

De referir que os transcritos normal (Figura 21A) e com deleção *in frame* do exão 3 (Figura 21B) apresentam heterozigotia do SNP c.-26G>A, revelando que o alelo mutado produz ambos os transcritos.



**Figura 20:** Padrão electroforético dos produtos de RT-PCR obtidos para um indivíduo portador da VSD c.68-7T>A (P) e um controlo normal (N), sendo M o marcador de pesos moleculares. À direita apresenta-se de forma esquemática a sequência correspondente aos transcritos obtidos no gel de agarose.

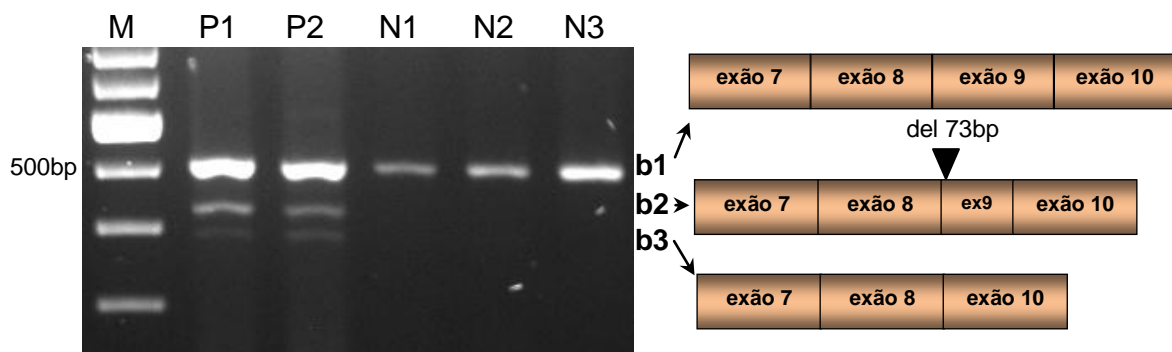


**Figura 21:** Electroforogramas dos transcritos “normal” (A) e com deleção do exão 3 (B) obtidos para a VSD c.68-7T>A. Ambos os transcritos são produzidos pelos dois alelos, como é visível pela presença do SNP c.-26G>A em heterozigotia.

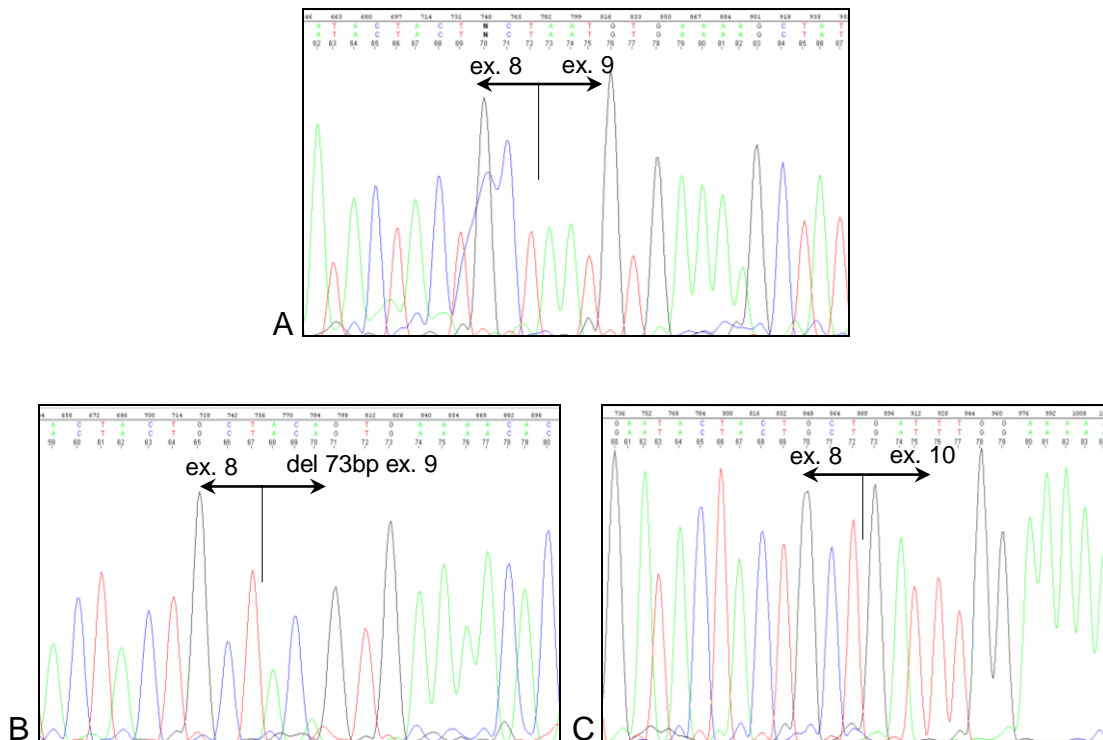
### ➤ c.632-2A>C

A VSD c.632-2A>C localiza-se no intrão 8 e afecta o nucleótido A da região conservada (AG) do 5' *splice site*. Para analisar o seu efeito ao nível do processamento do RNA, realizou-se RT-PCR com *primers* do exão 7 ao 10, obtendo-se os resultados da electroforese representada na Figura 22. A sequenciação das bandas excisadas do gel (Figura 23) demonstrou tratar-se de:

- **b1:** banda de maior peso correspondendo ao transcrito normal (exão 7 a 10) comum aos portadores de c.632-2A>C e aos indivíduos normais.
- **b2:** banda intermédia correspondendo ao transcrito com deleção dos primeiros 73 bp do exão 9 *out of frame* (r.682\_754del), que leva à formação de um codão de terminação prematuro na posição 25 (p.Asn228ThrfsX25).
- **b3:** banda correspondente ao transcrito com deleção *out of frame* do exão 9 (r.682\_793del) que leva à formação de um codão de terminação prematuro na posição 12 (p.Asn228AspfsX12).



**Figura 22:** Padrão electroforético dos produtos de RT-PCR obtidos para dois indivíduos portadores da VSD c.632-2A>C (P1 e P2) e três controlos normais (N1, N2 e N3), sendo M o marcador de peso molecular. À direita apresenta-se de forma esquemática a sequência correspondente às bandas obtidas no gel de agarose.



**Figura 23:** Electroforogramas dos produtos de RT-PCR obtidos para a VSD c.632-2A>C. A - sequenciação da banda b1 que apresenta o transcrito íntegro do exão 7-10 tanto nos indivíduos normais como nos portadores da VSD c.632-2A>C; B - sequenciação da banda b2, exclusiva dos portadores de c.632-2A>C, onde se observa a deleção de 73bp a 5' do exão 9; C - sequenciação da banda b3, exclusiva dos portadores de c.632-2A>C, revelando a deleção do exão 9.

➤ **c.8488-1G>A**

A mutação intrónica c.8488-1G>A localiza-se na região conservada do 3' splice site (AG), afectando o último nucleótido do intrão 19. Esta VSD foi analisada por RT-PCR com primers do exão 18 até à junção dos exões 20 e 21 e obteve-se o resultado ilustrado na imagem da electroforese dos produtos de RT-PCR (Figura 24). Obtiveram-se três bandas, quer no portador da referida VSD quer nos controlos, que foram excisadas do gel de agarose e sequenciadas, tendo-se obtido os seguintes resultados (Figura 25):

- **b1:** transcrito com deleção *in frame* de 12bp a 5' do exão 20 e retenção de 64bp do intrão 20 (r.8488\_8499del; 8632\_8633ins8632+4243\_8363-1264), originando

um codão de terminação prematuro na posição 22 (p.Trp2830\_Lys2833del; p.Glu2878ValfsX22).

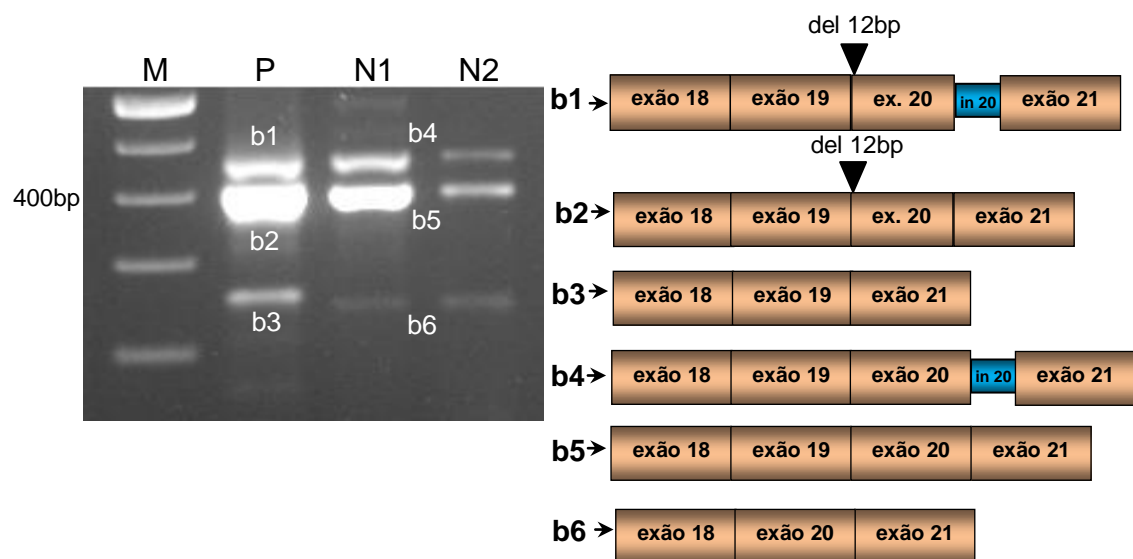
- **b2**: transcrito correspondendo à banda com peso molecular intermédio (~400bp) consistindo na sequência normal entre os exões 18 e 21, apenas com deleção *in frame* de 12bp a 5' do exão 20 (r.8488\_8499del ou p.Trp2830\_Lys2833del).

