

CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *BRCA1* ASSOCIADAS AO CÂNCER HEREDITÁRIO DE MAMA

Ana Paula Marques Duarte

Dissertação apresentada ao Departamento de
Pós-Graduação em Ciências da Fundação
Antônio Prudente para a obtenção do título de
Mestre.

Área de concentração:
Oncologia

Orientador: Dr. Andrew John George Simpson
Co-orientadora: Dra. Cassandra Maria Corvello

São Paulo
2000

**EXEMPLAR
ESPECIAL**

FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Duarte, Ana Paula Marques

**Caracterização de mutações no gene *BRCA1* associadas ao
câncer hereditário de mama** / Ana Paula Marques Duarte – São Paulo,
2000.

p. 97

Dissertação(mestrado)—Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Andrew John George Simpson.

Descritores: 1. CÂNCER DE MAMA/hereditário. 2. GENÉTICA. 3. BRCA1.

Histórico Escolar

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente - Área: Oncologia

Dados do Aluno:

ANA PAULA MARQUES DUARTE

Nível: MESTRADO

Orientador ANDREW JOHN GEORGE SIMPSON

Total Geral de Créditos: 39

Data de ingresso 01/08/1997

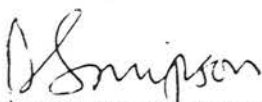
Data de Conclusão (Defesa): 23/08/2000

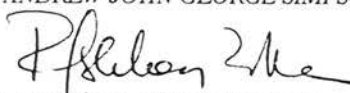
Título do Trabalho: Caracterização de Mutações no Gene BRCA1 Associados ao Câncer Hereditário de Mama

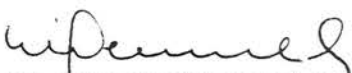
Disciplina		Período		Carga Horária	Freq.	Créditos	Situação	Conc.
		Início	Término					
HCCC00005	ESTATÍSTICA APLICADA À PESQUISA CLÍNICA	24/08/1997	05/09/1997	60	92%	5	Aprovado	B
HCCL00009	MECANISMOS TRANSCRICIONAIS ENVOLVIDOS COM A AÇÃO...	07/11/1997	02/12/1997	60	88%	5	Aprovado	A
HCCL00013	SEQUENCIAMENTO DE DNA	10/11/1997	05/12/1997	72	100%	6	Aprovado	A
HCCC00006	GENÉTICA MOLECULAR DO CÂNCER	16/03/1998	29/05/1998	60	91%	5	Aprovado	A
HCCC00010	VÍRUS E CÂNCER	02/06/1998	03/07/1998	96	93%	8	Aprovado	A
HCCC00003	CONCEITOS BÁSICOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	02/09/1998	08/10/1998	72	100%	6	Aprovado	A
HCCL00018	FISIOPATOLOGIA DA DISSEMINAÇÃO TUMORAL	05/10/1998	07/12/1998	48	88%	4	Aprovado	A

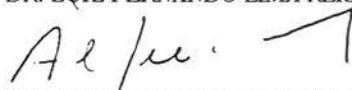
São Paulo, 23 de Agosto de 2000

A Comissão Julgadora considerou o candidato aprovado.


DR. ANDREW JOHN GEORGE SIMPSON


DRA. PATRÍCIA ASHTON-PROLLA


DR. LUIZ FERNANDO LIMA REIS


DR. ALFREDO CARLOS SIMÕES DORNELAS BARROS


Prof. Dr. LUIZ FERNANDO LIMA REIS
Diretor - Pós Graduação

Conceito:

A - Excelente; B - Bom; C - Regular; D - Reprovado; E - Excluído

Um (1) Crédito equivale a Doze (12) horas de atividades programadas

Mantido pela **Fundação Antonio Prudente** - Rua Prof. Antonio Prudente, 211 - Liberdade

São Paulo - SP - CEP 01509-900 - Fone/Fax: 3272-5113

Internet: www.hcanc.org.br - e-mail: posgrad@hcanc.org.br

“A função da ciência não é de acrescentar mais anos à vida, mas acrescentar mais vida aos anos.” John Osbron

**Aos meus pais,
pelo amor, compreensão, sacrifícios e
incentivo.**

**Aos meus irmãos:
Paulo, Marta, Tiago, Mateus e Lucas, todo o
meu carinho**

**Aos meus sobrinhos:
Felipe, Paulinha e Isadora, pelo
seus sorrisos**

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo carinho e apoio incondicional.

Ao Prof. Dr. Ricardo R. Brentani, diretor do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o câncer - São Paulo, pela oportunidade de realizar meu trabalho nesta instituição.

Ao Dr. Andrew John George Simpson, pela orientação e oportunidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa, contribuindo para meu amadurecimento profissional.

À Dra Cassandra Maria Corvello, pela amizade e orientação que tornou possível a realização desta tese e pelo aconselhamento genético das famílias analisadas neste estudo.

Ao Dr Luiz Fernando Lima Reis, diretor da pós-graduação em Ciências da Fundação Antônio Prudente, pela oportunidade de me acolher na pós-graduação e pela força nos momentos de indecisão.

À Edina e à Elis, pelas lágrimas e gargalhadas que compartilhamos, pela mão amiga sempre disponível e por serem minha família estes anos em São Paulo.

Aos amigos do Laboratório de Genética de Câncer, pelo companheirismo e apoio em todos momentos.

Ao Zé Cláudio, pela colaboração no aconselhamento genético das últimas famílias analisadas.

Aos meus amigos Nilton, Ronaldo, Eloisa, Nádia, pela amizade e anos de convivência.

À Valéria, pela amizade e apoio.

À Lara, por ter aceitado esta contra-dança do Mestrado.

À Laura, Jane, Patricia S., Patricia T, Andrea, Lara, Edina, Elis, Lourdes, Juliana, Giuliana, Roberto Elias, Pizza, Ricardo M., Carla, Sandro, Paulinho, Silvana, Henrique, Cora, Ricardinho, Nídia, Anna Izabel, Zé Cláudio, pelos divertidos e valiosos "experimentos" fora do Instituto.

Aos amigos do René Rachou, que compartilharam comigo os primeiros anos da minha carreira científica.

À Valerão, pela amizade e leituras do manuscrito.

Aos membros da banca de qualificação **Drs Luis Fernando Lima Reis, Luiz Paulo Kowalsk, Alfredo Carlos S.D.Barros e Fernando Reinach** pelas valiosas sugestões.

À Ana Maria, Fernanda e Márcia, funcionárias da secretaria de pós-graduação, pelo suporte administrativo durante todo o curso, pelas valiosas informações, disponibilidade e carinho.

À FAPESP, (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro.

E a todos aqueles que compartilharam comigo as alegrias e dificuldades do dia a dia nos corredores do terceiro ou/e quarto andar

do Instituto Ludwig, e tantos outros que nem mesmo se encontram mais trabalhando por aqui.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
ANA MARIA R. A. KUNINARI
Coordenadora de Pós-Graduação

FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Câncer como doença genética.....	1
1.2. Câncer de mama.....	5
1.2.1. Caracterização dos tumores de mama hereditários versus esporádicos.....	6
1.2.2. Síndromes hereditárias de câncer de mama.....	8
1.2.2.1. Síndromes hereditárias de câncer de mama e/ou ovário (HBOC)	8
1.2.2.2. Frequência alélica em diferentes populações.....	13
1.2.2.3. Polimorfismo e variantes de sequência.....	15
1.2.2.4. Aspectos Estruturais e Funcionais de <i>BRCA1</i>	18
1.2.3. Síndrome de Li-Fraumeni	21
1.2.4. Metodologias de estudo de famílias de alto risco para câncer de mama.....	24
2. DISCUSSÃO.....	26
2.1. Metodologias utilizadas	27
2.2. Mutações e seu significado.....	30

2.3. Famílias.....	33
2.4. Testes genéticos.....	39
2.5. Polimorfismos.....	40
ANEXO.....	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
TRABALHO SUBMETIDO.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ASO: Oligonucleotídeo alelo-específico

ASP: Iniciadores alelo-específicos

BIC: "Breast Cancer Information Core"

BRCT: "*BRCA1* Repeats Carboxi-Terminal"

CDGE: "Constant Denaturant Gel Electrophoresis"

DGGE: "Denaturing gradient gel electrophoresis"

DS: Seqüenciamento direto

FAP: Polipose Adenomatosa Familiar

HA: Análise de heteroduplex

HBOC: Câncer de mama e/ou ovário familiar

HNPCC: Câncer coloretal hereditário não poliposo

LOH: perda de heterozigose

NLS: Sinal de localização nuclear

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PTT: Teste da Proteína Truncada

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase precedida da reação de transcrição reversa

SSCP: Polimorfismo conformacional de cadeia simples

μ g: Micrograma

μ L: Microlitro

DNA: Ácido desoxiribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

cDNA: DNA complementar

SUMÁRIO

Cinco mutações germinativas diferentes em um dos três genes de susceptibilidade ao câncer de mama, *BRCA1*, *BRCA2* ou *TP53*, foram identificadas em 4 (12,9%) das 31 famílias brasileiras com câncer de mama analisadas no presente estudo. Os testes de predisposição genética foram realizados em indivíduos com uma história familiar ou pessoal para o câncer de mama referidos ao programa de aconselhamento genético desenvolvido no Hospital do Câncer A. C. Camargo. De um total de 74 famílias encaminhadas ao aconselhamento genético, 31 das 57 famílias que preenchiam os critérios de inclusão do presente estudo, optaram pela realização do teste genético. Na análise completa da região codificadora e das extremidades exon-intron do gene *BRCA1* em 28 famílias foram identificadas uma nova mutação "nonsense" no exon 11 (E649X), uma mutação "missense" no exon 15 (V1534M) e três polimorfismos exônicos, os quais já se encontravam descritos em bancos de dados (Q356R, S1436S e S1613G). Duas novas mutações no gene *TP53* foram identificadas em duas famílias diferentes das três avaliadas para este gene: uma mutação "nonsense" no exon 6 (Q192X) e uma "missense" no exon 4 (FR110-111ins). Os probandos haviam desenvolvido sarcoma e câncer de mama antes dos 30 anos. Uma mutação do tipo "frameshift" no gene *BRCA2* (2149X) foi identificada em um homem com história pessoal de câncer de mama e pertencente a uma família de alto risco para o câncer de mama. A proporção de famílias associadas com mutações deletérias em *BRCA1* em nossa amostra pode ser atribuída à predominância de famílias que apresentam

somente câncer de mama em sua história familiar, e não possui outras características associadas ao maior risco hereditário, como câncer de ovário e descendência de Judeus Ashkenazi.

1.INTRODUÇÃO

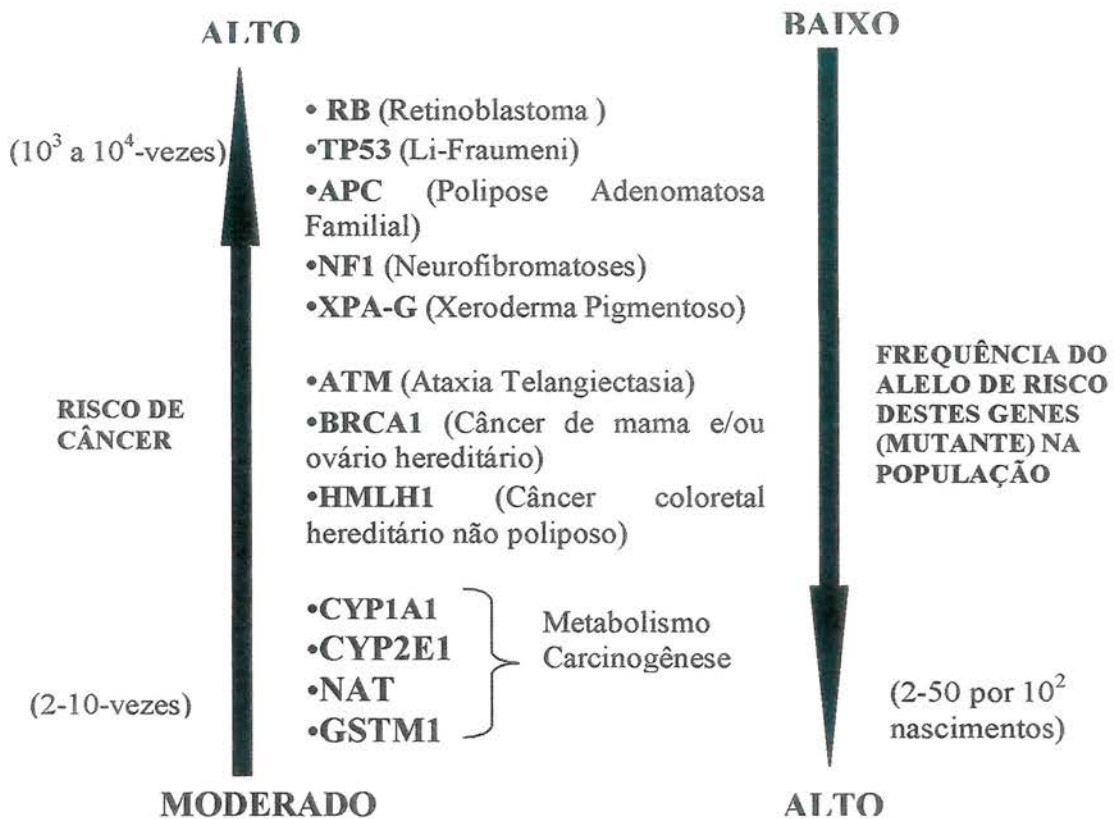
1.1. Câncer como doença genética

Câncer é uma desordem genética em que ocorre naturalmente o acúmulo de mutações principalmente em proto-oncogenes e genes supressores de tumor, estes genes atuam na regulação do crescimento e diferenciação celular. Estas mutações podem ser tanto devido a fatores exógenos quanto endógenos. Os proto-oncogenes atuam participando do processo de regulação positiva do ciclo celular e alterações nestes genes levam a um ganho de função, aumentando o estímulo à divisão celular. Em contraste, os genes supressores de tumor atuam nas células normais, regulando negativamente o crescimento celular. Mutações nestes genes podem ter efeito recessivo ao nível celular, com perda de função ou efeito dominante-negativo, onde a proteína mutante inativa a proteína normal. A perda na função destes genes faz parte da cascata de alterações genéticas que desencadeiam a tumorigênese (KNUDSON, 1993). Assim, as mutações em genes supressores de tumor são recessivas e de acordo com modelo proposto por Knudson (1971), ambos os alelos de um gene de suscetibilidade ao câncer devem ser inativados para que ocorram alterações nos mecanismos normais de controle do crescimento celular. Nas formas esporádicas de câncer, ambos os alelos devem sofrer mutação somática. Nos tumores hereditários, um dos alelos é herdado na forma mutada sendo então necessária a ocorrência de mutação no alelo normal da célula somática para a inativação do gene.