- **b3**: transcrito correspondendo à banda de menor peso molecular que revelou a deleção *out of frame* do exão 20 (r.8488\_8632del), com provável formação de um codão de terminação prematuro na posição 13 (p.Trp2830LysfsX13).

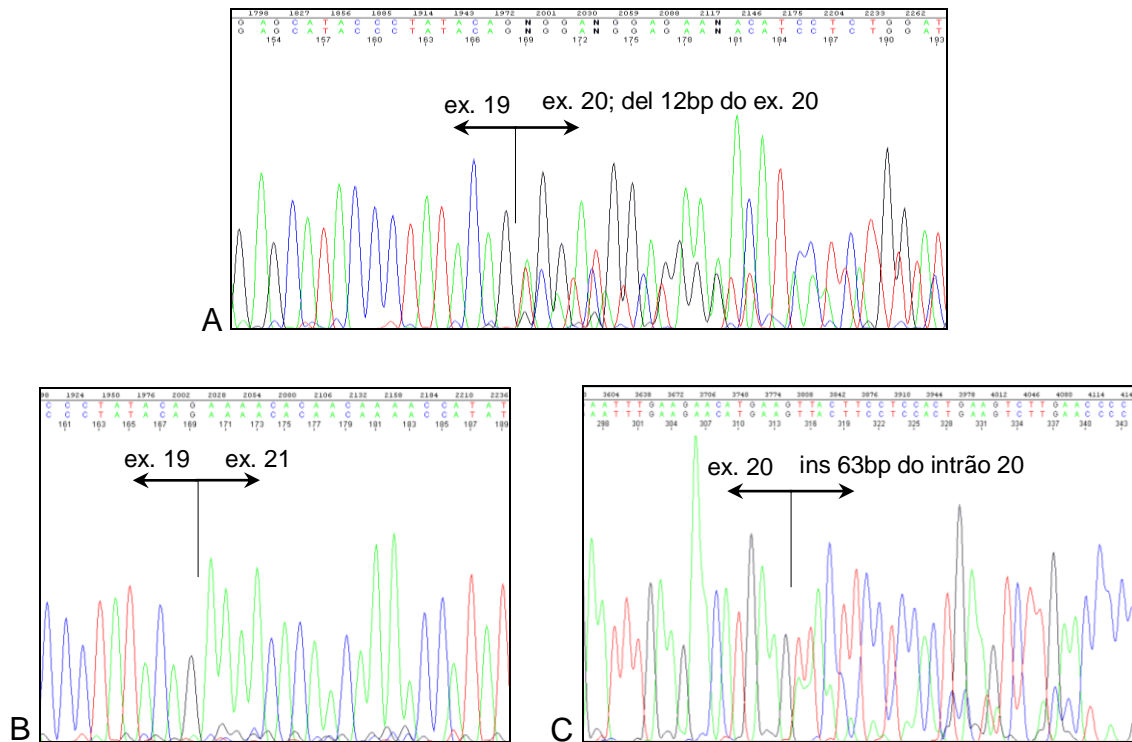
- **b4**: transcrito correspondendo à banda de maior peso molecular obtida nos indivíduos normais, correspondendo à retenção de 64bp do intrão 20 (r.8632\_8633ins8632+4243\_8363-1264) com provável formação de um codão de terminação prematuro na posição 22 (p.Glu2878ValfsX22).

- **b5**: transcrito obtido nos indivíduos normais, que consiste na sequência normal entre os exões 18 e 21.

- **b6**: transcrito obtido nos indivíduos normais, que revelou a deleção *in frame* do exão 19 (r.8332\_8487del ou p.Ile2778\_Gln2829del).



**Figura 24:** Padrão electroforético dos produtos de RT-PCR obtidos para um indivíduo portador da VSD c.8488-1G>A (P) e dois controlos normais (N1 e N2), sendo M o marcador de peso molecular. À direita apresenta-se de forma esquemática a sequência correspondente às bandas obtidas no gel de agarose.



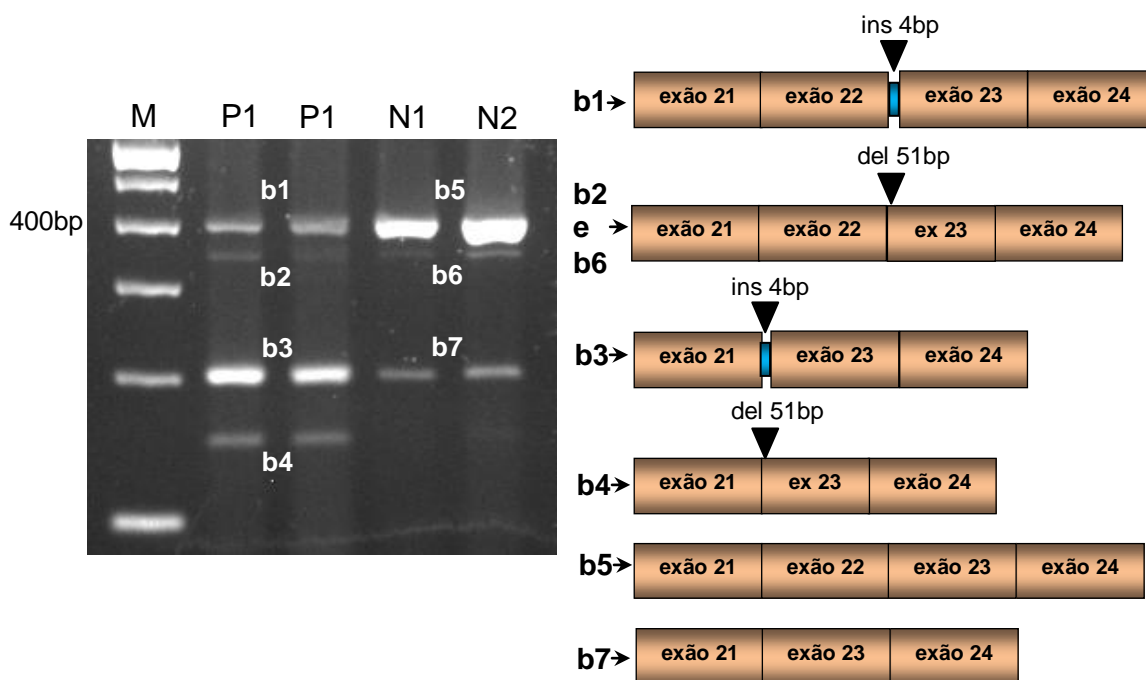
**Figura 25:** Electroforogramas dos produtos de RT-PCR obtidos para a VSD c.8488-1G>A. A - sequenciação que apresenta a deleção de 12bp no início do exão 20 comum aos transcritos b1 e b2; B - sequenciação da banda b3, exclusiva do portador de c.8488-1G>A, onde se observa a deleção do exão 20; C - sequenciação que apresenta a retenção de 63bp do intrão 20 comum aos transcritos b1 e b4.

➤ **c.8954-5A>G**

A mutação intrónica c.8954-5A>G localiza-se no 3' *splice site* na posição -5 do intrão 22. Esta VSD foi analisada por RT-PCR com primers que amplificam os exões 21 a 24 e obteve-se o resultado ilustrado na imagem da electroforese dos produtos de RT-PCR (Figura 26). As bandas obtidas foram excisadas do gel de agarose e sequenciadas (Figura 27), tendo-se obtido os seguintes resultados:

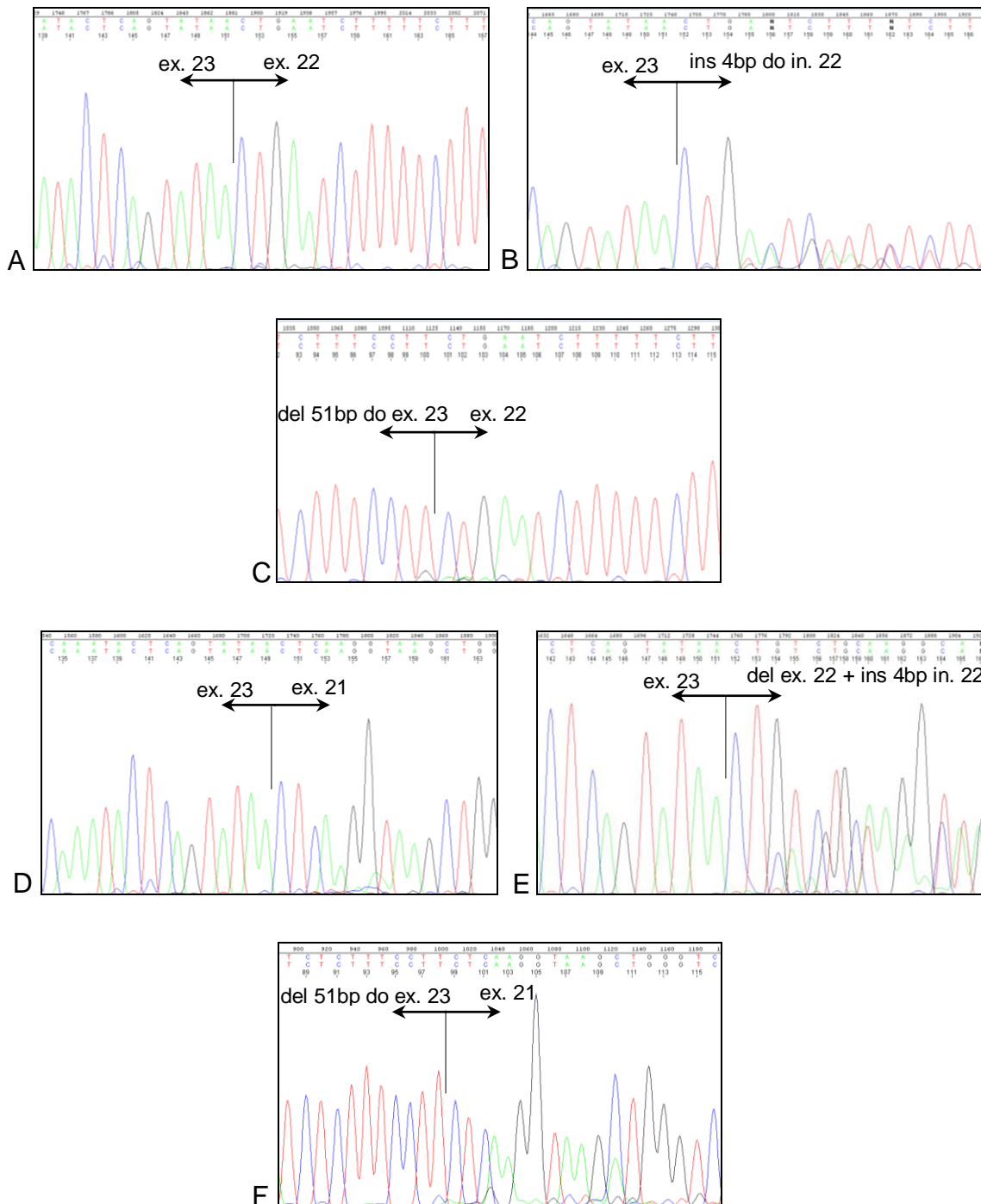
- **b1:** transcrito com retenção *out of frame* das últimas 4bp (ACAG) do intrão 22 no exão 23 (r.8954-4\_8954-1ins), com formação de um codão de terminação prematuro na posição 34 (p.Val2985AspfsX34).
- **b2 e b6:** transcritos com deleção *in frame* de 51bp do início do exão 23 (r.8954\_9004del ou p.Val2985\_Thr3001del).

- **b3:** transcrito *in frame* com deleção do exão 22 e retenção das últimas 4bp (ACAG) do intrão 22 no exão 23 (r.8755\_8953del; 8954-4\_8954-1ins).
- **b4:** transcrito com deleção *out of frame* do exão 22 e 51bp do início do exão 23 (r.8755\_9004del), com formação de um codão de terminação prematuro na posição 26 (p.Gly2919LysfsX26).
- **b5:** transcrito correspondendo à sequência normal entre os exões 21 e 24.
- **b7:** transcrito com deleção *out of frame* do exão 22 (r.8755\_8953del), com formação de um codão de terminação prematuro na posição 3 (p.Gly2919LeufsX3).



**Figura 26:** Padrão electroforético dos produtos de RT-PCR obtidos para o indivíduo portador da VSD c.8954-5A>G (P1) e os controlos normais (N1 e N2), sendo M o marcador de peso molecular. À direita apresenta-se de forma esquemática a sequência correspondente às bandas obtidas no gel de agarose.

## RESULTADOS



**Figura 27:** Electroforogramas dos produtos de RT-PCR obtidos para a VSD c.8954-5A>G (sequenciações da cadeia *reverse*). A - sequenciação correspondente ao transcrito normal dos controlos normais (b5); B - sequenciação correspondente à banda b1 dos portadores da VSD onde se observa a retenção de 4bp do intrão 22; C - sequenciação correspondente às bandas b2 e b6, comum aos portadores de mutação e aos controlos normais, que apresenta a deleção de 51bp do início do exão 23; D - sequenciação da banda b7 que apresenta deleção do exão 22; E - sequenciação da banda b3 que apresenta deleção do exão 22 e retenção de 4bp do intrão 22; F - sequenciação da banda b4 que apresenta deleção do exão 22 e de 51bp do exão 23.

## 6. Perda de heterozigotia

A análise de perda de heterozigotia ao nível de tumores de portadores de VSD e de portadores de mutação patogénica revelou os resultados apresentados nas Tabelas 14 e 15.

**Tabela 14** - Resultados da análise de perda de heterozigotia em tumores de portadores de VSD nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Gene	Variante (HGVS) <sup>a</sup>	Origem	LOH
<i>BRCA1</i>	c.211A>G	Mama esq.	Presença do alelo normal e mutado
<i>BRCA1</i>	c.211A>G	Mama dta.	Presença do alelo normal e mutado
<i>BRCA1</i>	c.211A>G	Mama esq.	Presença do alelo normal e mutado
<i>BRCA1</i>	c.4484G>T	Mama dta.	Presença do alelo normal e mutado
<i>BRCA1</i>	c.4484G>T	Mama esq.	Presença do alelo normal e mutado
<i>BRCA2</i>	c.632-2A>C	Mama	Presença do alelo normal e mutado
<i>BRCA2</i>	c.632-2A>C	Mama esq.	Presença do alelo normal e mutado
<i>BRCA2</i>	c.4563G>A	Mama	Presença do alelo normal e mutado
<i>BRCA2</i>	c.6513C>G	Mama	Presença do alelo normal e mutado

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, *BRCA1*: GenBank U14680.1, *BRCA2*: GenBank U43746.1, com a numeração a começar no A do primeiro ATG.

**Tabela 15** - Resultados da análise de perda de heterozigotia em tumores de portadores de mutações patogénicas no gene *BRCA1* ou *BRCA2*.

Gene	Mutação patogénica (HGVS) <sup>a</sup>	Origem	LOH
<i>BRCA1</i>	c.2155delG2155insCC	Mama	Presença do alelo normal e mutado
<i>BRCA1</i>	c.2155delG2155insCC	Mama	Presença do alelo normal e mutado
<i>BRCA1</i>	c.2155delG2155insCC	Ovário	Presença do alelo normal e mutado
<i>BRCA2</i>	c.9097_9098insA	Mama esq.	Presença do alelo normal e mutado
<i>BRCA2</i>	c.9097_9098insA	Mama dta.	Presença do alelo normal e mutado

**Nota:** <sup>a</sup>Nomenclatura de acordo com HGVS, *BRCA1*: GenBank U14680.1, *BRCA2*: GenBank U43746.1, com a numeração a começar no A do primeiro ATG.



**DISCUSSÃO**



Este trabalho teve como principal objectivo avaliar a patogenicidade de VSD nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Para melhor interpretação dos resultados subdividiram-se as VSD em três grupos: variantes muito provavelmente patogénicas, variantes muito provavelmente neutras ou polimórficas e variantes que permanecem como VSD.

## 1. Variantes muito provavelmente patogénicas

### ✓ *BRCA1* c.211A>G (p.Arg71Gly)

Esta mutação afecta a penúltimo nucleótido do exão 5 e foi descrita por Vega *et al* (2001) como sendo uma mutação patogénica que origina splicing aberrante. Contrariamente ao descrito por estes autores, nós verificámos que o mecanismo responsável pela patogenicidade desta mutação é a alteração dos níveis normais de transcritos alternativos produzidos nos portadores de mutação comparativamente com os indivíduos normais. Assim, o transcrito descrito como aberrante por Vega *et al* (2001) é na realidade um transcrito alternativo presente também nos indivíduos normais, mas em quantidade diferente dos indivíduos com mutação. Este desequilíbrio deve-se à produção de transcrito *wt* (*BRCA1*-ex5FL) apenas pelo alelo normal nos portadores, como se verificou pela sequenciação deste transcrito. Por RT-PCR quantitativo, detectaram-se diferenças significativas na quantidade de transcrito *wt* e *BRCA1*- $\Delta$ 22ntex5 entre os portadores da mutação e indivíduos normais, sendo que nos primeiros a quantidade de transcrito *wt* é cinco vezes inferior e a quantidade de transcrito *BRCA1*- $\Delta$ 22ntex5 é três vezes superior à quantidade detectada nos segundos. Claes *et al* (2002) verificaram um efeito semelhante de alteração dos níveis de transcritos alternativos produzidos, induzida por mutações intrónicas fora das regiões de *splicing* altamente conservadas (AG/GT) do exão 5. Adicionalmente, as características histopatológicas dos tumores de dois portadores desta mutação são compatíveis com o fenótipo “*BRCA1*-like” descrito na literatura (Honrado *et al*, 2005), o que reforça a conclusão de que esta mutação é muito provavelmente patogénica e confere predisposição hereditária para CM e/ou CO nestas famílias.

✓ **BRCA1 c.4484G>T (p.Arg1495Met)**

A mutação *BRCA1* c.4484G>T afecta o último nucleótido do exão 14 (*acceptor splice site*). Segundo o programa *SpliceSiteFinder*, a substituição de uma guanina por uma timina nesta posição diminui a eficiência deste *splice site* de 94,4 para 81,6. Na análise de RT-PCR identificaram-se transcritos alternativos (r.4358\_4484del, r.4358\_4675del) tanto nos portadores de c.4484G>T como nos controlos. No entanto, verificou-se que o transcrito *wt* só era produzido pelo alelo *wt* (G). Yang *et al* (2003) estudaram *in vitro* a mesma mutação e verificaram que o alelo mutado apenas produzia o transcrito com deleção do exão 14 (r.4358\_4484del). Adicionalmente, nós identificamos esta mutação em três familiares afectadas (caso índice com CMB aos 52 e 54 anos e duas familiares com CM em idade precoce). Dada a inexistência de dados de segregação na literatura e de estudos de RNA nos portadores da mutação, os nossos resultados permitem-nos afirmar que esta mutação é muito provavelmente patogénica e responsável pela predisposição hereditária para CM e/ou CO nesta família.

✓ **BRCA2 c.632-2A>C**

A VSD c.632-2A>C localiza-se a -2 no intrão 8 (*acceptor splice site*), não está descrita na literatura e trata-se de uma variante que afecta a região consenso de splicing, originando dois transcritos aberrantes com alteração da grelha de leitura, o que leva à formação de codões de terminação prematuros. Este *splicing* aberrante está de acordo com o indicado pelo *SpliceSiteFinder*, que prevê a perda completa do *acceptor splice site* do intrão 8 (onde ocorre a mutação). Esta variante segrega na irmã do caso índice afectada com CM em idade precoce. Dado que esta mutação origina *splicing* aberrante e uma vez que ocorre na região consenso de *splicing* altamente conservada, podemos classificá-la como muito provavelmente patogénica e responsável pela predisposição hereditária para CM e/ou CO nesta família.