A predisposição genética ao câncer está associada a vários genes supressores de tumor. Alguns exemplos são a associação entre *TP53* à síndrome de Li-Fraumeni, *BRCA1* e *BRCA2* ao câncer de mama e ovário familiar (HBOC), *APC* à Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) , genes do sistema de reparo de DNA "mismatch repair" (*hMSH2*, *hMSH6*, *hMLH1*, *hPMS1* e *hPMS2*) ao câncer colorctal hereditário não poliposo (HNPCC), *TP16* ao melanoma familiar, *RB* ao retinoblastoma, Von Hippel Lindau (*VHL*) ao tumor renal, *NF1* ao neuroblastoma tipo 1 e *NF2* ao neuroblastoma tipo 2.

A detecção de mutações na linhagem germinativa destes genes permite identificar indivíduos que apresentam risco aumentado de desenvolver câncer. Este risco está intimamente ligado ao alelo mutante. Os genes acima citados, além de estarem associados a diferentes cânceres, apresentam diferentes graus de risco para o desenvolvimento dos mesmos. Um indivíduo que carrega um alelo mutante em *RB* apresenta um alto risco de desenvolver o retinoblastoma, enquanto que este alelo mutante apresenta uma baixa frequência na população em geral. Já genes que estão envolvidos no metabolismo da carcinogênese apresentam uma correlação diferente de *RB*; o risco de desenvolver o câncer associado ao gene *GSTM1* para os portadores do alelo mutante é somente até 10 vezes a mais que a população em geral, enquanto sua frequência é bastante alta na população (50% dos caucasianos) (figura 01).

MUTACÕES GERMINATIVAS

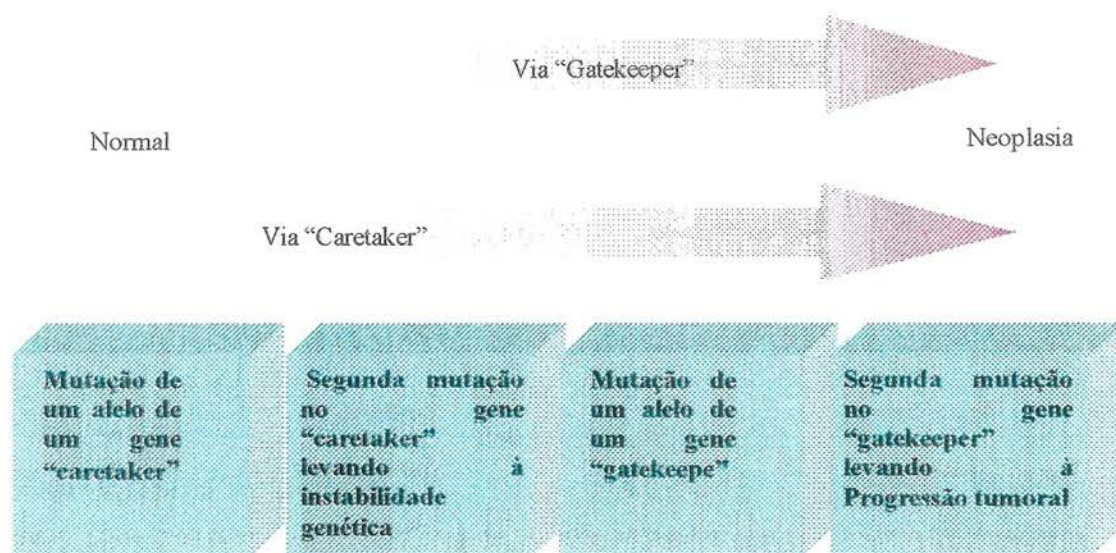


Adaptado de HUSSAIN e HARRIS, 1998.

Figura 01: Exemplos de correlação inversa entre a frequência alélica do alelo mutante na população em geral e o grau de risco para o desenvolvimento do câncer nos diferentes tipos de genes de suscetibilidade ao câncer.

Recentemente estes genes de suscetibilidade ao câncer têm sido divididos em duas classes: 1- genes que atuam no controle da proliferação celular em pontos específicos da via de transdução de sinal, denominados "gatekeepers". Neste grupo estão genes como *APC*, β -catenina, *Rb*, *TP53*,

NF1, e *VHL*. 2- genes responsáveis pela manutenção da integridade do genoma, e por isso denominados "caretakers", onde os seus representantes são principalmente os genes de reparo "mismatch repair" associados à síndrome HNPCC e os genes *BRCA1* e *BRCA2* associados à síndrome HBOC. Alterações nos genes denominados "gatekeeper" estão relacionados com a iniciação do processo da carcinogênese, enquanto que alterações nos genes "caretaker" favorecem a instabilidade genômica, ou seja, o aumento da ocorrência de mutações em outros genes, entre os quais estão incluídos principalmente os genes do tipo "gatekeeper". Mutações germinativas em genes do tipo "caretaker" conferem um menor risco quando comparados aos genes do tipo "gatekeeper", já que para genes "Caretaker" são necessárias, além da sua inativação, a inativação de genes do tipo "gatekeeper". No caso de mutações germinativas em genes "caretaker" é necessário para este modelo que ocorram até 3 mutações somáticas para a iniciação da neoplasia, ou seja, a inativação do gene "caretaker" e a inativação de um gene do tipo "gatekeeper". Em genes "gatekeeper" somente a sua inativação é necessária, ou seja, que ocorra mais um evento somático no gene para que deflagre a tumorigênese (figura 02) (KINZLER e VOGELSTEIN, 1997; HUSSAIN e HARRIS; 1998).



Adaptado de KINZLER e VOGELSTEIN, 1997.

Figura 02: Modelo proposto para iniciação da neoplasia envolvendo dois diferentes grupos de genes os "gatekeepers" e os "caretakers".

1.2. Câncer de mama

O câncer de mama constitui a primeira causa de morte por câncer em mulheres brasileiras. Estima-se que 32.695 novos casos de câncer de mama são diagnosticados anualmente; ocorreram no ano de 1999 7.165 óbitos por câncer de mama no país (<http://www.inca.org.br>).

Diversas alterações moleculares têm sido associadas à iniciação da progressão do câncer de mama. Dentre as alterações genéticas detectadas, destaca-se a amplificação gênica, encontrada em mais de 40% dos cânceres de mama. As regiões cromossômicas amplificadas são: 7p12-13, 8p 11-12,

8q24, 10q26, 11q13, 13q31, 15q24, 17q12 e 20q12-3. Destas destacamos as regiões 17q12, onde se localiza o gene *ERBB2*, 11p13 onde se encontram os genes *INT2* e *HST1* e 8q24 localização do gene *MYC*, a qual está associado a um pior prognóstico em câncer de mama (CALLAHAN et al., 1992; NAGAI et al. 1993; MEDEIROS et al., 1995).

Alta frequência de LOH (perda de heterozigose) nos cromossomos 1p, 1q21-24, 3p21-25, 4q, 5p21, 6q, 7p23, 8q, 9q, 10q, 11p13-23, 13q12-14, 14q, 15q, 16q24, 17p13, 17q12-24, 18q21-23, 20q12-13,21q e 22q (SATO et al., 1991; NAGAI et al, 1994 e 1995; MEDEIROS et al., 1994) também está descrita. Destas destacamos duas regiões: a 17p13 onde se localiza o gene supressor de tumor *TP53* e a 17q12-24 do gene supressor de tumor *BRCA1*. O gene do retinoblastoma (*Rb* localizada em 13q14) esta mutado em aproximadamente 20% dos casos de câncer de mama, enquanto que *TP53* está mutado em 30% destes (revisado por STEEG, 1992).

1.2.1. Caracterização dos tumores de mama hereditários versus esporádicos

Casos esporádicos de câncer de mama não apresentam mutações pontuais na região codificadora de *BRCA1*, mas este gene é frequentemente inativado pela perda de heterozigose (LOH) (WELCSH et al., 1998 e RIO et al.,1999). Além disso, foi observado que ocorre uma menor expressão do mRNA , com conseqüente redução dos níveis normais da proteína *BRCA1* no

tecido mamário tumoral (THOMPSON, et al., 1995, OZCELIK et al., 1998 e RIO et al., 1999). Na maioria dos casos, a redução de expressão de *BRCA1* se deve a hipermetilação de sua região promotora (DOBROVIC et al., 1997 e MAGDINIER et al., 1998).

Alguns autores observaram uma frequência maior de receptores de estrógenos (*ER*) e progesterona (*PgR*) negativos (JOHANNSSON et al., 1997; EISINGER et al., 1997 e WAGNER et al., 1998) e o aumento da incidência de mutações em *TP53* nos tumores hereditários (EISINGER et al., 1997; VERHOOG et al., 1998 e PHILLIPS, et al., 1999) em relação aos tumores esporádicos. Os dados são contraditórios quando comparamos a sobrevida geral de pacientes com tumores hereditários em relação aos esporádicos. Enquanto alguns autores demonstraram que a sobrevida geral é similar entre os pacientes com cânceres *BRCA1* positivos e os pacientes com câncer esporádico de mama (VERHOOG et al., 1998), outros autores mostraram uma melhor sobrevida geral para pacientes com mutações na linhagem germinativa em *BRCA1*, sugerindo assim sua utilização como fator prognóstico (ANSQUER et al., 1998 e AIDA et al. 1998).

Histopatologicamente, estes dois tipos de tumores diferem principalmente quanto ao alto número de mitoses, grau de pleomorfismo e a menor formação tubular dos casos hereditários em relação aos casos esporádicos. O carcinoma medular e o carcinoma medular atípico são mais

frequentemente associados aos casos hereditários de câncer de mama (13%) em relação aos esporádicos (2%; $P < .0001$) (LAKHANI et al., 1998).

1.2.2. Síndromes hereditárias de câncer de mama

Cerca de 5 a 10% dos casos de câncer de mama e 10% de câncer de ovário são atribuídos a mutações de alta penetrância em genes supressores de tumores nas linhagens germinativas (NEWMAN et al., 1988 e CLAUS et al., 1991). Os principais genes associados à predisposição genética ao câncer de mama e/ou de ovário são *BRCA1* e *BRCA2*. Além destes genes, estão associados ao câncer de mama hereditário outros genes como *TP53*, *ATM* (gene da ataxia-telangiectasia), *PTEN* (Síndrome de Cowden), genes que codificam para os receptores de andrógeno (*AR*) e estrógeno (*ER*) (revisado por WELCSH et al., 1999). E ao câncer de ovário hereditário estão associados genes pertencentes à síndrome HNPCC (WELCSH et al., 1998).

1.2.2.1. Síndrome de câncer de mama e/ou ovário (HBOC)

Hall e colaboradores em 1991 pesquisaram 23 famílias com história familiar positiva para câncer de mama (146 casos) por análise de ligação genética e encontraram um LOD score de 3.28 para o marcador D17S74 (marcador da região 17q21) para 40% destas famílias estudadas. A associação do câncer de mama ao gene mapeado por Hall e colaboradores foi confirmada por Claus e colaboradores (1991) que avaliaram 4.730 cânceres de mama em pacientes com idade entre 20 e 54 anos e 4688 controles. No entanto, a

associação foi mais significativa em famílias onde o câncer de ovário estava associado ao câncer de mama em idade precoce de manifestação da doença (<40 anos) (NAROD et al., 1991; LYNCH et al., 1991 e EASTON et al., 1993).

Em 1994, Miki e colaboradores mapearam o gene *BRCA1* pelo método de clonagem posicional, na região 17q21, que segregava com o marcador D17S855. Este gene estava mutado em 5 das 8 famílias com câncer de mama estudadas. Verificou-se que este gene era expresso em numerosos tecidos, entre eles, mama e ovário. O gene *BRCA1* possui 22 exons codificantes e um cDNA de 5592 bp, que codifica uma proteína de 1.830 aminoácidos. Várias evidências confirmaram o papel de *BRCA1* como gene supressor de tumor: 1- alta proporção de mutações que levam à formação de produtos truncados, ocasionando a perda de função da proteína (MIKI et al.; HOGERVORST et al., 1995 e SZABO e KING, 1995). 2- perda do alelo selvagem em mais de 90% dos pacientes com tumores de mama e ovário com mutação em *BRCA1* na linhagem germinativa (SMITH et al. 1992; NEWHAUSEN e MARSHALL, 1994), 3- baixos níveis de expressão de *BRCA1* em tumores de mama em pacientes sem história familiar, 4- crescimento acelerado de células mamárias epiteliais malignas e normais após a inibição da expressão de *BRCA1* (THOMPSON et al. 1995) e 5- inibição do crescimento de células MCF-7 de câncer de mama após a expressão aumentada de *BRCA1* selvagem (HOLT et al., 1996).

Outro gene associado à síndrome HBCO é o *BRCA2*. Este gene foi identificado e clonado no cromossomo 13q12-13 e contém 27 exons que

codificam uma proteína de 3.418 aminoácidos (WOOSTER et al , 1994, 1995). A partir da clonagem destes genes, vários autores se concentraram em estudos de famílias que apresentavam história familiar de câncer de mama e/ou ovário em idade precoce, para determinar os tipos de mutações nestes genes que estariam associados ao câncer, além dos estudos funcionais. Estes estudos incluíram famílias previamente selecionadas por análise de ligação, ou seja, famílias com um grande número de casos de câncer de mama e/ou ovário e com vários indivíduos afetados em várias gerações. Nestes estudos estabeleceu-se que 45% das famílias que apresentavam somente câncer de mama e 80% das famílias que apresentavam além de câncer de mama pelo menos 1 caso de câncer de ovário, apresentavam ligação ao locus *BRCA1*. Estes estudos demonstraram um risco cumulativo de até 80% para o desenvolvimento de câncer de mama e até 40% para o surgimento de câncer de ovário até os 70 anos em portadores de mutações germinativas (FRIEDMAN et al., 1994; FORD et al. 1994; EASTON et al. 1995; GAYTHER, et al., 1995; CASTILLA, et al., 1994). Por sua vez, mutações germinativas em *BRCA2* encontram-se associadas a 35% destas famílias, conferindo um risco cumulativo semelhante ao de *BRCA1* para o câncer de mama em mulheres. O risco cumulativo estimado para homens portadores de mutação em *BRCA2* no desenvolvimento de tumores é de 6% até os 70 anos (WOOSTER et al., 1995, EASTON et al., 1997). Mutações na região 5' do gene *BRCA1* têm sido associadas a um aumento no risco de câncer de ovário (FRIDMAN et al. , 1994; SHATTUCK-EIDENS et al, 1995). Couch e colaboradores em 1997, analisaram

263 famílias e não encontraram associação significativa entre a posição da mutação e os tipos de câncer. Posteriormente seguiram estudos de famílias que não obedeciam aos critérios rígidos dos estudos de análise de ligação (COUCH et al, 1997). Os principais critérios de inclusão foram: Mulheres com câncer de mama e/ou ovário: que desenvolveram a doença antes dos 45 anos; ou com um parente em primeiro grau com câncer de mama antes dos 45 anos; ou apresentando dois ou mais parentes em primeiro e/ou segundo grau afetados; ou com câncer de mama bilateral ou múltiplos tumores primários.

Cerca de 2679 alterações foram referidas para o gene *BRCA1* na linhagem germinativa ao banco de dados do "Breast Cancer Information Core" (BIC) [www.nhgi.nih.gov/Intramural-research/Lab-transfer/Bic], sendo que 665 destas foram mutações distintas e 389 reportadas uma só vez. Cinco mutações específicas são responsáveis por 1/3 de todos os relatos (185 del AG; 5385 ins C; 1294 del 40; 4184 del 4; Cys 61 Gly) no BIC. De todas as mutações referidas ao BIC, 86% compreendem mutações do tipo "nonsense" (uma substituição de um nucleotídeo que leva a formação de um códon de terminação precoce), "frameshift" (pequenas inserções ou deleções que mudam a janela de leitura dos nucleotídeos) e mutações em sítios de "splicing". As mutações restantes (14%) deste banco de dados compreendem mutações "missense" (mutações que levam à substituição de um ou mais aminoácidos). Devido à ausência de testes funcionais que permitam associar a presença de mutações "missense" ao fenotipo de suscetibilidade ao câncer, alguns autores tem sugerido os

seguintes critérios para estabelecer a associação entre genótipo - fenótipo: 1- segregação da mutação juntamente com o câncer na família; 2- frequência da mutação específica em uma amostra controle; 3- localização da mutação em regiões conservadas do gene (FRIEDMAN et al 1994 e DUROCHER et al 1996).

Recentemente, a análise de mutações em *BRCA1* e *BRCA2* em 237 famílias com história familiar de risco, referidas ao "Breast Cancer Linkage Consortium", indicou que 52% destas famílias apresentaram mutações em *BRCA1*, 32% em *BRCA2* e 16% em nenhum destes genes. Estas famílias apresentaram um mínimo de quatro casos de câncer de mama e/ou ovário sendo que a presença de um número maior de casos de câncer de ovário aumentava a associação com mutações em *BRCA1* (FORD et al., 1998). Um estudo realizado com 169 famílias mostrou que somente 7% das famílias com casos de câncer de mama e 16% com câncer de mama e ovário, apresentaram mutações em *BRCA1* (COUCH et al., 1997). Frank e colaboradores (1998), analisando 238 mulheres com história familiar de câncer de mama relataram 18% (22/121) de mutações deletérias em *BRCA1*. Outros estudos mostraram uma baixa frequência de mutação em famílias que apresentavam em sua história familiar apenas câncer de mama (ZELADA-HEDMAN et al., 1997, COUCH et al. 1997, SANTAROSA et al., 1998).

Em estudos onde foi avaliada a prevalência de mutações no gene *BRCA1* em mulheres com câncer de mama em idade precoce (<45 anos), foi

observada uma variação em relação à idade e à população analisada (PETO et al., 1999 e SOUTHEY et al., 1999). Southey e colaboradores em 1999, estimaram uma prevalência de 3,8% de mutações em *BRCA1* quando avaliaram mulheres australianas com câncer de mama com idade inferior aos 40 anos e sem história familiar. Em comparação, Peto e colaboradores em 1999 encontraram uma prevalência de 1,9% de mutações no gene *BRCA1*, quando analisaram 363 mulheres inglesas com câncer de mama na faixa etária de 36 a 45 anos. Estes mesmos autores estimaram uma prevalência de 3,5% de mutações em *BRCA1* quando analisaram mulheres com câncer de mama com idade inferior a 36 anos.

1.2.2.2. Frequência alélica em diferentes populações

Em algumas populações observa-se o efeito fundador para determinados alelos de *BRCA1* e *BRCA2* que resultam em grande variação nas frequências de mutações nestes genes em diferentes populações. Enquanto na Rússia 79% de famílias com história familiar para o câncer de mama que apresentam mutações em *BRCA1*, esta frequência é significativamente menor nas populações da Inglaterra, França e Hungria (20 a 25%); e ainda menor na Holanda, Bélgica, Noruega e Japão (15%). Na Itália, as mutações encontradas em baixa frequência (8%) são únicas, ou seja, não foram encontradas em outras regiões (DE Benedetti et al. 1996). Em populações do novo mundo, como Estados Unidos e Canadá, o risco é intermediário (40%) (SZABO e KING, 1997).

O "efeito fundador" foi primeiramente observado em relação ao grupo ancestral dos Judeus Ashkenazi. Struewing e colaboradores (1995) estudaram um grupo de 858 famílias com história familiar de câncer de mama e/ou ovário e 815 indivíduos não selecionados por origem étnica e encontraram o alelo 185delAG com uma frequência de 1% nas mulheres pertencentes ao grupo ancestral dos Judeus Ashkenazi. Outro alelo (5382insC) também pertencente ao grupo anteriormente citado, é também muito freqüente na Rússia e Hungria. Esta associação é provavelmente originada da migração da área do Báltico comum a estas regiões da Europa. Na Rússia o alelo 4153delA é muito freqüente e restrito à esta região (revisado em SZABO e KING, 1997). Na população dos Judeus Ashkenazi, as duas mutações supracitadas no gene *BRCA1* juntamente com outra mutação no gene *BRCA2* (6174delT) estão presentes em uma frequência de 2,5% nesta população (STRUEWING et.al. 1997). Na Islândia o alelo 999del5 de *BRCA2* está presente em quase 50% das famílias com síndrome HBCO. Muitas mutações européias têm sido observadas nos Estados Unidos e Canadá devido à migração destas populações para estes países. A natureza das mutações de populações africanas começa a ser identificada pela análise de uma combinação de famílias africanas, européias e americanas (revisado em SZABO e KING, 1997). Em 22 famílias afro-americanas e afro-francesas foram identificadas 8 novas mutações em *BRCA1*, sendo que três destas foram encontradas em mais de uma família e em nenhuma outra família pertencente à outra localização geográfica (GAO et al., 1997 e MEFFORD et al. 1999). Mutações em *BRCA1* e *BRCA2* encontradas no

Japão são únicas e em sua maioria do tipo "missense" (MATSUSHIMA et al., 1995 e Katagiri et al., 1996). Na figura 3 está ilustrada a distribuição de algumas mutações muito freqüentes em determinadas populações, ou seja, devido ao "efeito fundador" estas mutações estão distribuídas em grupos geograficamente bem definidos e específicos.

A formação da população Brasileira tem como base as populações Européias, Africanas e Ameríndias com uma variação da contribuição destes grupos pelas diferentes regiões do Brasil, ou seja, a região Norte tem uma maior contribuição na sua formação do grupo étnico Ameríndio (39%) do que a população da região Nordeste (13%) (revisado por SALZANO, 1997). Os Europeus aqui chegaram em 1500, primeiramente os Portugueses e posteriormente os Italianos, Espanhóis e Alemães. A chegada dos Africanos ocorreu mais tardiamente durante o período colonial (RIBEIRO, et al., 1997). No Brasil ainda não foi estabelecido um padrão de mutação para *BRCA1* e *BRCA2* como já existe para a Europa, Estados Unidos e Canadá. E devido à grande miscigenação em nosso país e à contribuição de diferentes grupos étnicos em regiões distintas torna-se importante conhecer o perfil destas mutações em cada região.

1.2.2.3. Polimorfismo e variantes de sequência

Durocher e colaboradores em 1996 avaliaram 19 variantes presentes em uma população controle (Utah, USA). Destas, 10 foram caracterizadas como

variantes polimórficas (Q356R, L871P, E1038G, S1613G, 2201C/T, 2430T/C, 4427C/T, 4209-141C/A e 5272+66A/G), 4 como variantes raras (710C→T, D693N, R841W e S1040N) e 4 como mutações “missense” (M1008I, E1219D, R1347G, T1561I e M1628V). Os autores consideraram mutações “missense” apenas quando a variante identificada encontrava-se na população afetada com câncer de mama e não na população normal. O alelo polimórfico L871P foi o único encontrado com uma frequência estatisticamente diferente entre as duas populações analisadas (população controle e famílias com história familiar para o câncer de mama). Dunning e colaboradores em 1997 avaliando 4 polimorfismos (Gln356Arg, Pro871Leu, Glu1038Gly e Ser1613Gly) na população Inglesa verificou que o alelo homozigoto Arg356 (Gln356Arg) apresentou uma frequência significativamente maior na população normal ($p=0,01$) sugerindo que este alelo conferiria uma proteção ao câncer de mama. Janezic e colaboradores (1999) associou este alelo a famílias com história familiar de câncer de ovário. Além disso, o resíduo 356 não é conservado evolutivamente entre camundongos e humanos (BENNETT et al., 1995), mas localiza-se em um domínio funcional de *BRCA1* recentemente descrito (resíduos 224-500) e responsável pela interação de *BRCA1* e *TP53* (ZHANG et al., 1998).

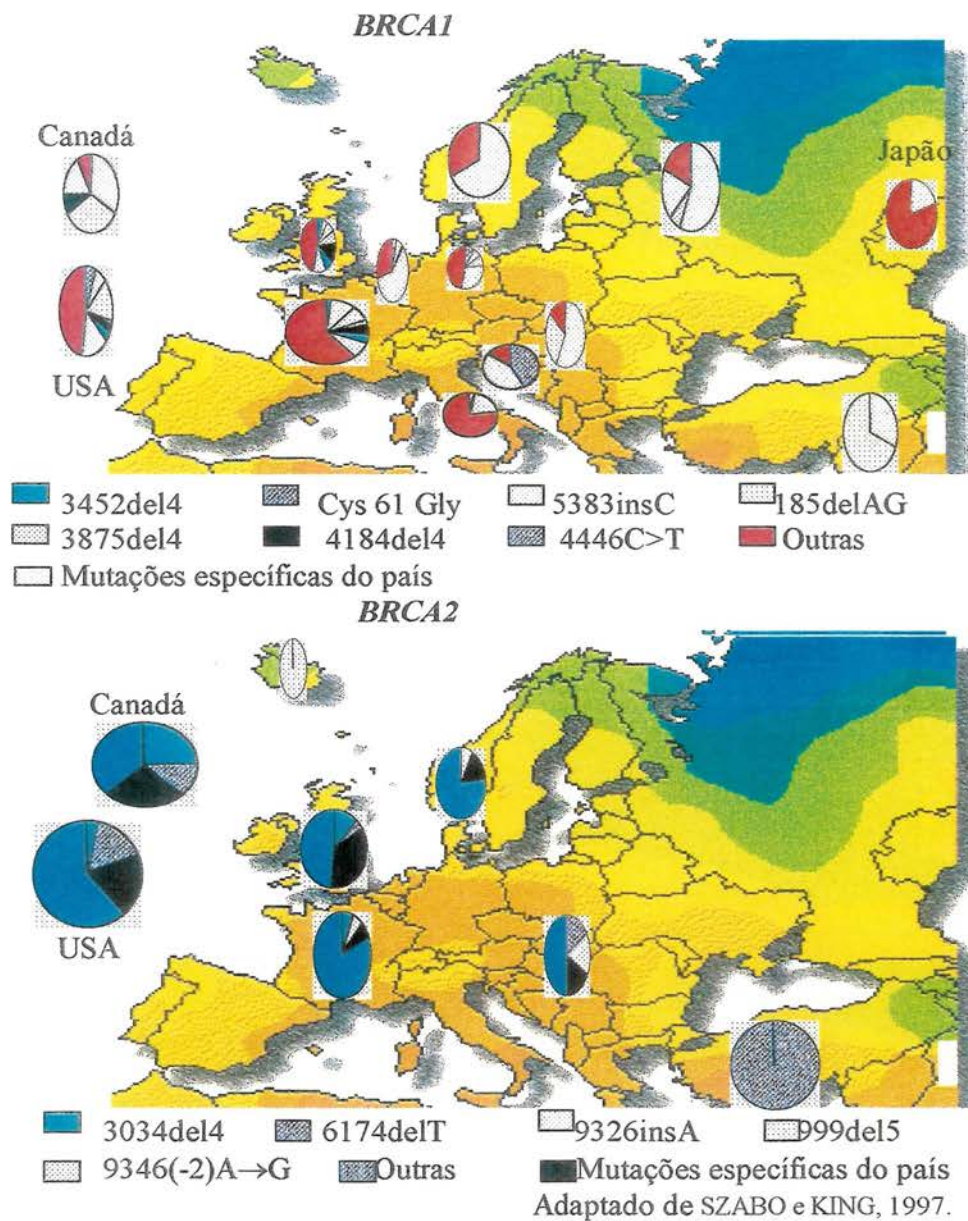


Figura 03: Distribuição em determinadas populações de alguns alelos mutados para os genes *BRCA1* e *BRCA2*.

1.2.2.4. Aspectos Estruturais e Funcionais de *BRCA1*

A figura 4 representa um desenho esquemático do gene *BRCA1* e seus principais domínios funcionais e as proteínas associadas a estes domínios.