✓ **BRCA2 c.8488-1G>A**

A VSD c.8488-1G>A não está descrita na literatura e afecta a posição -1 do *acceptor splice site* no intrão 19, dando origem a dois transcritos aberrantes (deleção do exão 20 e deleção 12bp do início do exão 20). Estes resultados estão de acordo com o indicado pelo *SpliceSiteFinder*, que prevê a perda do *acceptor splice site* do exão 20. De referir que foram detectadas duas formas de *splicing* alternativo

classificadas como tal por estarem presentes nos controlos normais. Uma delas consiste na retenção de 63bp do intrão 20 (descrita por Speevak *et al* (2003) como “exão 20A”) e outra na deleção *in frame* do exão 19. Deste modo, dada a presença de dois transcritos aberrantes no portador da VSD, não detectados em controlos normais, podemos classificá-la como muito provavelmente patogénica e responsável pela predisposição hereditária para CM e/ou CO nesta família.

✓ **BRCA2 c.8954-5A>G**

A VSD c.8954-5A>G não está descrita na literatura e afecta a posição -5 do *acceptor splice site* no exão 23. Esta variante leva à formação de um transcrito aberrante com retenção de 4bp do intrão 22, que origina uma proteína truncada. Este resultado está de acordo com o programa *SpliceSiteFinder*, que mantém a eficiência do *acceptor splice site* que dá origem ao transcrito normal mas atribui uma eficiência superior a um novo *acceptor splice site* induzido pela mutação (A>G), que leva exactamente à retenção dos 4bp que nós observamos ao nível do transcrito aberrante. Adicionalmente, verificou-se a existência de transcritos alternativos (r.8755\_8953del, r.8954\_9004del, r.8755\_9004del) também descritos por Speevak *et al* (2003). No entanto, o transcrito alternativo com deleção do exão 22 apresenta no portador da VSD a retenção de 4bp do intrão 22 (Figura 26, banda b3), tornando-se deste modo aberrante. Dado que a variante c.8954-5A>G foi identificada numa familiar afectada com CMB e origina *splicing* aberrante podemos classificá-la como muito provavelmente patogénica e responsável pela predisposição hereditária para CM e/ou CO nesta família.

## 2. Variantes muito provavelmente neutras ou polimorfismos

✓ **BRCA1 c.591C>T (p.Cys197Cys)**

A variante do gene *BRCA1* c.591C>T foi detectada em três famílias e afecta o nucleótido -3 do exão 9, originando a substituição de uma citosina por uma timina sem alteração do aminoácido codificado (mutação silenciosa). Não foi possível efectuar estudos de segregação da variante em nenhuma das famílias portadoras. Dada a localização desta alteração (*acceptor splice site*) calculou-se a eficiência prevista pelo *SpliceSiteFinder* e verificou-se que não havia alteração da eficiência de *splicing*

prevista para este local (96,7). Apesar de a electroforese dos produtos de RT-PCR poder sugerir uma maior quantidade de transcrito normal nos controlos comparativamente ao portador da alteração, verificamos que o transcrito *wt* é codificado por ambos os alelos. Adicionalmente Díez *et al* (2003) identificaram esta alteração em 3% de uma população controlo. Deste modo, os nossos dados juntamente com os descritos na literatura permitem concluir que esta alteração é provavelmente polimórfica.

✓ **BRCA1 c.1486C>T (p.Arg496Cys)**

A partir dos estudos de segregação foi possível classificar esta variante como provavelmente neutra por não segregar num familiar afectado com CM aos 51 anos. Adicionalmente, esta VSD é classificada como *benign* pelo *Polyphen*. Apesar de não se poder excluir a hipótese de se tratar de uma fenocópia, o facto de a VSD não segregar numa familiar afectada é altamente sugestivo do seu potencial neutro.

✓ **BRCA1 c.2428A>T (p.Asn810Tyr)**

A VSD c.2428A>T não segrega numa familiar afectada com CM em idade precoce (38 anos). Esta variante é classificada pelo programa *Polyphen* como *probably damaging*, corroborando Fleming *et al* (2003) que referem que esta VSD (por se encontrar em local conservado) poderá afectar a função da proteína. Estes dados aparentemente contraditórios demonstram a necessidade de integrar os diferentes critérios de avaliação de patogenicidade com a avaliação dos programas informáticos. Sendo assim, o facto de esta alteração não segregar com a doença, num familiar afectado em idade precoce, é altamente sugestivo do seu potencial neutro.

✓ **BRCA1 c.2883C>T (p.Asn961Asn)**

A variante c.2883C>T não segrega em familiar afectada com CM aos 45 anos. Considerando pouco provável que esta familiar se trate de uma fenocópia, e atendendo à não segregação desta VSD com a doença, consideramos esta variante muito provavelmente neutra.

---

✓ **BRCA1 c.3600G>T (p.Gln1200His)**

A VSD do gene *BRCA1* c.3600G>T foi detectada em duas famílias, uma das quais é também portadora da mutação patogénica do gene *BRCA1* c.2088C>T. Dado que não foi possível efectuar estudos de segregação nestas famílias, não foi também possível avaliar se a variante se encontra ou não em *trans* com a mutação patogénica. Adicionalmente, a referida VSD foi recentemente descrita por Anczuków *et al* (2008) como não estando associada a aumento de risco de desenvolver CM e/ou CO por não segregar numa família portadora e não provocar *splicing* aberrante. Apesar de não ter sido possível verificar se a referida variante se encontra ou não no mesmo alelo da mutação patogénica, atendendo aos dados da literatura que referem que a coexistência de duas mutações patogénicas no mesmo alelo (*cis*) é um evento muito raro (Domchek e Weber, 2008), e em concordância com a descrição de Anczuków *et al* (2008), pode-se classificar a VSD c.3600G>T como provavelmente neutra.

✓ **BRCA1 c.4039A>G (p.Arg1347Gly)**

A VSD c.4039A>G do gene *BRCA1* foi identificada em quatro famílias, duas das quais (8 e 16) portadoras da mutação patogénica do gene *BRCA2* c.156\_157insAlu cujo efeito deletério foi demonstrado por Peixoto *et al* (2008). Na família 25 verificou-se que a VSD não segregava numa prima do caso índice afectada com CM aos 42 anos. Adicionalmente, esta alteração foi classificada como potencialmente neutra por vários autores (van der Hout *et al*, 2006; Tavgigian *et al*, 2006; Osorio *et al*, 2007). Apesar de muito raros, existem casos descritos na literatura de indivíduos portadores de duas mutações patogénicas (uma no gene *BRCA1* e outra no gene *BRCA2*) (Choi *et al*, 2006; Smith *et al*, 2008). O programa *Polyphen* classifica esta alteração como *probably damaging* devido ao grau de conservação da região onde está presente, mas a co-ocorrência desta VSD com uma mutação patogénica noutro gene (*BRCA2*) em duas famílias e a não segregação com a doença numa terceira família, permite-nos classificá-la como provavelmente neutra.

✓ **BRCA1 c.4132G>A (p.Val1378Ile)**

Esta VSD não segrega em duas familiares afectadas com CM aos 40 e 46 anos. Adicionalmente, segundo o *Polyphen* esta variante é classificada como *benign*. Face à

não segregação em duas familiares afectadas com CM em idades precoces consideramos esta variante provavelmente neutra.

✓ **BRCA1 c.4941C>T (p.Asn1647Asn)**

A VSD c.4941C>T do gene *BRCA1* foi identificada no caso índice de uma família (22) portadora da mutação muito provavelmente patogénica *BRCA1* c.211A>G. A referida variante não está presente no único familiar portador da mutação patogénica identificado até à data (filho do caso índice), o que significa que a VSD e a mutação patogénica encontram-se em alelos diferentes (*trans*). Deste modo, segundo os dados da literatura que demonstram que indivíduos portadores de mutações patogénicas em *trans* no gene *BRCA1* são embrionicamente letais (Gowen *et al*, 1996; Hohenstein *et al*, 2001; Howlett *et al*, 2002; Alter *et al*, 2007), pode-se concluir que esta VSD é provavelmente neutra.

✓ **BRCA2 c.2803G>A (p.Asp935Asn)**

A VSD c.2803G>A foi detectada em duas famílias, sendo que numa delas (29) se verificou que estava presente na mãe do caso índice com CM diagnosticado em idade tardia. Apesar desta alteração se encontrar numa região conservada do gene *BRCA2* (*Polyphen*), detectamo-la numa frequência superior a 1% na população controlo. Adicionalmente, Spurdle *et al* (2008) verificaram que esta alteração co-segrega com mutação patogénica em *trans*. Deste modo, esta variante pode ser classificada como polimorfismo.

✓ **BRCA2 c.2817C>T (p.Thr940Thr); BRCA2 c.9586A>G (p.Lys3196Glu)**

Estas duas VSD estão presentes no caso índice (28) portador de uma mutação intrónica no mesmo gene cuja patogenicidade é demonstrada no presente trabalho. Não foi possível avaliar se as VSD se encontravam em *trans* com a mutação muito provavelmente patogénica, devido à inexistência de familiares afectados. No entanto, segundo os dados da literatura indivíduos homocigóticos para mutações patogénicas são letais ou originam fenótipo de Anemia de *Fanconi* tipo D1 (Howlett *et al*, 2002; Alter *et al*, 2007) e é muito raro haver indivíduos com duas mutações patogénicas no

mesmo alelo (*cis*) (Domchek e Weber, 2008). Deste modo, à luz dos resultados obtidos, classificamo-las como provavelmente neutras.

✓ **BRCA2 c.4271C>G (p.Ser1424Cys)**

A VSD c.4271C>G não segrega em familiar diagnosticada com CO em idade precoce e co-ocorre com mutação patogénica no gene *BRCA1*. Deste modo, podemos classificá-la como provavelmente neutra.