A proteína *BRCA1* não apresenta homologia com nenhuma outra proteína humana conhecida. Entretanto foi descrito um domínio de "ring zinc-finger" na região amino terminal da proteína, o que poderia indicar uma suposta função de ativação transcricional de outros genes, para *BRCA1*. Além disso, na extremidade carboxi terminal desta proteína, foram encontradas duas repetições (MIKI et.al,1994). Este domínio foi denominado BRCT (*BRCA1* Repeats Carboxi-Terminal), e que aparece em muitas proteínas envolvidas no "checkpoint" do ciclo celular, como por exemplo a proteína 1 ligante de *TP53* (*P53BP1*), proteínas da família do gene *RB* e proteínas relacionadas ao sistema de reparo de DNA (*XRCC1*) (KOONIM et.al.,1996, e OUCHI et al., 1998).

BRCA1 é uma fosfoproteína nuclear de 220kD que possui dois domínios NLS ("Nuclear Localization Signal") localizados no exon 11, essenciais para sua internalização e permanência no núcleo. Ainda no exon 11, encontra-se um domínio de Granina que apesar de ser um domínio característico de proteínas secretadas, não se observou *BRCA1* sendo secretada (WILSON et.al.,1997).

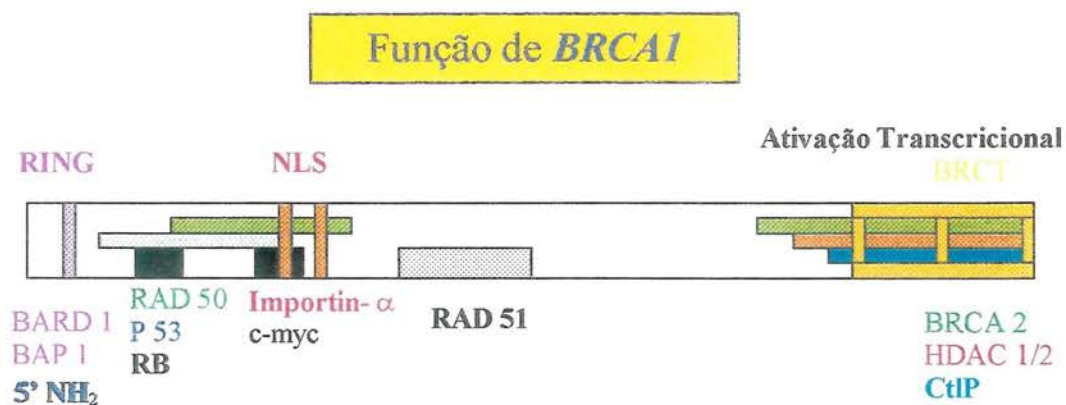
O papel do domínio "ring zinc finger" ainda não foi esclarecido, mas observou-se uma proteína ligadora de *BRCA1* neste domínio, denominada *BARD1* e descrita primeiramente pela coprecipitação com *BRCA1*. Curiosamente, *BARD1* também apresenta um domínio de "zinc finger" amino

terminal e uma região de repetição BRCT carboxi terminal, sendo estas as únicas homologias encontradas em relação a *BRCA1*. O gene *BRCA1* associada com RAD51, BARD1 parecem colaborar com o complexo protéico de reparo de DNA (WU et.al., 1996).

Outros importantes domínios também localizados no exon 11 são: os resíduos 758 a 1064 capazes de formar complexos com Rad51, uma molécula do sistema de reparo de quebras cromossômicas do DNA e o da intermediação na ligação dos fragmentos recombinados por eventos de crossing-over na meiose, o domínio que corresponde aos aminoácidos 329 a 435 denominado B63. A fosforilação deste domínio é essencial para o desempenho da função supressora. Estes resíduos não são autofosforilados, sendo necessária a presença de uma nova quinase que coimunoprecipita com *BRCA1*, para que ocorra sua fosforilação (BURJE et.al., 1998).

Recentemente se observou *BRCA1* coimunoprecipitando com TP53 *in vivo* e *in vitro*. A proteína *BRCA1* interage através dos domínios BRCT, com TP53 na formação de complexos de transativação que induzem o aumento da expressão de vários genes reconhecidamente regulados por *TP53*, como por exemplo *p21* celular (OUCHI et.al., 1998 e ZANG et al. 1998). Em células mutantes para *TP53* (SW480), *BRCA1* parece ser capaz, de induzir a expressão de *p21* e portanto garantir, a parada do ciclo celular (SOMASUNDARAM et al., 1997).

Todas os clones para a obtenção de um camundongo "knockout" que inativaram os exons codificadores o "rinc zinc finger" foram letais, reforçando a idéia de que os exons 2, 3, 5 e 6 são cruciais para o funcionamento da proteína (HAKEM et al., 1997). Inserções que inativaram o exon 11 mostraram uma variação fenotípica maior no desenvolvimento embrionário, postergando a letalidade, dependendo da região do exon onde o inserto recombina (GOWEN et al., 1996). As blástulas de embriões *BRCA1* ^{-/-} foram incapazes de organizar-se morfológicamente de modo a formar a linha primitiva que garante a sustentação para os eventos de movimentação celular da gastrulação. Assim os mutantes *BRCA1* ^{-/-} em geral, não gastrulam (LIU et al., 1996). O considerável aumento nos níveis de expressão de P21 nesses embriões está condizente com a parada do ciclo celular em G1 e a posterior morte do embrião. Em concordância com esse aumento, os níveis de ciclina E estão diminuídas. A incapacidade de iniciar a síntese de DNA necessária para sair de interfase foi comprovada pela baixa incorporação de BrdU. Esses três fatores juntos (aumento de p21, variação de ciclinas e diminuição de síntese de DNA) levariam à diminuição da velocidade do ciclo celular com conseqüências na proliferação (HAKEM et al., 1996).



Adaptado de Welch et al, 2000.

Figura 04: Principais domínios funcionais de *BRCA1*.

1.2.3. Síndrome de Li-Fraumeni

A síndrome Li-Fraumeni é uma doença familiar rara autossômica dominante, identificada por Fred Li e F. Fraumeni Jr (1969), predispondo à uma variedade de tumores tais como sarcomas, tumores cerebrais, leucemias e câncer de mama. Menos de 1% dos tumores de mama na população em geral (<40 anos) estão associados a mutações na linhagem germinativa em *TP53*. Mutações na linhagem germinativa de um alelo do gene *TP53*, localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13), aumenta 25 vezes a chance do desenvolvimento de câncer antes dos 50 anos (revisado por EVANS e LOZANO 1997). A proteína P53 foi descoberta em 1979 complexada ao antígeno "large T" de SV40 em células de roedores transformadas com o vírus SV40 (Símian Vírus 40) (LANE e CRAWFORD, 1979; LINZER e LEVINE, 1979). Sabe-se que *TP53* não é essencial para a proliferação e diferenciação celular, mas sim para a manutenção da integridade celular e correção dos

defeitos genéticos acumulados durante proliferação. Além disso, exposição freqüente à radiação solar, radicais livres e carcinógenos químicos aumentam as chances de danos ao DNA. A presença dessas alterações no DNA estimula a produção da proteína *TP53* nuclear que induz a produção de duas outras proteínas, a p21 e a GADD45 (LI et al., 1994; SMITH et al., 1994), entre outras. A GADD45 interage com PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular), o qual é um importante co-fator da síntese replicativa do DNA. A p21, por sua vez, inibe a atividade das enzimas quinases dependentes de ciclinas, que atuam no ciclo celular (XIONG et al., 1993). Desta maneira, a ativação de *TP53* por danos causados ao DNA provoca uma desaceleração na proliferação celular e no reparo do DNA, até que a restauração de toda a integridade do DNA permita que a proliferação ocorra sem prejuízos para as gerações de células futuras. Posteriormente foi demonstrado que *TP53* ativa uma via de apoptose em resposta a danos no DNA causados por agentes quimioterápicos ou por radiação, sugerindo que tumores apresentando mutações neste gene supressor seriam resistentes à radioterapia (HOLLSTEN, et al., 1991).

Os exons a 2 a 11 de *TP53* codificam para a fosfoproteína de 393 aminoácidos, a qual controla a expressão de genes importantes para o reparo de DNA, divisão celular e morte celular por apoptose (LEVINE et al., 1991). A maioria dos investigadores têm confinado as análises das mutações aos exons 5-8 (códon 126-306). Destas, 95% das mutações publicadas têm sido encontradas entre os exons 5-8 e seus introns correspondentes. Os dados da

literatura indicam que mutações em *TP53* são raras entre pacientes com câncer de mama em geral, mas uma frequência baixa de mutações é observada em pacientes jovens diagnosticados com câncer ou com história familiar de câncer em idade precoce, incluindo carcinoma de mama (STRATTON, 1996). No total, mutações em *TP53* na linhagem germinativa estão associadas a uma pequena parcela (<1%) dos casos de câncer de mama em idade precoce.

Alguns autores têm demonstrado que a análise do gene *TP53* pode ser utilizada como fator prognóstico em pacientes com câncer de mama esporádico. O *TP53* mutado foi detectado em até 50% dos tumores esporádicos de mama. Em um estudo avaliando 316 pacientes com câncer de mama esporádico em relação ao status de *TP53* mostrou relação com prognóstico e com a resposta à terapia adjuvante, sendo que mutações nos domínios conservados II e V estavam associados com pior prognóstico. Além disso, tumores linfonodo-positivos com mutação no gene *TP53* apresentavam uma pior resposta à radioterapia associada à terapia adjuvante com tamoxifeno quando comparados com os tumores com *TP53* normal (BERGH, et al., 1995). Mutações nos domínios de ligação a zinco L2 (códon 163 a 195) e L3 (códon 236 a 251) da proteína *TP53* estão associados a resistência a doxorrubicina (AAS, et al., 1996).

1.2.4. Metodologias de estudo de famílias de alto risco para câncer de mama

A análise das famílias de risco para o câncer de mama utilizava inicialmente a técnica do polimorfismo conformacional de cadeia simples (SSCP) (CASTILLA et al., 1994; SIMARD et al., 1994; FRIEDMAN et al., 1994; JOHANSSON et al., 1996). Mais de 86% das mutações descritas em *BRCA1* resultam em proteínas truncadas favorecendo a utilização do Teste da Proteína Truncada (PTT). Nesta análise pode-se utilizar como molde DNA genômico para amplificação do exon 11, que compreende 61% da região codificadora do gene, ou RNA amplificando toda a sequência gênica através de uma RT-PCR (HOGERVORST et al., 1995; COUCH et al., 1997). Alguns autores têm observado a ocorrência de resultados falso-negativos quando se utiliza como molde o cDNA, devido à variação da meia vida dos RNAs que apresentam o "stop codon" no início do gene e por isso são menores (BATEMAN, et al, 1999). A combinação destas duas técnicas foi muito utilizada por alguns autores, utilizando o PTT para a análise do exon 11 e o SSCP para a análise dos demais exons (MONTAGNA et al., 1996; PETRIJ-BOSCH et al., 1997 e VEHMANER et al., 1997). Na busca de metodologias cada vez mais sensíveis e pelo fato da sensibilidade do SSCP variar entre laboratórios, outras metodologias foram sugeridas, como o CDGE ("Constant Denaturant Gel Electrophoresis") e o DGGE ("denaturing gradient gel electrophoresis"; SHEFFIELD et al., 1989). A técnica de hibridização alelo-específico (ASO ou

ASP) tem sido utilizada na análise de mutações altamente freqüentes devido ao efeito fundador como no caso dos Judeus Ashkenazi. Em um estudo de 50 famílias, utilizando-se a técnica CDGE, foram detectadas diferentes deleções e inserções em mais de 40% (4/10) das amostras previamente negativas após a análise por SSCP (Andersen et al., 1998). A técnica de sequenciamento direto (DS) está sendo amplamente utilizada, e é considerado o método mais sensível para detecção de mutações (Ford et al., 1998 e Frank et al., 1998).

2. DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma das principais causas de morte em mulheres em países ocidentais. As estatísticas indicam um aumento da frequência desta mortalidade tanto nos países desenvolvidos quanto nos em desenvolvimento. O câncer de mama é provavelmente o mais temido pelas mulheres devido a sua alta frequência e sobretudo pelos efeitos psicológicos que afetam a percepção da sexualidade e a própria imagem pessoal.

De 5 a 10% dos cânceres de mama são hereditários. A detecção precoce deste grupo de alto risco é um fator importante para a prevenção e o tratamento do câncer de mama. Atualmente, existem programas de aconselhamento genético com finalidade de identificar estes indivíduos que apresentam história familiar de câncer de mama e/ou ovário. Dois genes estão principalmente associados a esta predisposição, *BRCA1* e *BRCA2*, e a identificação de indivíduos portadores de mutações deletérias nestes genes pode auxiliar na prevenção e tratamento da doença. A penetrância em *BRCA1* estabelecida pelos estudos de análise de ligação foi de 80%. Em trabalhos onde avaliaram mulheres Judaicas Ashkenazi portadoras de mutação verificaram uma penetrância que varia entre 40 a 60% nos diferentes estudos. Estas diferenças se devem não somente a um padrão de mutações em supressores de tumor associados aos câncer de mama, mas também a

modificadores genéticos e ambientais (EMERY et al., 2000). Ainda hoje as vantagens dos testes genéticos são parciais, principalmente no que se refere à relação custo benefício. No futuro a identificação de modificações genéticas específicas poderá ser aplicada em diagnósticos cada vez mais precoces e em prognósticos diferenciados. Devido à heterogeneidade no risco de desenvolver o câncer entre as famílias, a compreensão destes mecanismos moleculares que envolve estas neoplasias, pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias que interfiram na história natural da doença em favor do paciente.

Neste trabalho temos como objetivo identificar e caracterizar as mutações em *BRCA1* na linhagem germinativa de famílias brasileiras que apresentem história familiar para o câncer de mama e assim contribuir para a compreensão do câncer de mama familiar em nossa população. Discutiremos abaixo alguns aspectos relevantes em nosso estudo como as metodologias disponíveis para a triagem destes genes, o significado dos diferentes tipos de mutações encontradas, o perfil das famílias analisadas, os testes genéticos e o comportamento de alguns polimorfismos em populações diferentes.

2.1. Metodologias utilizadas

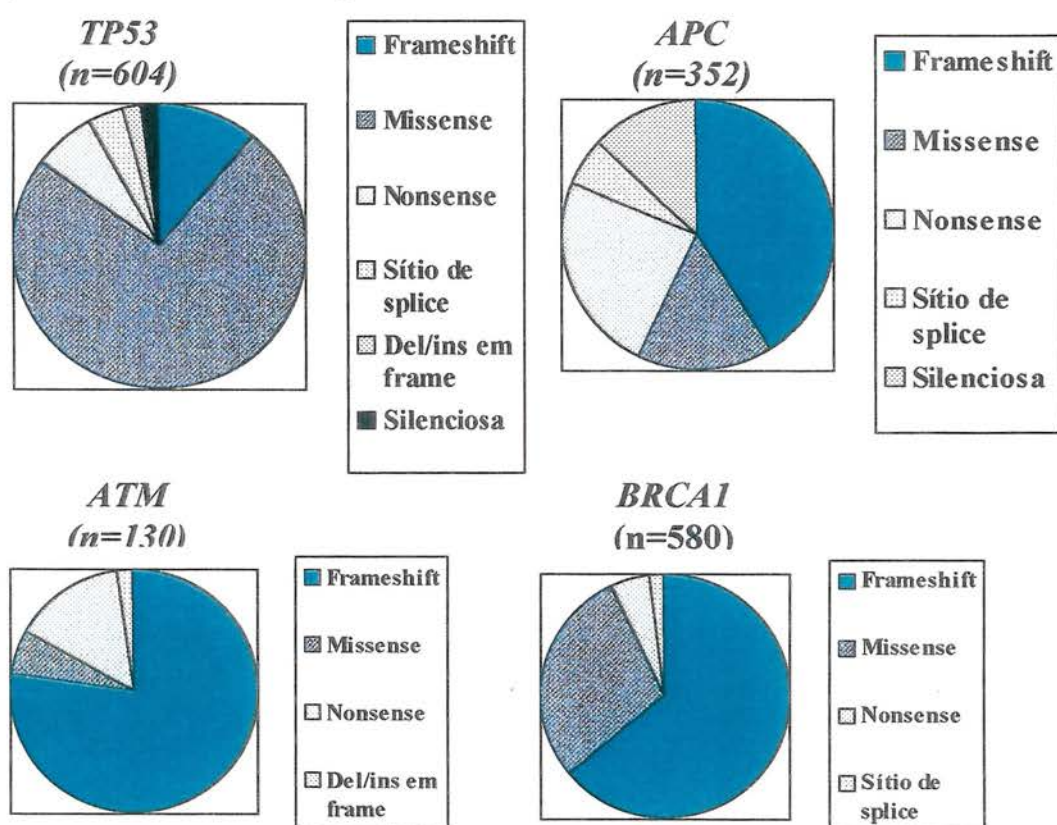
Muitas técnicas têm sido utilizadas na análise de mutações no gene *BRCA1*, sendo que nenhuma delas é definitiva, e todas apresentam vantagens e desvantagens. Na escolha da técnica a ser utilizada, deve-se levar em consideração alguns aspectos ligados às características do estudo a ser

desenvolvido como: 1- o material a ser utilizado (DNA genômico ou cDNA), 2- a natureza das mutações a serem analisadas (mutações população-específicas), 3- a estrutura laboratorial, 4- a sensibilidade da técnica e relação custo benefício.

As técnicas mais utilizadas são: Hibridização Alelo Específico (ASO ou ASP), na análise de mutações específicas altamente freqüentes em determinadas populações como no caso dos Judeus Ashkenazi, "Conformational Sensitive Gel Electrophoresis" (CSGE), "Constant Denaturing Gradient Gel Electrophoresis" (CDGE), "Single Strand Conformation Polymorphism Analysis" (SSCP), "Heteroduplex analysis (HA)" e "Direct Sequencing" (DS) que são utilizadas na detecção de mutações de ponto, como alterações em um nucleotídeo, pequenas deleções e inserções. Quando estas técnicas são utilizadas sozinhas é necessário em torno de 40 reações de PCR para a análise de todo gene *BRCA1*. Algumas destas técnicas são utilizadas em conjunto, aumentando a sensibilidade. A técnica do SSCP é muito simples e de baixo custo, mas sua sensibilidade varia muito entre laboratórios (60% a 80% de detecção das mutações). O seqüenciamento direto (DS) é considerado a técnica mais sensível, apesar de ter um alto custo (FORD et al., 1998 e FRANK et al., 1998).

Outra técnica bastante utilizada é "Protein Truncation Test (PTT)"; nesta técnica se detecta com alta sensibilidade mutações que levam à formação de códon de terminação precoce, portanto uma proteína alterada, nos permitindo estabelecer a associação direta entre doença e mutação. A utilização desta

técnica também é favorecida pelo fato de 86% das mutações descritas no banco de dados do BIC para *BRCA1* são proteínas truncadas. Devido a isto, Tang e colaboradores sugerem a utilização da técnica do PTT em uma primeira seleção de mutações em *BRCA1*, o que se poderia estender somente para genes supressores de tumores que tenham a distribuição das mutações concentradas em proteínas truncadas, já que a distribuição dos tipos de mutações diferem entre os diferentes genes supressores de tumor como podemos observar na figura 05.



Adaptado de HUSSAIN e HARRIS, 1998.

Figura 05: Tipos de mutações em *TP53*, *APC*, *BRCA1* e *ATM*.

A combinação das técnicas do SSCP, HA e do PTT, também utilizada por vários autores (MONTAGNA et al., 1996; PETRIJ-BOSCH et al., 1997 e VEHMANER et al., 1997), foi eleita para o nosso estudo; primeiro devido à estrutura do gene *BRCA1* composto por 22 exons pequenos e o exon 11, que compreende um terço do gene. Este exon foi analisado pelo PTT que permitiu reduzir à metade o número de reações de PCRs necessárias para a análise de *BRCA1*. Esta técnica também permite um aumento de sensibilidade na detecção de mutações que levam a formação de uma proteína truncada. Os outros exons possuem tamanhos que variam entre 200 a 400 pb favorecendo a análise pelas técnicas do SSCP e HA. Para a caracterização das alterações encontradas na análise por SSCP, HA e PTT, foi feito o seqüenciamento direto nos dois sentidos do gene (forward e reverse). Todos os iniciadores desenhados para os exons analisados por SSCP flanqueiam as regiões codificadoras, sendo assim analisados os sítios convencionais de "splicing". Posteriormente com a aquisição do seqüenciador automático ABI PRISMTM377 foi padronizada a análise de todos exons (exceto o 11) pelo seqüenciamento direto do produto de PCR; nesta análise foi possível utilizar a maioria dos iniciadores desenhados para as técnicas de SSCP e HA.

2.2. Mutações e seu significado

Estudos funcionais sobre *BRCA1* e *BRCA2* demostram sua participação no reparo de DNA, recombinação homóloga, proliferação no embrião e

regulação transcricional. O gene *BRCA1* também participa no processo de ubiquitinação de algumas proteínas (WESCSH et al., 2000). Os domínios responsáveis pelas funções mencionadas acima já estão determinados na estrutura de *BRCA1* e *BRCA2*. Isto é de vital importância para o entendimento do papel destes genes na tumorigênese mamária e ovariana, possibilitando compreender melhor a função de mutações “missense” segregando em indivíduos afetados em famílias de alto risco. Mutações “missense” que rompem o domínio do “ring zinc finger” como Cys61Gly e Cys64Gly, estão associadas à perda de função supressora de tumor destes genes. Outras mutações “missense” que não se encontram em domínios com o “ring zinc finger” e repetições “BRCT”, permanecem não esclarecidas.

Alguns autores também correlacionam a localização da mutação na estrutura do gene com a incidência de câncer de ovário na família, ou seja, mutações na região mais 5' estão associadas mais frequentemente ao desenvolvimento do câncer de ovário (GAYTHER et al., 1995, STRATTON e WOOSTER, 1996). Este fato não foi observado em alguns estudos (SHATTUCK-EIDEN, 1997). Em nossa amostragem somente uma família apresentava um caso de câncer de ovário em sua história, na qual não encontramos mutação. Além disto, a baixa frequência de mutações encontradas em *BRCA1*, impossibilitou a correlação fenótipo versus genótipo. O câncer de ovário está associado a *BRCA2* em uma menor frequência que *BRCA1*. Roth e colaboradores em 1998 estabeleceram uma região do gene *BRCA2* associada à presença de câncer de ovário na família. Mutações que levam a truncagem de

proteína próximo à região da glicina 2901 de *BRCA2* e mutações “missense” nesta glicina estão associadas ao câncer de ovário familiar. Enquanto não dispomos de testes funcionais que esclareçam o papel de mutações “missense” em *BRCA1* e *BRCA2*, alguns pontos podem auxiliar na associação da doença com a mutação, como a frequência da mutação em relação a uma população controle e a localização da mutação em domínios importantes para a função supressora de tumor do gene. Foi a postura que adotamos para a variante rara V1534M que encontramos na família 129. Apesar de nesta família a mutação em *TP53* encontrada estar diretamente associada à predisposição genética, não podemos desconsiderar a importância da mutação “missense” encontrada em *BRCA1*. Principalmente porque estes dois genes interagem em uma mesma via no controle da proliferação celular. Mais adiante discutiremos esta família com mais detalhes.

Observações das diferenças entre os tumores hereditários e esporádicos podem ser úteis na compreensão dos mecanismos específicos de tumorigênese de cada um deles. Diferenças como uma maior frequência de mutações em *TP53* e ausência de receptores de estrógeno negativo nos tumores associados a mutações em genes *BRCA* podem levar a um prognóstico e terapêutica diferenciada. Alguns autores sugerem a quimioprevenção para portadores de mutação em *BRCA1* além de tratamento preventivo como por exemplo o uso do tamoxifen. Tumores de mama *BRCA1* positivos apresentam um quadro histológico diferente dos tumores esporádicos, eles apresentam maiores contagens mitóticas ($p=0,001$), uma maior proporção de tumores invasivos

($p < 0,001$) e maior infiltração linfocítica ($p = 0,002$) em relação aos tumores esporádicos (LAKHANI et al. 1998).

Os fenótipos histológicos de câncer de mama em portadores de mutações possuem características intrínsecas fundamentais que podem melhorar a classificação do câncer de mama em indivíduos com forte história familiar e mutação em *BRCA1* não definida, podendo assim ajudar no acompanhamento clínico das pacientes (LAKHANI et al. 1998). Para portadores de mutação em *BRCA1*, além de medidas rigorosas de prevenção, alguns centros sugerem cirurgia profilática (mastectomia e ooforectomia) para os indivíduos comprovadamente portadores de mutação em *BRCA1* e *BRCA2* (HUGHES et al., 1999 e BERCHUCK, et al., 1999). Este tipo de abordagem deve ser visto com cuidado, já que fatores culturais e sociais devem ser considerados. E dentro destas perspectivas é de grande importância um apoio multidisciplinar de aconselhamento genético, no pré e pós-teste.

2.3. Famílias

Famílias que contém em sua história somente câncer de mama apresentam 45% de mutações em *BRCA1* e quando estas famílias apresentam além do câncer de mama, o câncer de ovário em sua história familiar a frequência de mutações em *BRCA1* é de 80%. Estas frequências foram estabelecidas em estudos de análise de ligação, onde as famílias apresentavam numerosos casos e a segregação do locus gênico associado à

BRCA1 era previamente estabelecido (HALL et al, 1990; NEWMAM et al., 1988; EASTON et al., 1993; FORD et al., 1994).

Em mulheres que tiveram câncer de mama antes dos 45 anos e não apresentam história familiar de risco verificou-se uma frequência menor de mutações no gene *BRCA1* (1,9% a 3,8%) (COUCH et al., 1997 e MALONE et al, 1998, SOUTHEY et al., 1999 e PETO et al., 1999). A associação do câncer de mama à *BRCA1* torna-se mais forte quando a família apresenta pelo menos um caso de câncer de ovário (COUCH et al., 1997 e FORD et al., 1998). A probabilidade calculada, por estes autores, para detecção de mutação em *BRCA1* em famílias com câncer de mama diagnosticado dos 40 aos 44 anos varia de 7.7% (só câncer mama) a 88,5% (famílias com câncer de mama e ovário e um destes membros apresentando tanto câncer de mama como câncer de ovário) (COUCH et al, 1997). Em nossa amostra, considerando as 29 famílias testadas para *BRCA1*, o índice de detecção de mutação foi de 7,7%, uma frequência baixa quando comparada com as frequências estabelecidas nos estudos de análise de ligação. Esta baixa frequência é consistente com as características da nossa amostra como a ausência de câncer de ovário (somente duas famílias apresentavam um caso de câncer de ovário), a idade de manifestação (50,8 anos) e ausência de famílias pertencentes a grupos ancestrais como dos Judeus Ashkenazi. Em trabalhos recentes onde foram utilizados critérios semelhantes aos nossos, a taxa de mutação encontrada no gene *BRCA1* foi mais baixa. Couch e colaboradores (1997) analisando mulheres em uma clínica de aconselhamento genético detectaram 7% de

mutações em *BRCA1*; Frank e colaboradores (1998) analisando famílias que somente apresentavam câncer de mama encontraram *BRCA1* mutado em 18% (22/121) das amostras.

Existe uma grande variação da taxa de detecção de mutação em *BRCA1* entre os trabalhos. Outros autores estudando famílias que só apresentavam em sua história familiar câncer de mama, a taxa de mutação foi menor variando de 1 a 9% (ZELADA-HEDMAN et al., 1997; COUCH et al., 1997; SANTAROSA et al., 1998), provavelmente devido àqueles fatores já citados anteriormente para a nossa amostra.

Em famílias que apresentam maior número de casos de câncer de ovário ou são pertencentes a grupos ancestrais, que possuem mutações específicas, a porcentagem de detecção de mutações em *BRCA1* aumenta consideravelmente. Isto ocasiona uma grande variação da proporção de famílias de alto risco para câncer de mama e/ou ovário com mutações em *BRCA1* e *BRCA2* entre as diferentes populações (SZABO e KING, 1997). Como exemplo desta diferença observamos que somente duas mutações em *BRCA1* (5382insC e 4153delA) são responsáveis por 79% dos casos de HBOC na população russa (GAYTHER et al., 1997) e em populações dos Judeus Ashkenazi três mutações, duas em *BRCA1* (5382insC e 185delAG) e uma em *BRCA2* (6174delT), são responsáveis por 1% de todos casos de câncer de mama. Recentemente Vieira (1999) analisando o perfil epidemiológico de 91 agrupamentos familiares brasileiros que apresentam câncer de mama e/ou ovário em várias gerações verificou que a mediana de casos de câncer de

mama foi discretamente superior a dois casos por família e 12% das famílias apresentavam casos de casos de mama e ovário. Neste trabalho também foram avaliadas 13 famílias quanto a mutação em *BRCA1*, sendo encontrado uma mutação deletéria e 7 variantes neste gene.