✓ **BRCA2 c.4563G>A (p.Leu1521Leu); BRCA2 c.6513C>G (p.Val2171Val)**

As VSD c.4563G>A e c.6513C>G estão presentes no caso índice (18) e segregam na mãe afectada com CM aos 54 anos. Estas variantes silenciosas não foram encontradas na nossa população controlo, mas Wagner *et al* (1999) descrevem uma frequência superior a 1% numa população de 166 indivíduos para ambas as mutações. Os nossos dados não o permitem afirmar, mas atendendo aos dados da literatura classificamo-las como polimorfismos.

✓ **BRCA2 c.4670C>G (p.Thr1557Ser)**

A VSD c.4670C>G foi identificada em duas famílias, sendo que numa delas (15) não segrega num familiar afectado com CMB e co-ocorre em *trans* com mutação patogénica no mesmo gene. Podemos então classificá-la como provavelmente neutra.

✓ **BRCA2 c.6347A>G (p.His2116Arg)**

Esta VSD foi detectada em três famílias e em duas delas (14 e 19) não segregou em indivíduos diagnosticados com CM em idade jovem. Adicionalmente, duas das famílias (5 e 14) são portadoras de mutação patogénica no gene *BRCA1*. Atendendo a estes resultados, podemos classificá-la como variante provavelmente neutra.

### 3. Variantes que permanecem como VSD

#### ✓ **BRCA1 c.5122G>C (p.Ala1708Pro)**

A VSD c.5122G>C do gene *BRCA1* foi identificada em dois familiares afectados (caso índice com CO e mãe do caso índice, afectada com CMB aos 37 e 39 anos de idade). Esta alteração não foi identificada em 186 controlos normais e está descrita na literatura apenas nesta família como VSD (Peixoto *et al*, 2006). Está descrita uma mutação *missense* patogénica que afecta o mesmo codão, mas que origina um aminoácido diferente (Vallon-Christersson *et al*, 2001; Díez *et al*, 2003). Adicionalmente, este codão localiza-se no terminal carboxilo do *BRCA1* na região dos domínios BRCT, envolvidos nas funções de reparação do DNA. Estão também descritas como patogénicas outras mutações que afectam estes domínios (Vallon-Christersson *et al*, 2001; Osorio *et al*, 2002; Díez *et al*, 2003; Carvalho *et al*, 2007; Spurdle *et al*, 2008). Apesar da variante c.5122G>C originar a troca de uma alanina por uma prolina (ambos aa neutros), é classificada no *Polyphen* como *probably damaging*. Serão necessários estudos funcionais para avaliar o efeito desta alteração ao nível da função da proteína.

#### ✓ **BRCA2 c.2T>G (p.Met1Arg)**

A VSD c.2T>G está localizada no codão de iniciação do gene *BRCA2* e está descrita na BIC como variante de significado desconhecido. Ao nível do processamento do mRNA não se observaram alterações no portador da VSD, apenas se verificou uma aparente redução do alelo mutado ao nível de cDNA comparativamente ao obtido no gDNA. Verificou-se também que esta VSD segrega em familiar afectada com CM em idade precoce. Existem dados na literatura que referem uma eficiência de tradução de apenas 7,4% do codão AGG em vez de ATG no gene *ACAT1/T2 (Mitochondrial Acetoacetyl-CoA Thiolase)* (Fukao *et al*, 2003). Estes dados sugerem que esta alteração é patogénica, mas será necessário efectuar estudos quantitativos de RNA e de proteína de forma a confirmar os dados acima referidos.

---

✓ **BRCA2 c.68-7T>A**

A VSD c.68-7T>A afecta o *acceptor splice site* do intrão 2 do gene *BRCA2* e foi inicialmente descrita por Santarosa *et al* (1999) como de significado desconhecido. O gene *BRCA2* apresenta splicing alternativo do exão 3 já descrito por alguns autores (Nordling *et al*, 1998; Peixoto *et al*, 2008; Vreeswijk *et al*, 2008). Apesar de se tratar de uma deleção *in frame* não se sabe qual a implicação funcional da ausência do exão 3 na proteína BRCA2. Por um lado, esta região contém dois domínios de transactivação importantes e é necessária para a fosforilação da BRCA2 (Milner *et al*, 1997, 2000). Por outro lado, verificamos que tanto o alelo mutado como o *wt* contribuem para o transcrito “normal”, ao contrário do que observamos com a mutação patogénica *BRCA2* c.156\_157insAlu, em que se observa que apenas o alelo não mutado produz transcrito *wt* (Peixoto *et al*, 2008). Dado que segundo o *SpliceSiteFinder* existe uma ligeira diminuição de eficiência do *acceptor splice site* afectado por esta VSD e que não dispomos de familiares para efectuar estudos de segregação ou de outros dados que nos permitam tirar conclusões, esta variante permanece classificada como VSD.

✓ **BRCA2 c.7994A>G (p.Asp2665Gly)**

A VSD c.7994A>G segrega na irmã do caso índice com CM aos 60 anos. Esta variante não foi detectada na nossa população controlo, mas Chenevix-Trench *et al* (2006) detectaram esta alteração numa baixa proporção de controlos (1/180). Como esta alteração se encontra numa região conservada do gene *BRCA2* (*Polyphen*) e segrega com a doença, será necessário estudar um maior número de controlos e realizar estudos funcionais para esclarecer o efeito desta variante ao nível da proteína.

#### **4. Avaliação integrada da patogenicidade das VSD**

Foram obtidos dados de segregação em 18 das 33 famílias analisadas, o que permitiu classificar oito VSD (presentes em nove famílias) como provavelmente neutras por não segregarem com a doença na família. Por outro lado, as restantes 10 VSD (presentes em nove famílias) segregam com a doença. A co-ocorrência com mutação patogénica no mesmo gene permitiu classificar quatro VSD como provavelmente neutras (duas do gene *BRCA1* e duas do gene *BRCA2*). A co-ocorrência com mutação patogénica no mesmo gene em concomitância com a não

segregação da VSD permitiu classificar uma variante do gene *BRCA2*. A frequência detectada na nossa população controlo permitiu classificar uma VSD como polimorfismo. Em três das VSD os dados de segregação corroboraram os resultados obtidos do processamento de mRNA, que indicaram ser altamente provável a patogenicidade destas alterações. No total, o efeito no mRNA permitiu demonstrar a patogenicidade de cinco VSD, presentes em sete famílias.

Como se pode verificar nas Tabelas 12 e 13, a previsão do programa *ESEfinder* na maioria dos casos não foi concordante com o significado que se veio a atribuir às diversas VSD com base nos restantes critérios avaliados. Por este motivo, não foi incluído este parâmetro na discussão individual das VSD. Por outro lado, os resultados obtidos pelos programas *Polyphen* e *SpliceSiteFinder* foram, em geral, mais congruentes com os dados derivados de outras estratégias de avaliação de patogenicidade. Este facto demonstra que os programas informáticos por si só não são um critério suficiente para avaliação da patogenicidade e devem ser integrados com os restantes parâmetros.

A análise de LOH nos tumores analisados de portadores de VSD não foi conclusiva, uma vez que não foi observada perda de heterozigotia em nenhum caso. Como foi possível verificar, as mutações *BRCA1* c.211A>G, *BRCA1* c.4484G>T e *BRCA2* 632-2A>C são muito provavelmente patogénicas e, no entanto, não se observou perda do alelo *wt* nas amostras de tumor analisadas. De referir que foram analisadas amostras de tumor de portadores de mutações patogénicas (*frameshift*) de forma a validar os resultados obtidos por este tipo de análise e verificou-se que estes tumores também apresentavam retenção do alelo normal. Assim sendo, não sabemos se estes resultados se devem a contaminação com tecido normal (dado que não foi efectuada microdissecção dos tumores) ou se indicam que a perda do alelo normal não é um evento crucial no desenvolvimento tumoral. Estes resultados podem ser explicados por fenómenos de haploinsuficiência dos genes *BRCA* (King *et al*, 2007; Meric-Bernstam *et al*, 2007) ou por silenciamento epigenético do alelo normal nas células tumorais (Esteller *et al*, 2001; Herman *et al*, 2003).

## 5. Conclusão

Neste estudo analisaram-se seis VSD novas, três das quais se verificou serem muito provavelmente patogénicas e as outras três provavelmente neutras. Os nossos resultados permitiram alterar a classificação da literatura de 10 VSD classificando nove como provavelmente neutras e uma como polimorfismo. Relativamente às restantes nove variantes analisadas, manteve-se a classificação da literatura de quatro classificadas como VSD e de três como polimorfismos (Tabela 16). Apesar de corroborarem a patogenicidade atribuída na literatura às variantes *BRCA1* c.211A>G e *BRCA1* c.4484G>T, os nossos resultados permitiram clarificar os mecanismos responsáveis por essa patogenicidade.

Neste trabalho demonstrou-se, também, a importância da integração dos vários parâmetros de avaliação da patogenicidade de VSD com os modelos teóricos, nomeadamente programas informáticos. Verificou-se também a relevância dos estudos de mRNA nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e sua interpretação por comparação com indivíduos normais, nomeadamente devido aos diversos mecanismos de SA que ocorrem nestes genes.

Os resultados deste trabalho tornaram possível proporcionar a realização de diagnóstico pré-sintomático em sete famílias portadoras de mutações muito provavelmente patogénicas, tendo-se até à data realizado o diagnóstico pré-sintomático de 15 indivíduos pertencentes a estas famílias. Este diagnóstico permite a adopção de medidas profilácticas nos indivíduos portadores de mutação e a redução da ansiedade dos não portadores. Por outro lado, este estudo permite seleccionar as famílias cujas variantes não se revelaram patogénicas para o estudo de outros genes ou para o estudo de mutações não detectáveis pelas técnicas actuais.