O câncer de mama hereditário está principalmente associado aos genes *BRCA1* e *BRCA2*, mas outros genes estão associados em menor frequência, como o *TP53* e *ATM* e ao câncer de ovário, como a síndrome HNPCC, podem estar alterados.

A família BR77 apresentou história familiar compatível com os novos critérios estabelecidos para síndrome HNPCC, onde outros tumores, que não colorectal, estão associados (PARK et al., 1999 e VASEN et al., 1999). Esta família não apresentou alteração no gene *BRCA1* e em sua história familiar verificou-se câncer do sistema digestivo (estômago) em parentes distantes (terceiro grau) e câncer de mama em parentes de primeiro grau; além de cânceres de mama, ovário e endométrio no probando. Visto isso partimos para análise do *hMHL1* e *hMSH2*, principais genes associados a esta síndrome. Esta análise foi feita através do SSCP de cada exon, já que os iniciadores específicos de cada um estavam disponíveis no laboratório. Não foi encontrada nenhuma mutação nestes genes. Esta família apresenta uma história familiar de alto risco, por isso posteriormente com a identificação de novos genes, ela seria candidata a uma nova avaliação genética.

Na família BR110 foi identificada uma mutação nonsense (E649X) após análise por PTT no gene *BRCA1*; esta mutação ainda não foi descrita em outra

família. A família apresenta quatro casos de câncer de mama, três deles em parentes de primeiro grau. A idade de manifestação da doença é menor que 40 anos, caracterizando assim uma família de alto risco e a associação desta predisposição genética ao câncer de mama ao gene *BRCA1*. A triagem para detecção precoce de câncer de mama e ovário em mulheres portadoras de mutação em *BRCA1* é o maior desafio para validar a utilização de testes genéticos para famílias de risco como a família analisada acima. Recomendações sobre medidas de prevenção têm sido sugeridas para pessoas com teste de predisposição genética positivo (portadores) ou pertencentes a famílias com a suscetibilidade determinada para o câncer de mama que sejam carreadores da mutação. Nas famílias que apresentam uma história familiar de risco para o câncer de mama e ovário e nas quais não foi detectada mutação em *BRCA1*, estas medidas recomendadas para detecção precoce do câncer de mama não estão excluídas, visto que além do gene *BRCA2*, estão sendo identificados outros genes relacionados à predisposição genética ao câncer de mama.

Na análise por SSCP, o exon 15 apresentou-se alterado na fita dupla formando um heteroduplex na amostra BR129, na qual após sequenciamento direto, verificou-se uma substituição de uma G por C, levando à troca de uma valina por uma metionina. Esta mutação pertence a uma família de alto risco que apresenta dois parentes em primeiro grau com câncer de mama e a idade de manifestação depois dos 45 anos. Esta alteração possui quatro relatos no BIC, em famílias com história familiar positiva, sendo determinada como

variante não classificada. O probando, além do câncer de mama, relatou haver tido sarcoma na infância. Visto isto, partimos para a análise de P53 e foi identificada uma inserção de seis nucleotídeos no exon 4 deste gene. A mutação V1534M em *BRCA1* foi detectada na família BR129 segregando em duas irmãs diagnosticadas com câncer de mama e uma irmã jovem assintomática. Esta mutação foi relatada em outras 4 famílias apresentando câncer de mama (BIC database, variante não-classificada). A associação desta mutação com a doença é difícil de ser estabelecida, visto que não temos conhecimento funcional de *BRCA1* suficiente. Para descartar completamente esta associação também não dispomos de dados suficientes, já que este alelo foi observado 4 vezes associado a famílias de história familiar de alto risco. É de consenso para alguns autores a associação de variantes raras à doença. Estes autores estabelecem que o alelo com uma frequência menor que 1/200 seja uma variante rara (FRIEDMAM et al., 1994; DUROCHER et al., 1996; COUCH et al., 1996, DUNNING et al. 1997, KATAGIRI et al., 1998 e JANEZIC, et al., 1999). Analisamos 100 indivíduos caucasianos normais através da técnica do SSCP (figura 06) e este alelo não foi encontrado, considerando este alelo uma variante rara podemos sugerir a associação desta alteração à doença. Toma-se cada vez mais interessante o acompanhamento da irmã assintomática uma vez que a cooperação dos genes *TP53* e *BRCA1* na cascata da tumorigênese já foi verificada por alguns autores (SOMASUNDARAM et al., 1997, OUCHI et.al., 1998 e ZANG et al. 1998).

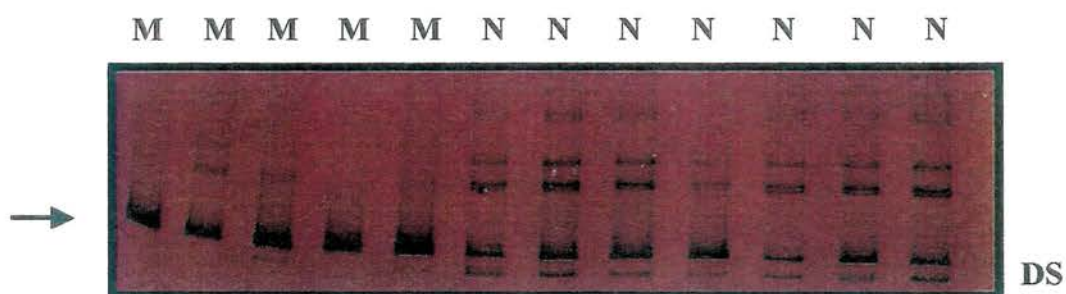


FIGURA 06 : Análise por SSCP do exon 15 amplificado a partir do DNA genômico de indivíduos da família 129 com a mutação V1534M (M) e indivíduos normais (N). Indicado a migração da fita dupla (DS).

A análise do exon 11 do gene *BRCA2* de uma família de alto risco e o probando (homem) afetado para o câncer de mama revelou uma proteína truncada através do PTT. A caracterização do fragmento pelo sequenciamento direto mostrou uma mutação do tipo "frameshift" levando à formação de um códon de parada precoce no aminoácido 2149. Esta mutação não foi descrita anteriormente e em nossa amostragem foi a única que apresentava um caso de câncer de mama masculino (<52 anos), além de 3 casos de câncer de mama em mulheres com parentesco em primeiro grau, caracterizando uma família de alto risco para o câncer de mama e probabilidade alta em encontrar mutação no gene *BRCA2*.

2.4. Testes genéticos

A partir da identificação do genes *BRCA1* e *BRCA2* que predisõem ao câncer de mama e/ou ovário ocorreu uma grande procura pelos testes

genéticos. Para algumas síndromes hereditárias, o teste genético tem um benefício direto, como no caso dos genes *TP53* e *APC*. Mesmo porque estes testes genéticos têm suas limitações que torna mais difícil a interpretação de um teste positivo ou negativo. Um teste negativo somente tem validade quando a mutação na família foi identificada e indivíduos desta mesma família são negativos para a mutação. Não encontrar mutação em *BRCA1* em família de alto risco não exclui estas famílias da alta probabilidade de desenvolver o câncer de mama e/ou ovário. Diante destas questões é difícil estabelecer um critério rígido na realização do teste genético para *BRCA1*. O que se precisa fazer para esclarecer as prioridades para os testes em *BRCA1* e *BRCA2*? Ponder em 1997 já fazia estes questionamentos e em uma resposta curta, “pesquisar”, definiu a necessidade de conhecer melhor estes genes em vários contextos.

Em países onde predominam algumas mutações, como as dos Judeus Ashkenazi, testes genéticos tendo como alvo estas mutações são muito úteis, já que diferenciam uma parcela significativa desta população. E podem ser utilizados em uma triagem populacional.

2.5. Polimorfismos

Encontramos 7 polimorfismos em nossa amostra, sendo 4 deles intrônicos (IVS1+101C>G, IVS8-64delT, IVS16-68 A>G e IVS18+66 G>A) e os outros 3 em exons (Q356R, S1436S e S1613G); estes com uma frequência em

nossa amostra de 0.07, 0.35 e 0.45 respectivamente. O alelo S1613G foi o único que apresentou uma frequência diferente em relação a outros trabalhos ($q=0.31$) (Miki et al. 1994 e Durocher et al. 1996). O alelo Arg (Q356R) foi associado a uma proteção ao câncer de mama ($P=0.01$, Dunning et al. 1997) e ao câncer de ovário (Janezic, et al., 1999). Este alelo também foi verificado em equilíbrio de ligação nas amostras pertencentes ao grupo de risco ao câncer de mama, em contraposição à amostra normal (Durocher et al. 1996 e Dunning et al. 1997), e localiza-se em um domínio funcional de *BRCA1* recentemente descrito (resíduos 224-500) responsável pela interação de *BRCA1* e *TP53* (Zhang et al., 1998). Os polimorfismos genéticos podem estar atuando como modificadores genéticos favorecendo a heterogeneidade no risco do desenvolvimento do câncer de mama em diferentes famílias. Nossa população é composta de grupos de imigrantes europeus, descendentes de escravos africanos e nativos ameríndios, o que torna mais complexa a associação de mutações específicas em genes de predisposição genética ao câncer de mama. Devido a esta heterogeneidade observada em nossa população seria de grande importância o conhecimento da dinâmica da distribuição dos alelos de *BRCA1* e câncer de mama hereditário em nossa população.

ANEXO

MATERIAL e MÉTODOS (Anexo)

1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SSCP)-corado pela Prata:

Para separação eletroforética dos produtos de PCR, 8,0 µl de cada reação foram misturados a 4,0 µl de tampão de amostra (95% formamida, 0,05% xileno cianol, 0,05% azul de bromofenol em EDTA 20mM), aquecidos a 95°C por 5 min e aplicados em gel de poliacrilamida: bisacrilamida (49:1) contendo 5% de glicerol. Posteriormente o gel foi corado pelo nitrato de prata.

2. PCR Alelo específico

Posterior a uma PCR específica de cada exon em análise, foi realizada uma PCR "nested" para cada alelo polimórfico. Os iniciadores específicos de cada alelo polimórfico utilizado na PCR "nested" foram descritos por Janezic e colaboradores (1999). A PCR "nested" consistiu em 1µl da reação de PCR específica que foi amplificado na presença de 20 pmoles do iniciador do alelo polimórfico, 200 µM de cada um dos desoxiribonucleotídeos trifosfatos, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3,(tampão da PCR) e 1,0 U de Taq DNA Polimerase (GibcoBRL) em volume final de 25 µl. A reação de amplificação incluiu só um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 min., seguido por 13 ciclos de amplificação, consistindo de 1 min a 95°C, 1 min na

temperatura de pareamento e 1 min a 72°C, finalizando com 1 ciclo de extensão de 5 min a 72°C em aparelho com ciclos de temperatura automatizada.

3. Digestão pela enzima de restrição AlwN1

Após a PCR específica, utilizando os iniciadores para o exon 11B, 1 µl do produto desta reação foi submetido à digestão pela enzima AlwN1 obedecendo às recomendações do fabricante (Gibco- BRL).

4. Iniciadores para o DS

Para a padronização do sequenciamento direto com o aparelho ABI PRISM™377 DNA Sequencer da Perkin Elmer utilizamos os mesmos iniciadores sintetizados para a análise do SSCP descritos por Friedman e colaboradores (1994), com exceção dos exons 8, 9 e 15 para os quais foram desenhados novos pares de iniciadores, utilizando um programa disponível no endereço eletrônico "<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>". Os iniciadores estão relacionados a seguir: Exon8 forward: aagcacagaactggccaataa; reverse: cacttcccaaagctggcctac. Exon9 reverse: taggaaaataccagcttcataga. Exon15 forward: gctgcccagcaagtatgatt , reverse: ggtaaccagaatatctttatgta .

5. PCR Específica para DS ("Direct Sequencing")

Nas reações de PCR, 50 ng de DNA genômico foram amplificados na presença de 20 pmoles de cada iniciador, 200 µM de cada um dos desoxiribonucleotídeos trifosfatos, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3,(tampão da PCR) e 1,0 U de Taq DNA Polimerase (GibcoBRL) em

volume final de 25 μ l. A reação de amplificação incluiu um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 min., seguido por 35 ciclos de amplificação, consistindo de 1 min a 95°C, 1 min na temperatura de pareamento e 1 min a 72°C, finalizando com 1 ciclo de extensão de 5 min a 72°C em aparelho com ciclos de temperatura automatizada. As temperaturas de pareamento estão descritas na literatura (FRIEDMAN et al., 1994).

Para o exon 15 foi utilizado um programa denominado "Touchdown", o qual consiste de um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 5 min, 3 ciclos de 30 seg. a 95°C para desnaturação, 30 seg. a 72°C para a extensão e uma temperatura de pareamento 12°C acima da temperatura específica diminuindo-se 4°C a cada ciclo até atingir a temperatura específica do iniciador. Posteriormente segue-se 32 ciclos de amplificação consistindo de 30 seg. a 95°C, 30 seg. a 60°C e 30 seg. a 72°C, finalizando com 1 ciclo de extensão de 5 min a 72°C em aparelho com ciclos de temperatura automatizada (DON et al., 1991)

6. DS ("Direct Sequencing")

Após a amplificação do DNA genômico por uma PCR específica, 1 μ l deste produto foi utilizado para a reação de seqüência com o kit ABI PRISM™ Big Dye™ terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit da Perkin Elmer. A reação de sequenciamento inclui um ciclo inicial de desnaturação a 96°C por 5 min., seguido por 25 ciclos de amplificação, consistindo de 30 seg a 96°C, 15 seg a 55°C e 4 min a 60°C em aparelho com ciclos de temperatura

automatizada. O produto foi precipitado utilizando isopropanol 60%, centrifugado por 20 min a 14000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o "pellet" lavado duas vezes com ETOH 70%. O "pellet" seco é ressuspendido em tampão desnaturante (95% formamida, 5% blue dextran), aquecido a 95°C por 3min e o material aplicado em gel de poliacrilamida desnaturante (Long Ranger™ Gel Protocols - FMC®) e utilizando o sequenciador ABI PRISM™377 DNA Sequencer (Perkin Elmer).

RESULTADOS e DISCUSSÃO (Anexo)

Análise das nove novas famílias

Para a padronização do sequenciamento direto foram analisadas 8 famílias adicionais (tabela A1) selecionadas obedecendo aos critérios anteriormente estabelecidos. Seis destas famílias não apresentaram nenhuma alteração para o gene *BRCA1*. Na família 91 foi encontrada uma mutação já relatada na literatura e característica da população dos Judeus Ashkenazi (5385insC) (figura A1). A análise do exon 8 do gene *BRCA1* pela técnica do SSCP da família 87 revelou uma diferença de migração na simples fita e a formação de "heteroduplex" (figura A2-C). Esta alteração foi caracterizada por sequenciamento do produto de PCR clonado em vetor pUC18, revelando uma deleção de "CT" no códon 589 que leva à formação de um códon de terminação precoce no aminoácido 157 (589delCT) (figura A2-B).

História Familiar	Famílias	Mutações encontradas
Pelo menos 2 casos de câncer de mama em parentes de primeiro grau <35 anos	86	-
Pelo menos 2 casos de câncer de mama em parentes de primeiro grau <50 anos	87 91 92 93	<i>BRCA1</i> (589delCT) <i>BRCA1</i> (5385insC) - -
Pelo menos 3 ou mais casos de câncer de mama	88 90	- -
Câncer de mama bilateral	89	-

Tabela A1: Famílias analisadas por Sequenciamento direto e por PTT.

- **Caracterização dos polimorfismos na população controle**

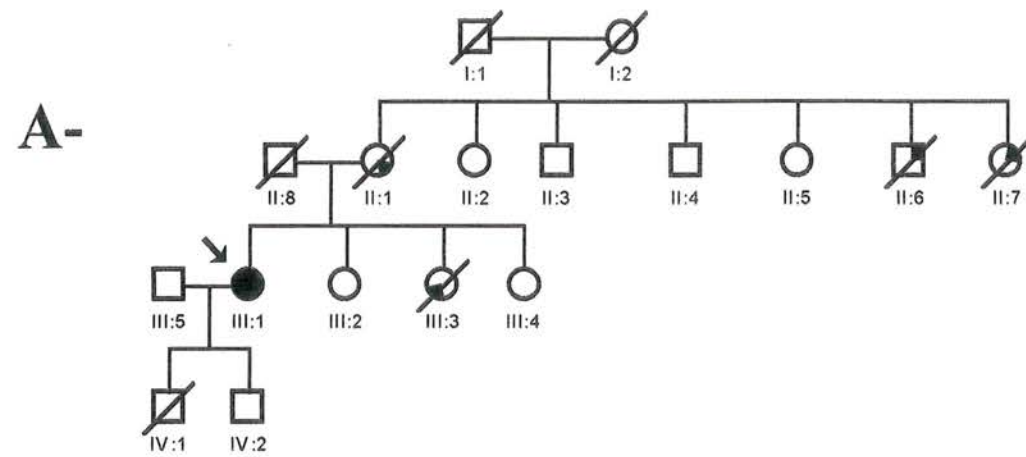
Com a disponibilidade das amostras do banco de DNAs controle (100 indivíduos caucasianos), analisamos a frequência dos polimorfismos encontrados em nossa amostragem de pacientes com história familiar ou pessoal de câncer de mama. Para o polimorfismo Q356R a análise foi realizada utilizando a enzima de restrição AlwN1 que corta o alelo Arg. Nesta análise, 10 indivíduos se mostraram heterozigotos e 86 indivíduos homozigotos para o alelo Arg. Para os polimorfismos S1436S e S1613G foram desenhados iniciadores para os diferentes alelos polimórficos que foram analisados através da PCR

alelo-específico de acordo descrito por Janezic e colaboradores (1999). Para o polimorfismo S1435S encontramos 114 alelos "T" e 86 alelos "C" em análise de 100 indivíduos caucasianos. A análise do polimorfismo S1613G está em andamento. As frequências alélicas serão determinadas na população controle após o término da análise laboratorial.

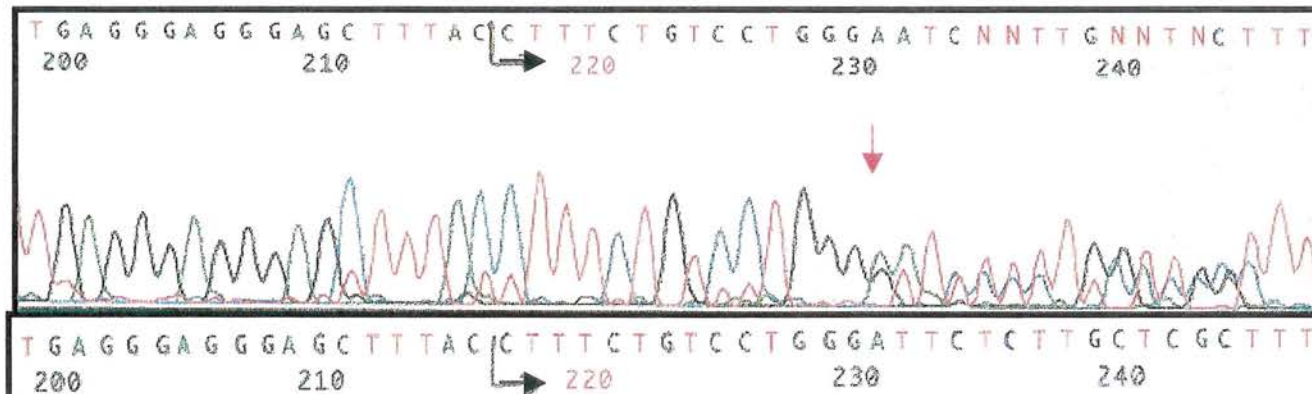
Legendas das figuras do anexo:

Figura A1: Detecção de mutação germinativa em *BRCA.1* (A) Heredrograma da família 91. Círculos escuros indicam indivíduos afetados e linhas verticais a descendência. A seta indica o probando. (B) Análise do probando pelo sequenciamento direto do produto de PCR utilizando iniciador "reverse" do exon 22 de *BRCA1*. (C) Análise de um indivíduo normal pelo sequenciamento direto do produto de PCR utilizando iniciador "reverse" do exon 22 de *BRCA1*.

Figura A2: Detecção de mutação germinativa em *BRCA1*. (A) Heredrograma da família 87. Círculos escuros indicam indivíduos afetados e linhas verticais a descendência. A seta indica o probando. (B) e (C) Sequenciamento do produto clonado em PUC, do exon 08 de *BRCA1*. (B) Alelo mutado. (C) Alelo normal. (D) Análise pelo SSCP do exon 08 de *BRCA1*, indicando pela seta a formação de um heteroduplex na amostra 87.



B-



C-

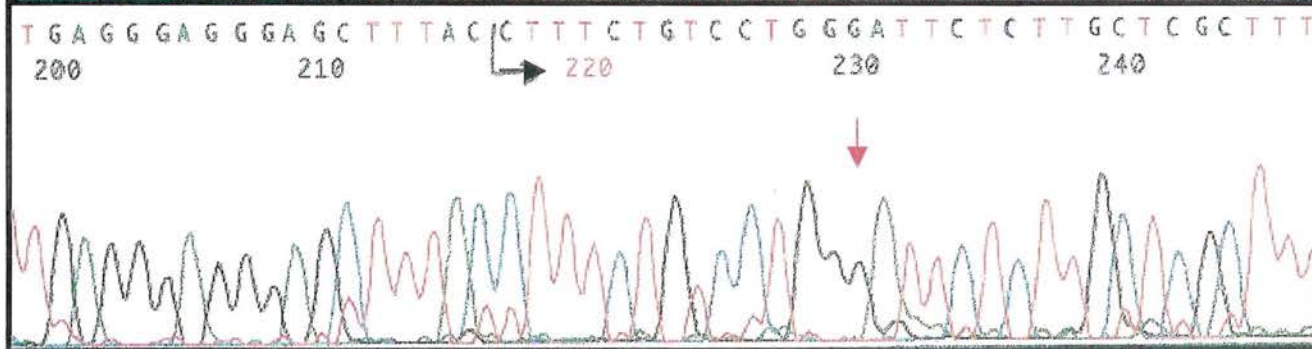
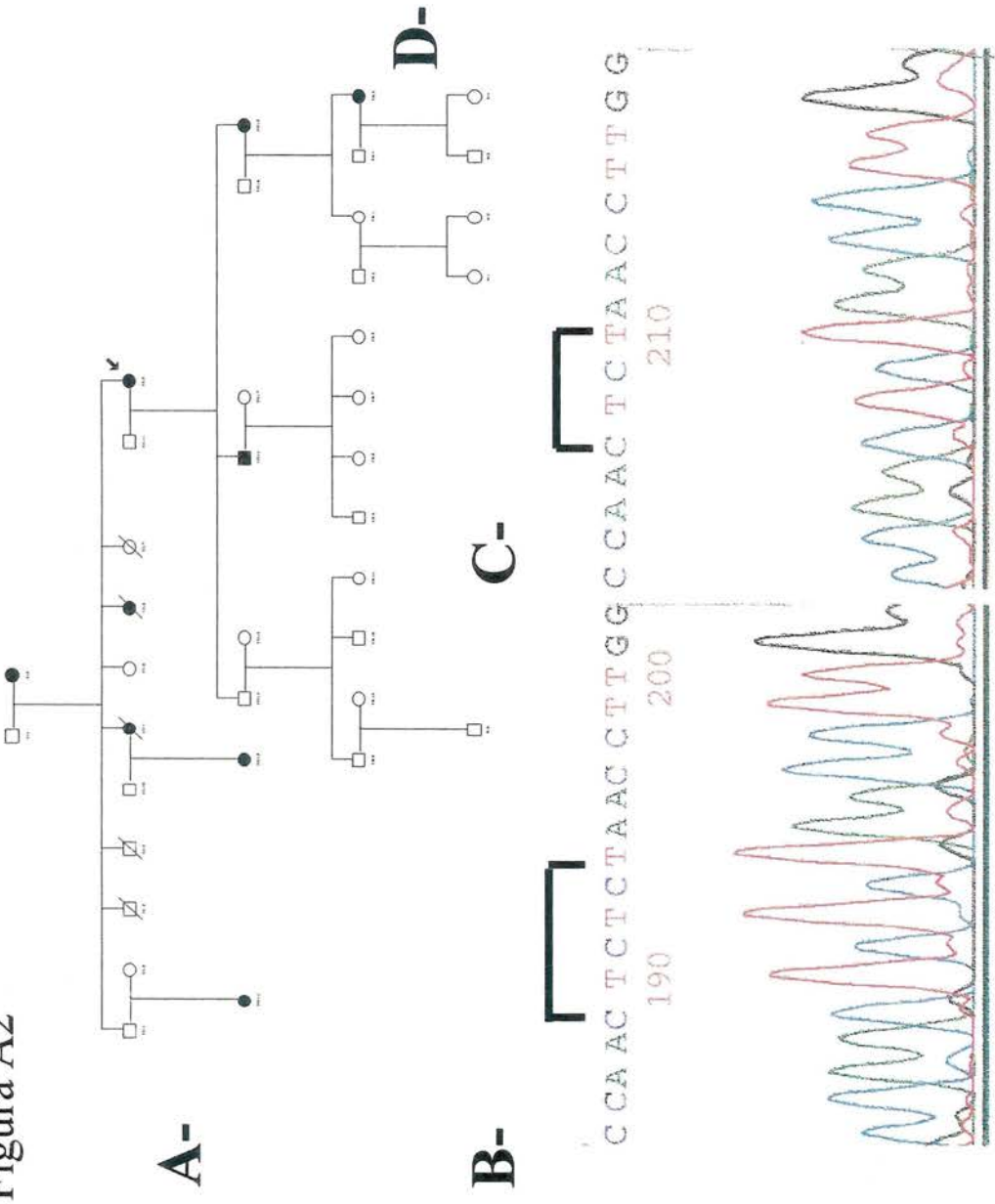


Figura A2



Referências Bibliográficas

Aas T, Borresen AL, Geisler S, Smith-Sorensen B, Johnsen H, Varhaug JE, Akslen LA, Lonning PE. Specific p53 mutations are associated with de novo resistance to Doxorubicin in breast cancer patients. **Nat Med** 1996; 2:811-4.

Aida H, Takakuwa K, Nagata H, Tsuneki I, Takano M, Tsuji S, Takahashi T, Sonoda T, Hatae M, Takahashi K, Hasegawa K, Mizunuma H, Toyoda N, Kamata H, Torii Y, Saito N, Tanaka K, Yakushiji M, Araki T, Tanaka K.. Clinical Features of Ovarian Cancer in Japanese Women with Germ-line Mutations of *BRCA1*. **Clin Cancer Res** 1998; 4:235-40.

Andersen TI, Eiken HG, Couch F, Kaada G, Skrede M, Johnsen H, Aloysius TA, Tveit KM, Tranebjaerg L, Dorum A, Moller P, Weber BL, Borresen-Dale AL.. Constant Denaturant Gel electrophoresis (CDGE) in *BRCA1* mutation screening. **Hum Mutat** 1998; 11:166-74.

Ansque Y, Gautier C, Fourquet A, Asselain B, Stoppa-Lyonnet D. Survival in early-onset *BRCA1* breast-cancer patients. **Lancet** 1998; 352:541.

Bateman JF, Freddi S, Lamande SR, Byers P, Nasioulas S, Douglas J, Otway R, Kohonen-Corish M, Edkins E, Forrest S. Reliable and sensitive detection of premature termination mutations using a protein truncation test designed to overcome problems of nonsense-mediated mRNA instability. **Hum Mutat** 1999; 13:311-7.

Bennett LM, Haugen-Strand A, Cochran C, Brownlee HA, Fiedorek FT, Wiseman RW. Isolation of the mouse homologue of BRCA1 and genetic mapping to mouse chromosome 11. **Genomics** 1995; 29:576-81.

Berchuck A, Schildkraut JM, Marks JR, Futreal PA. Managing hereditary ovarian cancer risk. **Cancer** 1999; 86 Suppl:2517-24.

Bergh J, Norberg T, Sjogren S, Lindgren A, Holmberg L. Complete sequencing of the p53 gene provides prognostic information in breast cancer patients, particularly in relation to adjuvant systemic therapy and radiotherapy. **Nat Med** 1995; 1:1029-34.

Burke TF, Cocke KS, Lemke SJ, Angleton E, Becker GW, Beckmann RP. Identification of a *BRCA1*: associated kinase with potetial biological relevance. **Oncogene** 1998; 16:1031-40.