**Tabela 16:** Síntese da classificação das VSD dos genes *BRCA1* e *BRCA2* analisadas e da contribuição deste trabalho para o seu esclarecimento.

<b>Gene</b>	<b>VSD</b>	<b>Classificação actual</b>	<b>Contribuição</b>
<i>BRCA1</i>	c.211A>G	Muito provavelmente patogénica	Confirmação de classificação
<i>BRCA1</i>	c.591C>T	Polimorfismo	Confirmação de classificação
<i>BRCA1</i>	c.1486C>T	Provavelmente neutra	Alteração de classificação
<i>BRCA1</i>	c.2428A>T	Provavelmente neutra	Alteração de classificação
<i>BRCA1</i>	c.2883C>T	Provavelmente neutra	Variante nova
<i>BRCA1</i>	c.3600G>T	Provavelmente neutra	Alteração de classificação
<i>BRCA1</i>	c.4039A>G	Provavelmente neutra	Alteração de classificação
<i>BRCA1</i>	c.4132G>A	Provavelmente neutra	Alteração de classificação
<i>BRCA1</i>	c.4484G>T	Muito provavelmente patogénica	Confirmação de classificação
<i>BRCA1</i>	c.4941C>T	Provavelmente neutra	Variante nova
<i>BRCA1</i>	c.5122G>C	Significado desconhecido	Confirmação de classificação
<i>BRCA2</i>	c.2T>G	Significado desconhecido	Confirmação de classificação
<i>BRCA2</i>	c.68-7T>A	Significado desconhecido	Confirmação de classificação
<i>BRCA2</i>	c.632-2A>C	Muito provavelmente patogénica	Variante nova
<i>BRCA2</i>	c.2803G>A	Polimorfismo	Alteração de classificação
<i>BRCA2</i>	c.2817C>T	Provavelmente neutra	Variante nova
<i>BRCA2</i>	c.4271C>G	Provavelmente neutra	Alteração de classificação
<i>BRCA2</i>	c.4563G>A	Polimorfismo	Confirmação de classificação
<i>BRCA2</i>	c.4670C>G	Provavelmente neutra	Alteração de classificação
<i>BRCA2</i>	c.6347A>G	Provavelmente neutra	Alteração de classificação
<i>BRCA2</i>	c.6513C>G	Polimorfismo	Confirmação de classificação
<i>BRCA2</i>	c.7994A>G	Significado desconhecido	Confirmação de classificação
<i>BRCA2</i>	c.8488-1G>A	Muito provavelmente patogénica	Variante nova
<i>BRCA2</i>	c.8954-5A>G	Muito provavelmente patogénica	Variante nova
<i>BRCA2</i>	c.9586A>G	Provavelmente neutra	Alteração de classificação

**ESTUDOS FUTUROS**



Face aos resultados obtidos no presente trabalho, propomos como estudos futuros:

1. Alargar a população controlo para as VSD já estudadas e avaliar a frequência das VSD que segregam com a doença na família ou que co-ocorrem com mutações patogénicas;
2. Quantificar os transcritos produzidos ou realizar estudos de expressão proteica nas VSD sugestivas de alterar os níveis de transcritos ou de proteína;
3. Realizar estudos funcionais nas VSD que afectam regiões conservadas e que permanecem com significado desconhecido.



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



Alter, BP; Rosenberg, PS and Brody, LC. Clinical and molecular features associated with biallelic mutations in FANCD1/BRCA2. *J Med Genet* 2007; 44:1-9

American Cancer Society. *In* URL: [www.cancer.org](http://www.cancer.org) (online 2008)

Anczukow, O; Buisson, M; Salles, MJ *et al.* Unclassified variants identified in BRCA1 exon 11: Consequences on splicing. *Genes Chromosomes Cancer* 2008; 47:418-426

Anderson, CW; Appella, E and Sakaguchi, K. Posttranslational modifications involved in the DNA damage response. *J Protein Chem* 1998; 17:527

Antoniou, A; Pharoah, PD; Narod, S *et al.* Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003; 72:1117-1130

Balmain, A; Gray, J and Ponder, B. The genetics and genomics of cancer. *Nat Genet* 2003; 33 Suppl:238-244

Beckmann, MW; Niederacher, D; Schnurch, HG; Gusterson, BA and Bender, HG. Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *J Mol Med* 1997; 75:429-439

Bermejo-Perez, MJ; Marquez-Calderon, S and Llanos-Mendez, A. Effectiveness of preventive interventions in BRCA1/2 gene mutation carriers: a systematic review. *Int J Cancer* 2007; 121:225-231

Berns, EM; Klijn, JG; van Putten, WL *et al.* c-myc amplification is a better prognostic factor than HER2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res* 1992; 52:1107-1113

Berry, DA; Iversen, ES Jr; Gudbjartsson, DF *et al.* BRCAPRO validation, sensitivity of genetic testing of BRCA1/BRCA2, and prevalence of other breast cancer susceptibility genes. *J Clin Oncol* 2002; 20:2701-2712

Berx, G; Cleton-Jansen, AM; Strumane, K *et al.* E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene* 1996; 13:1919-1925

BIC - Breast Cancer Information Core Database. *In* URL: [www.research.nhgri.nih.gov/bic/](http://www.research.nhgri.nih.gov/bic/) (online em Outubro 2008)

Black, DL. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem* 2003; 72:291-336

Boulton, SJ. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochem Soc Trans* 2006; 34:633-645

Boyd, J; Sonoda, Y; Federici, MG *et al.* Clinicopathologic features of BRCA-linked and sporadic ovarian cancer. *JAMA* 2000; 283:2260-2265

Bramley, M; Clarke, RB; Howell, A *et al.* Effects of oestrogens and anti-oestrogens on normal breast tissue from women bearing BRCA1 and BRCA2 mutations. *Br J Cancer* 2006; 94:1021-1028

Brekelmans, CT; Seynaeve, C; Menke-Pluymers, M *et al.* Survival and prognostic factors in BRCA1-associated breast cancer. *Ann Oncol* 2006; 17:391-400

Broca, PP. *Traité des tumeurs*. Paris: Asselin, 1866

Brzovic, PS; Rajagopal, P; Hoyt, DW; King, MC and Klevit, RE. Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nat Struct Biol* 2001; 8:833-837

Calle, EE; Rodriguez, C; Walker-Thurmond, K and Thun, MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N Engl J Med* 2003; 348:1625-1638

Campeau, PM; Foulkes, WD and Tischkowitz, MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet* 2008; 124:31-42

Cartegni, L; Wang, J; Zhu, Z; Zhang, MQ and Krainer, AR. ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(13):3568-71.

Cartegni, L; Chew, SL and Krainer, AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 2002; 3:285-298

Carvalho, MA; Marsillac, SM; Karchin, R *et al.* Determination of cancer risk associated with germ line BRCA1 missense variants by functional analysis. *Cancer Res* 2007; 67:1494-1501

Chen, J; Silver, DP; Walpita, D *et al.* Stable interaction between the products of the BRCA1 and BRCA2 tumor suppressor genes in mitotic and meiotic cells. *Mol Cell* 1998; 2:317-328

Chenevix-Trench, G; Healey, S; Lakhani, S *et al.* Genetic and histopathologic evaluation of BRCA1 and BRCA2 DNA sequence variants of unknown clinical significance. *Cancer Res* 2006; 66:2019-2027

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

Claes, K; Vandesompele, J; Poppe, B, *et al.* Pathological splice mutations outside the invariant AG/GT splice sites of BRCA1 exon 5 increase alternative transcript levels in the 5' end of the BRCA1 gene. *Oncogene* 2002; 21(26):4171-5.

Clamp, A; Danson, S and Clemons, M. Hormonal and genetic risk factors for breast cancer. *Surgeon* 2003; 1:23-31

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. *Lancet* 1997; 350(9084):1047-59

Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001; 358(9291):1389-99.

Cuzick, J; Powles, T; Veronesi, U *et al.* Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. *Lancet* 2003; 361:296-300

Deffenbaugh, AM; Frank, TS; Hoffman, M; Cannon-Albright, L; Neuhausen, SL. Characterization of common BRCA1 and BRCA2 variants. *Genet Test* 2002; 6(2):119-21.

Diez, O; Osorio, A; Duran, M *et al.* Analysis of BRCA1 and BRCA2 genes in Spanish breast/ovarian cancer patients: a high proportion of mutations unique to Spain and evidence of founder effects. *Hum Mutat* 2003b; 22:301-312

Domchek, S and Weber, BL. Genetic variants of uncertain significance: flies in the ointment. *J Clin Oncol* 2008; 26:16-17

Domchek, SM; Friebel, TM; Neuhausen, SL *et al.* Mortality after bilateral salpingo-oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: a prospective cohort study. *Lancet Oncol* 2006; 7:223-229

Easton, DF; Deffenbaugh, AM; Pruss, D *et al.* A systematic genetic assessment of 1,433 sequence variants of unknown clinical significance in the BRCA1 and BRCA2 breast cancer-predisposition genes. *Am J Hum Genet* 2007; 81:873-883

Eisen, A; Lubinski, J; Klijn, J *et al.* Breast cancer risk following bilateral oophorectomy in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: an international case-control study. *J Clin Oncol* 2005; 23:7491-7496

ESEfinder (versão 2.0). *In* URL: <http://exon.cshl.edu/ESE/> (online em 2007)

Esteller, M; Corn, PG; Baylin, SB; Herman, JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001; 61(8):3225-9

Evans, DG; Howell, A. Are BRCA1- and BRCA2-related breast cancers associated with increased mortality? *Breast Cancer Res* 2004; 6(1):E7.

Ewertz, M; Duffy, SW; Adami, HO *et al.* Age at first birth, parity and risk of breast cancer: a meta-analysis of 8 studies from the Nordic countries. *Int J Cancer* 1990; 46:597-603

Fackenthal, JD and Olopade, OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat Rev Cancer* 2007; 7:937-948

Fairfield, KM; Hankinson, SE; Rosner, BA *et al.* Risk of ovarian carcinoma and consumption of vitamins A, C, and E and specific carotenoids: a prospective analysis. *Cancer* 2001; 92:2318-2326

Fisher, B; Costantino, JP; Wickerham, DL *et al.* Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:1652-1662

Fleming, MA; Potter, JD; Ramirez, CJ; Ostrander, GK and Ostrander, EA. Understanding missense mutations in the BRCA1 gene: an evolutionary approach. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100:1151-1156

Foulkes WD. Clinically relevant biology of hereditary breast cancer. Semin Oncol 2007; 34(5):379-83

Foulkes, WD. BRCA1 and BRCA2: chemosensitivity, treatment outcomes and prognosis. Fam Cancer 2006; 5:135-142

Fukao, T; Matsuo, N; Zhang, GX *et al.* Single base substitutions at the initiator codon in the mitochondrial acetoacetyl-CoA thiolase (ACAT1/T2) gene result in production of varying amounts of wild-type T2 polypeptide. Hum Mutat 2003; 21:587-592

Giannini, G; Capalbo, C; Ristori, E *et al.* Novel BRCA1 and BRCA2 germline mutations and assessment of mutation spectrum and prevalence in Italian breast and/or ovarian cancer families. Breast Cancer Res Treat 2006; 100(1):83-91.

Globocan 2002 – International Agency for Research on Cancer (IARC). *In* URL: <http://www-dep.iarc.fr> (online em Março 2008)

Goldgar, DE; Easton, DF; Deffenbaugh, AM *et al.* Integrated evaluation of DNA sequence variants of unknown clinical significance: application to BRCA1 and BRCA2. Am J Hum Genet 2004; 75:535-544

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

Gudmundsdottir, K; Lord, CJ; Witt, E; Tutt, AN and Ashworth, A. DSS1 is required for RAD51 focus formation and genomic stability in mammalian cells. EMBO Rep 2004; 5:989-993

Hankinson, SE; Colditz, GA and Willett, WC. Towards an integrated model for breast cancer etiology: the lifelong interplay of genes, lifestyle, and hormones. Breast Cancer Res 2004; 6:213-218

Hartman, AR and Ford, JM. BRCA1 induces DNA damage recognition factors and enhances nucleotide excision repair. Nat Genet 2002; 32:180-184

Hartmann, LC; Schaid, DJ; Woods, JE *et al.* Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. *N Engl J Med* 1999; 340:77-84

Hartmann, LC; Sellers, TA; Schaid, DJ *et al.* Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93:1633-1637

Herman, JG and Baylin, SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349(21):2042-54.

HGVS – Human genome Variation Society. *In* URL: <http://www.hgvs.org/> (online em 2008)

Hogg, R and Friedlander, M. Biology of epithelial ovarian cancer: implications for screening women at high genetic risk. *J Clin Oncol* 2004; 22:1315-1327

Hohenstein, P; Kielman, MF; Breukel, C *et al.* A targeted mouse Brca1 mutation removing the last BRCT repeat results in apoptosis and embryonic lethality at the headfold stage. *Oncogene* 2001; 20:2544-2550

Honrado, E; Benitez, J and Palacios, J. The molecular pathology of hereditary breast cancer: genetic testing and therapeutic implications. *Mod Pathol* 2005; 18:1305-1320

Howlett, NG; Taniguchi, T; Olson, S *et al.* Biallelic inactivation of BRCA2 in Fanconi anemia. *Science* 2002; 297:606-609

Hunter, T. Oncoprotein networks. *Cell* 1997; 88:333-346

International Agency for Research on Cancer (IARC); Cancer Databases; IARC Cancer Epidemiology Database; WHO [online Março de 2008]. *In*: URL: <http://www.dep.iarc.fr/WHO.html>.

Jemal, A; Siegel, R; Ward, E *et al.* Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008; 58:71-96

Kelsey, JL; Gammon, MD and John, EM. Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 1993; 15:36-47

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

- King, MC. Genetic analysis of cancer in families. *Cancer Surv* 1990; 9:417-435
- King, TA; Li, W; Brogi, E *et al.* Heterogenic loss of the wild-type BRCA allele in human breast tumorigenesis. *Ann Surg Oncol* 2007; 14:2510-2518
- Kinzler, KW and Vogelstein, B. Landscaping the cancer terrain. *Science* 1998; 280:1036-1037
- Kinzler, KW and Vogelstein, B. Life (and death) in a malignant tumour. *Nature* 1996; 379:19-20
- Knudson, AG. Cancer genetics. *Am J Med Genet* 2002; 111:96-102
- Komenaka, IK; Ditkoff, BA; Joseph, KA *et al.* The development of interval breast malignancies in patients with BRCA mutations. *Cancer* 2004; 100:2079-2083
- Korde, LA; Calzone, KA and Zujewski, J. Assessing breast cancer risk: genetic factors are not the whole story. *Postgrad Med* 2004; 116:6-4, 19
- Kote-Jarai, Z; Powles, TJ; Mitchell, G *et al.* BRCA1/BRCA2 mutation status and analysis of cancer family history in participants of the Royal Marsden Hospital tamoxifen chemoprevention trial. *Cancer Lett* 2007; 247:259-265
- Kriege, M; Brekelmans, CT; Boetes, C *et al.* Efficacy of MRI and mammography for breast-cancer screening in women with a familial or genetic predisposition. *N Engl J Med* 2004; 351:427-437
- Kurman RJ, Shih leM. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol* 2008; 27(2):151-60.
- Lakhani, SR; Jacquemier, J; Sloane, JP *et al.* Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1138-1145
- Layde, PM; Webster, LA; Baughman, AL *et al.* The independent associations of parity, age at first full term pregnancy, and duration of breastfeeding with the risk of breast cancer. *Cancer and Steroid Hormone Study Group. J Clin Epidemiol* 1989; 42:963-973
- Lengauer, C; Kinzler, KW and Vogelstein, B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396:643-649

Levitt, NC and Hickson, ID. Caretaker tumour suppressor genes that defend genome integrity. *Trends Mol Med* 2002; 8:179-186

Lipworth, L; Bailey, LR and Trichopoulos, D. History of breast-feeding in relation to breast cancer risk: a review of the epidemiologic literature. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:302-312

Liu, HX; Cartegni, L; Zhang, MQ and Krainer, AR. A mechanism for exon skipping caused by nonsense or missense mutations in BRCA1 and other genes. *Nat Genet* 2001; 27:55-58

Lorincz, AM and Sukumar, S. Molecular links between obesity and breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13:279-292

Lungu, O; Wright, TC, Jr. and Silverstein, S. Typing of human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification with L1 consensus primers and RFLP analysis. *Mol Cell Probes* 1992; 6:145-152

Lynch, HT; Silva, E; Snyder, C and Lynch, JF. Hereditary breast cancer: part I. Diagnosing hereditary breast cancer syndromes. *Breast J* 2008; 14:3-13

Madalinska, JB; van Beurden, M; Bleiker, EM *et al.* Predictors of prophylactic bilateral salpingo-oophorectomy compared with gynecologic screening use in BRCA1/2 mutation carriers. *J Clin Oncol* 2007; 25:301-307

Magnusson, C; Baron, JA; Correia, N *et al.* Breast-cancer risk following long-term oestrogen- and oestrogen-progestin-replacement therapy. *Int J Cancer* 1999; 81:339-344

McPherson, K; Steel, CM and Dixon, JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *BMJ* 2000; 321:624-628

Meijers-Heijboer, H; van Geel, B; van Putten, WL *et al.* Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med* 2001; 345:159-164

Meindl, A. German Consortium for Hereditary Breast and Ovarian Cancer. Comprehensive analysis of 989 patients with breast or ovarian cancer provides BRCA1 and BRCA2 mutation profiles and frequencies for the German population. *Int J Cancer* 2002; 97(4):472-80.

Meric-Bernstam, F. Heterogenic loss of BRCA in breast cancer: the "two-hit" hypothesis takes a hit. *Ann Surg Oncol* 2007; 14:2428-2429

Metcalfe, KA; Foulkes, WD; Kim-Sing, C *et al.* Family history as a predictor of uptake of cancer preventive procedures by women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Clin Genet* 2008; 73:474-479

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

Milner, J; Fuks, F; Hughes-Davies, L and Kouzarides, T. The BRCA2 activation domain associates with and is phosphorylated by a cellular protein kinase. *Oncogene* 2000; 19:4441-4445

Milner, J; Ponder, B; Hughes-Davies, L; Seltmann, M and Kouzarides, T. Transcriptional activation functions in BRCA2. *Nature* 1997; 386:772-773

Morris, JR and Solomon, E. BRCA1: BARD1 induces the formation of conjugated ubiquitin structures, dependent on K6 of ubiquitin, in cells during DNA replication and repair. *Hum Mol Genet* 2004; 13:807-817

Moynahan, ME; Cui, TY and Jasin, M. Homology-directed dna repair, mitomycin-c resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. *Cancer Res* 2001a; 61:4842-4850

Moynahan, ME; Pierce, AJ and Jasin, M. BRCA2 is required for homology-directed repair of chromosomal breaks. *Mol Cell* 2001b; 7:263-272

Narod, SA and Foulkes, WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:665-676

NCCN - National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology™. Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian. V.I.2008. *In:* URL: [www.nccn.org](http://www.nccn.org)

Nordling, M; Karlsson, P; Wahlstrom, J *et al.* A large deletion disrupts the exon 3 transcription activation domain of the BRCA2 gene in a breast/ovarian cancer family. *Cancer Res* 1998; 58:1372-1375

Osborne, C; Wilson, P and Tripathy, D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 2004; 9:361-377

Osorio, A; de la, HM; Rodriguez-Lopez, R *et al.* Loss of heterozygosity analysis at the BRCA loci in tumor samples from patients with familial breast cancer. *Int J Cancer* 2002; 99:305-309

Osorio, A; Milne, RL; Honrado, E *et al.* Classification of missense variants of unknown significance in BRCA1 based on clinical and tumor information. *Hum Mutat* 2007; 28:477-485

Pajares, MJ; Ezponda, T; Catena, R *et al.* Alternative splicing: an emerging topic in molecular and clinical oncology. *Lancet Oncol* 2007; 8:349-357

Parkin, DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2:533-543

Parmigiani, G; Berry, D and Aguilar, O. Determining carrier probabilities for breast cancer-susceptibility genes BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 1998; 62:145-158

Patel, KJ; Yu, VP; Lee, H *et al.* Involvement of Brca2 in DNA repair. *Mol Cell* 1998; 1:347-357

Peixoto, A; Salgueiro, N; Santos, C *et al.* BRCA1 and BRCA2 germline mutational spectrum and evidence for genetic anticipation in Portuguese breast/ovarian cancer families. *Fam Cancer* 2006; 5:379-387

Peixoto, A; Santos, C; Rocha, P; Pinheiro, M; Príncipe, S; Pereira, D; Rodrigues, H; Castro, F; Abreu, J; Gusmão, L; Amorim, A; Teixeira MR. The c.156\_157insAlu BRCA2 rearrangement accounts for more than one-fourth of deleterious BRCA mutations in northern/central Portugal. *Breast Cancer Res Treat* 2008. [Epub ahead of print]

Pettigrew, C; Wayte, N; Lovelock, PK *et al.* Evolutionary conservation analysis increases the colocalization of predicted exonic splicing enhancers in the BRCA1 gene with missense sequence changes and in-frame deletions, but not polymorphisms. *Breast Cancer Res* 2005; 7:R929-R939

Pettigrew, CA; Wayte, N; Wronski, A *et al.* Colocalisation of predicted exonic splicing enhancers in BRCA2 with reported sequence variants. *Breast Cancer Res Treat* 2008; 110:227-234

Pharoah PD, Ponder BA. The genetics of ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2002; 16(4):449-68.

Pharoah, PD; Day, NE and Caldas, C. Somatic mutations in the p53 gene and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer* 1999; 80:1968-1973

Pichert, G; Bolliger, B; Buser, K and Pagani, O. Evidence-based management options for women at increased breast/ovarian cancer risk. *Ann Oncol* 2003; 14:9-19

Pischon, T; Nothlings, U and Boeing, H. Obesity and cancer. *Proc Nutr Soc* 2008; 67:128-145

PolyPhen - Polimorphism Phenotyping. *In* URL: <http://coot.embl.de/PolyPhen> (online em 2007)

Ramensky, V; Bork, P and Sunyaev, S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:3894-3900

Rebbeck, TR; Friebel, T; Lynch, HT *et al.* Bilateral prophylactic mastectomy reduces breast cancer risk in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: the PROSE Study Group. *J Clin Oncol* 2004; 22:1055-1062

Rebbeck, TR; Lynch, HT; Neuhausen, SL *et al.* Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med* 2002; 346:1616-1622

Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 2008; 52(1):108-18.

Robson, ME. Treatment of hereditary breast cancer. *Semin Oncol* 2007; 34:384-391

Robson, ME; Boyd, J; Borgen, PI and Cody, HS, III. Hereditary breast cancer. *Curr Probl Surg* 2001; 38:387-480

Roukos, DH and Briasoulis, E. Individualized preventive and therapeutic management of hereditary breast ovarian cancer syndrome. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4:578-590

Roukos, DH; Kappas, AM and Tsianos, E. Role of surgery in the prophylaxis of hereditary cancer syndromes. *Ann Surg Oncol* 2002; 9:607-609

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(12):5463-7.

Santarosa, M; Viel, A and Boiocchi, M. Splice variant lacking the transactivation domain of the BRCA2 gene and mutations in the splice acceptor site of intron 2. *Genes Chromosomes Cancer* 1999; 26:381-382

Schmittgen, TD and Livak, KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008; 3:1101-1108

Scully, R; Chen, J; Plug, A *et al.* Association of BRCA1 with Rad51 in mitotic and meiotic cells. *Cell* 1997; 88:265-275

Shapiro MB, Senapathy P. RNA splice junctions of different classes of eukaryotes: sequence statistics and functional implications in gene expression. *Nucleic Acids Res* 1987; 15(17):7155-74.

Sharan, SK; Pyle, A; Coppola, V *et al.* BRCA2 deficiency in mice leads to meiotic impairment and infertility. *Development* 2004; 131:131-142

Simpson, PT; Reis-Filho, JS; Gale, T and Lakhani, SR. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 2005; 205:248-254

Smigal, C; Jemal, A; Ward, E *et al.* Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56:168-183

Smith, M; Fawcett, S; Sigalas, E *et al.* Familial breast cancer: double heterozygosity for BRCA1 and BRCA2 mutations with differing phenotypes. *Fam Cancer* 2008; 7:119-124

Smith, RA; Saslow, D; Sawyer, KA *et al.* American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: update 2003. *CA Cancer J Clin* 2003; 53:141-169

Speevak, MD; Young, SS; Feilotter, H and Ainsworth, P. Alternatively spliced, truncated human BRCA2 isoforms contain a novel coding exon. *Eur J Hum Genet* 2003; 11:951-954

SpliceSiteFinder (versão 0.5). *In* URL: <http://violin.genet.sickkids.on.ca/ali-cgi-bin/splicesitefinder.cgi.pl> (online em 2007)

VI Reunião de Consenso Nacional do Cancro da Mama, Sociedade Portuguesa de Senologia - *In* URL: [www.spsenologia.pt](http://www.spsenologia.pt) (online em Setembro 2008)

Spurdle, AB; Lakhani, SR; Healey, S *et al.* Clinical classification of BRCA1 and BRCA2 DNA sequence variants: the value of cytokeratin profiles and evolutionary analysis--a report from the kConFab Investigators. *J Clin Oncol* 2008; 26:1657-1663

Srebrow A, Kornblihtt AR. The connection between splicing and cancer. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 13):2635-41.

Tavassoli FA and Devilee P. *Pathology & Genetics - Tumours of Breast and Female Genital Organs*. IARC Press 2003

Tavtigian, SV; Deffenbaugh, AM; Yin, L *et al.* Comprehensive statistical study of 452 BRCA1 missense substitutions with classification of eight recurrent substitutions as neutral. *J Med Genet* 2006; 43:295-305

Tercyak, KP; Peshkin, BN; Brogan, BM *et al.* Quality of life after contralateral prophylactic mastectomy in newly diagnosed high-risk breast cancer patients who underwent BRCA1/2 gene testing. *J Clin Oncol* 2007; 25:285-291

Tsuda, H; Akiyama, F; Terasaki, H *et al.* Detection of HER-2/neu (c-erb B-2) DNA amplification in primary breast carcinoma. Interobserver reproducibility and correlation with immunohistochemical HER-2 overexpression. *Cancer* 2001; 92:2965-2974

Turner, N; Tutt, A and Ashworth, A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:814-819

Vallon-Christersson, J; Cayan, C; Haraldsson, K *et al.* Functional analysis of BRCA1 C-terminal missense mutations identified in breast and ovarian cancer families. *Hum Mol Genet* 2001; 10:353-360

van der Hout, AH; van den Ouweland, AM; van der Luijt, RB *et al.* A DGGE system for comprehensive mutation screening of BRCA1 and BRCA2: application in a Dutch cancer clinic setting. *Hum Mutat* 2006; 27:654-666

Vega, A; Campos, B; Bressac-De-Paillerets, B *et al.* The R71G BRCA1 is a founder Spanish mutation and leads to aberrant splicing of the transcript. *Hum Mutat* 2001; 17:520-521

Veronesi, U; Orecchia, R; Zurrada, S *et al.* Avoiding axillary dissection in breast cancer surgery: a randomized trial to assess the role of axillary radiotherapy. *Ann Oncol* 2005; 16:383-388

Vogelstein, B and Kinzler, KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10:789-799

Vreeswijk, MP; Kraan, JN; van der Klift, HM *et al.* Intronic variants in BRCA1 and BRCA2 that affect RNA splicing can be reliably selected by splice-site prediction programs. *Hum Mutat* 2008

Wagner, T; Stoppa-Lyonnet, D; Fleischmann, E *et al.* Denaturing high-performance liquid chromatography detects reliably BRCA1 and BRCA2 mutations. *Genomics* 1999a; 62:369-376

Weinberg, RA. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res* 1989; 49:3713-3721

Weiss, JR; Moysich, KB and Swede, H. Epidemiology of male breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14:20-26

Werness, BA; Eltabbakh, GH. Familial ovarian cancer and early ovarian cancer: biologic, pathologic, and clinical features. *Int J Gynecol Pathol* 2001 Jan;20(1):48-63.

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

Wu, LC; Wang, ZW; Tsan, JT *et al.* Identification of a RING protein that can interact in vivo with the BRCA1 gene product. *Nat Genet* 1996; 14:430-440

Xia, B; Dorsman, JC; Ameziane, N *et al.* Fanconi anemia is associated with a defect in the BRCA2 partner PALB2. *Nat Genet* 2007; 39:159-161

Yang H, Jeffrey PD, Miller J, Kinnucan E, Sun Y, Thoma NH, Zheng N, Chen PL, Lee WH, Pavletich NP. BRCA2 function in DNA binding and recombination from a BRCA2-DSS1-ssDNA structure. *Science* 2002; 297(5588):1837-48.

Yang, Y; Swaminathan, S; Martin, BK and Sharan, SK. Aberrant splicing induced by missense mutations in BRCA1: clues from a humanized mouse model. *Hum Mol Genet* 2003; 12:2121-2131

Yu, X; Chini, CC; He, M; Mer, G and Chen, J. The BRCT domain is a phospho-protein binding domain. *Science* 2003; 302:639-642

Zwijsen, RM; Wientjens, E; Klompmaker, R *et al.* CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 1997; 88:405-415