Callahan R, Cropp CS, Merlo GR, Liscia DS, Cappa AP, Lidereau R. Somatic mutations and human breast cancer: a status report review. **Cancer** 1992; 69 Suppl:1582-8.

Castilla LH, Couch FJ, Erdos MR, Hoskins KF, Calzone K, Garber JE, Boyd J. Mutations in the BRCA1 gene in families with early-onset breast and ovarian cancer. **Nat Genet** 1994; 8:387-91.

Claus EB, Risch N, Thompson WD Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. **Am J Hum Genet** 1991; 48:232-42.

Couch FJ, DeShano ML, Blackwood MA, Calzone K, Stopfer J, Campeau L, Ganguly A, Rebbeck T, Weber BL. *BRCA1* mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. **N Engl J Med** 1997; 336:1409-11.

Couch FJ, Weber BL, Breast.Cancer Informstion Core. Mutations and polymorphisms in the familial early-onset breast cancer (*BRCA1*) gene. **Hum Mut** 1996; 8: 8-18.

De Benedetti V, Radice P, Mondini P, Spatti G, Conti A, Illeni M, Caligo M.

Screening for mutations in exon 11 of the *BRCA1* gene in 70 Italian breast and ovarian cancer patients by protein truncation test. **Oncogene** 1996; 13:1353-7.

Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the *BRCA1* gene in sporadic breast cancer. **Cancer Res** 1997; 57:3347-50.

Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K, Mattick JS. 'Touchdown'PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucl Acids Res** 1991; 19:4008.

Dunning AM, Chiano M, Smith NR, Dearden J, Gore M, Oakes S, Wilson C. Common *BRCA1* variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population. **Hum Mol Genet** 1997; 6:285-9.

Durocher F, Shattuck-Eidens D, McClure M, Labrie F, Skolnick MH, Goldgar DE, Simard J. Comparison of *BRCA1* polymorphisms, rare variants and/or "missense" mutations in unaffected and breast/ovarian cancer populations. **Hum Mol Genet** 1996; 5:835-42.

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

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

Easton DF, Steele L, Fields P, Ormiston W, Averill D, Daly PA, McManus R. Cancer risk in two large breast cancer families linked to *BRCA2* on chromosome 13q12-13. **Am J Hum Genet** 1997; 61:120-28.

Eisinger F, Stoppa-Lyonnet D, Longy M, Kerangueven F, Noguchi T, Bailly C, Vincent-Salomon A, Jacquemier J, Birnbaum D, Sobol H. Germ line mutation at *BRCA1* affects the histoprognostic grade in hereditary breast cancer. **Cancer Res** 1997; 56:471-4.

Emery J, Murphy M, Lucassen A. Hereditary cancer- the evidence for current recommended management. **Lancet Oncol** 2000; 1: 09-16.

Evans SC, Lozano G. The Li-Fraumeni syndrome: an inherited susceptibility to cancer: review. **Mol Med Today** 1997; 3:390-5.

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

Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod SA, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in breast cancer families. **Am J Hum Genet** 1998; 62:676-89.

Frank TS, Manley SA, Olopade OI, Cummings S, Garber JE, Bernhardt B, Antman K. Sequence analysis of *BRCA1* and *BRCA2*: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. **J Clin Oncol** 1998; 16:2417-25.

Friedman L, Ostermeyer E, Szabo C, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King M-C. Confirmation of *BRCA1* by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. **Nat Genet** 1994; 8:399-404.

Gao Q, Neuhausen S, Cummings S, Luce M, Olopade OI. Recurrent germ-line *BRCA1* mutations in extended African American families with early-onset breast cancer. **Am J Hum Genet** 1997; 60:1233-6.

Gayther SA, Harrington P, Russell P, Kharkevich G, Garkavtseva RF, Ponder BAJ, UKCCCR Familial Ovarian Cancer Study Group. Rapid detection of regionally clustered germline *BRCA1* mutations by multiplex heteroduplex analysis. **Am J Hum Genet** 1996; 58:451-6.

Gayther SA, Warren W, Mazoyer S, Russell PA, Harrington PA, Chiano M, Seal S, Hamoudi R, van Rensburg EJ, Dunning AM. Germline mutations of the *BRCA1* gene in breast and ovarian cancer families provide evidence for a genotype-phenotype correlation. **Nature Genet** 1995; 11:428-33.

Gowen LC, Johnson BL, Latour AM, Sulik KK, Koller BH. *BRCA1* deficiency results in early embryonic lethality characterized by neuroepithelial abnormalities. **Nat Genet** 1996; 12:191-4.

Hakem R, de la Pompa JL, Mak TW. Developmental studies of *BRCA1* and *BRCA2* knock-out mice: review. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 1998; 3:431-45.

Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King M-C. Linkage of early onset familial breast cancer to chromosome 17q21. **Science** 1990; 250:1684-9.

Hogervorst FBL, Cornelis RS, Bout M, van Vliet M, Oosterwijk JC, Olmer R, Bakker B. Rapid detection of *BRCA1* mutations by the protein truncation test. **Nat Genet** 1995; 10:208-12.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers: review. **Science** 1991; 253:49-53.

Holt JT, Thompson ME, Szabo C, Robinson-Benion C, Arteaga CL, King MC, Jensen RA. Growth retardation and tumour inhibition by *BRCA1*. **Nat Genet** 1996; 12:298-302.

Hughes KS, Papa MZ, Whitney T, McLellan R. Prophylactic mastectomy and inherited predisposition to breast carcinoma: review **Cancer** 1999; 86 Suppl:2502-16.

Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: review.

Recent Results Cancer Res 1998; 154:22-36.

Janezic SA, Ziogas A, Krumroy LM, Krasner M, Plummer SJ, Cohen P, Gildea M. Germline *BRCA1* alterations in a population-based series of ovarian cancer cases. **Hum Mol Genet** 1999; 8:889-97.

Johannsson O, Ostermeyer EA, Hakansson S, Friedman LS, Johannsson U, Sellberg G, Brondum-Nielsen K, Sele V, Olsson H, King MC, Borg A. Founding *BRCA1* mutations in hereditary breast and ovarian cancer in southern Sweden. **Am J Hum Genet** 1996; 58:441-50.

Johannsson OT, Idvall I, Anderson C, Borg A, Barkardottir RB, Egilsson V, Olsson H. Tumour biological features of *BRCA1*-induced breast and ovarian cancer. **Eur J Cancer** 1997; 33:362-71.

Katagiri T, Emi M, Ito I, Kobayashi K, Yoshimoto M, Iwase T, Kasumi F, Miki Y, Skolnick MH, Nakamura Y. Mutations in the *BRCA1* gene in Japanese breast cancer patients. **Hum Mutat** 1996; 7:334-9.

Katagiri T, Kasumi F, Yoshimoto M, Nomizu T, Asaishi K, Abe R, Tsuchiya A, Sugano M, Takai S, Yoneda M, Fukutomi T, Nanba K, Makita M, Okazaki H, Hirata K, Okazaki M, Furutsuma Y, Morishita Y, Iino Y, Karino T, Ayabe H, Hara S, Kajiwarra T, Houga S, Miki Y. High proportion of "missense" mutations of the *BRCA1* and *BRCA2* genes in Japanese breast cancer families. **J Hum Genet** 1998; 43:42-8.

Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes: gatekeepers and caretakers. **Nature** 1997; 386:761-3.

Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. **Proc Natl Acad Sci USA** 1993; 90:10914-21.

Knudson Jr AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 1971; 68:820-3.

Koonin EV, Altschul SF, Bork P. *BRCA1* protein products functional motifs. **Nat Genet** 1996; 13:266-8.

Lakhani SR, Jacquemier J, Sloane JP, Gusterson BA, Anderson TJ, van de Vijver MJ, Farid LM, Venter D, Antoniou A, Storfer-Isser A, Smyth E, Steel CM, Haites N, Scott RJ, Goldgar D, Neuhausen S, Daly PA, Ormiston W, McManus R, Scherneck S, Ponder BA, Ford D, Peto J, Stoppa-Lyonnet D, Easton DF. Multifactorial analysis of differences between sporadic breast cancers and cancers involving *BRCA1* and *BRCA2* mutations. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:1138-45.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. **Nature** 1979; **278**:261-3.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene: review. **Nature** 1991; 351:453-6.

Li FP, Fraumeni JF. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a cancer family syndrome. **J Natl Cancer Inst** 1969; **43**:1365-73.

Li Y, Jenkins CW, Nichols MA, Xiong Y. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. **Oncogene** 1994; **9**:2261-8.

Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. **Cell** 1979; 17:43-52.

Lynch HT, Watson P, Bewtra C, Conway TA, Hippee CR, Kaur P, Lynch JF, Ponder BA. Hereditary ovarian cancer: heterogeneity in age at diagnosis. **Cancer** 1991; 67:1460-6.

Magdinier F, Ribieras S, Lenoir GM, Frappart L, Dante R. Down-regulation of *BRCA1* in human sporadic breast cancer; analysis of DNA methylation patterns of the putative promoter region. **Oncogene** 1998; 17:3169-76.

Malone KE, Daling JR, Thompson JD, O'Brien CA, Francisco LV, Ostrander EA. *BRCA1* mutations and breast cancer in the general population: analyses in women before age 35 years and in women before age 45 years with first-degree family history. **JAMA** 1998; 279:922-9.

Matsushima M, Kobayashi K, Emi M, Saito H, Saito J, Suzumori K, Nakamura Y. Mutation analysis of the *BRCA1* gene in 76 Japanese ovarian cancer patients: four germline mutations, but no evidence of somatic mutation. **Hum Mol Genet** 1995; 4:1953-6.

Medeiros AC, Nagai MA, Brentani RR. Genetic alterations in breast cancer: involvement of tumor supressor genes and oncogenes. **Mastology: breast diseases. New York: Elsevier Science B. V**; 1995. p.309-14.

Medeiros AC, Nagai MA, Medeiros Neto M, Brentani RR. Loss of heterozygosity affecting the APC and MCC genetic loci in patients with primary breast carcinomas. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 1994; 3:331-3.

Mefford HC, Baumbach L, Panguluri RC, Whitfield-Broome C, Szabo C, Smith S, King MC, Dunston G, Stoppa-Lyonnet D, Arena F. Evidence for a *BRCA1* founder mutation in families of West African ancestry. **Am J Hum Genet** 1999; 65:575-8.

Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Cancer. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, 1999**. Rio de Janeiro, INCA, 1999.

Montagna M, Santacatterina M, Corneo B, Menin C, Serova O, Lenoir GM, Chieco-Bianchi L, D'Andrea E. Identification of seven new *BRCA1* germilien mutations in Italian breast and breast/ovarian cancer families. **Cancer Res** 1996; 56:5466-69.

Nagai MA, Marques LA, Torloni H, Brentani MM. Genetic alterations in *c-erbB-2* protooncogene as prognostic markers in human primary breast tumors. **Oncology** 1993; 50:412-7.

Nagai MA, Medeiros AC, Brentani MM, Brentani RR, Marques LA, Mazoyer S, Mulligan LM. Five distinct deleted regions on chromosome 17 defining different subsets of human primary breast tumors. **Oncology** 1995; 52:448-53.

Nagai MA, Pacheco MM, Brentani MM, Marques LA, Brentani RR, Mazoyer S, Ponder BA, Mulligan LM. Allelic loss on distal chromosome 17p is associated with poor prognosis in a group of Brazilian breast cancer patients. **Br J Cancer** 1994; 69:754-8.



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

Narod SA, Ford D, Devilee P, Barkadottir RB, Lynch HT, Smith SA, Ponder BAJ. An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer families. **Am J Hum Genet** 1995; 56:254-64.

Neuhausen SL, Marshall CJ. Loss of heterozygosity in familial tumors from three *BRCA1*-linked kindreds. **Cancer Res** 1994; 54:6069-72.

Newman B, Austin MA, Lee M, King M-C. Inheritance of human breast cancer: evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:3044-8.

Ouchi T, Monteiro AN, August A, Aaronson SA, Hanafusa H. *BRCA1* regulates *TP53* dependent gene expression. **Proc Natl Acad Sci USA** 1998; 95:2302-6.

Ozcelik H, To MD, Couture J, Bull SB, Andrulis IL. Preferential allelic expression can lead to reduced expression of *BRCA1* in sporadic breast cancers. **Int J Cancer** 1998; 77:1-6.

Park JG, Vasen HF, Park KJ, Peltomaki P, Ponz de Leon M, Rodriguez-Bigas MA, Lubinski J, Beck NE, Bisgaard ML, Miyaki M, Wijnen JT, Baba S, Lynch HT. Suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC) criteria and results of genetic diagnosis. *Dis Colon Rectum*. 1999 Jun;42(6):710-5; discussion 715-6.

Peto J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N, Easton DF, Evans C, Deacon J, Stratton MR.. Prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations in patients with early-onset breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:943-9.

Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, van Eijk R, Olmer R, Drusedau M, Hogervorst FB, Hageman S, Arts PJ, Ligtenberg MJ, Meijers-Heijboer H, Klijn JG, Vasen HF, Cornelisse CJ, van't Veer LJ, Bakker E, van Ommen GJ, Devilee P. *BRCA1* genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. **Nat Genet** 1997; 17:341-5.

Phillips KA, Nichol K, Ozcelik H, Knight J, Done SJ, Goodwin PJ, Andrulis IL. Frequency of *TP53* mutation in breast carcinomas from Ashkenazi Jewish carriers of *BRCA1* mutations. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:469-73.

Ponder BA. Genetic testing for cancer risk. **Science** 1997; 278:1050-4.

Rio PG, Maurizis JC, Peffault de Latour M, Bignon YJ, Bernard-Gallon DJ. Quantification of *BRCA1* protein in sporadic breast carcinoma with or without loss of heterozygosity of the *BRCA1* gene. **Int J Cancer** 1999; 80:823-6.

Salzano FM. Human races: myth, invention, or reality? **Interciencia** 1997; 22:221-7.

Santarosa M, Viel A, Dolcetti R, Crivellari D, Magri MD, Pizziquetta MA, Tibiletti MG. Low incidence of *BRCA1* mutations among Italian families with breast and ovarian cancer. **Int J Cancer** 1998; 78:581-6.

Sato T, Akiyama F, Sakamoto G, Kasumi F, Nakamura Y. Accumulation of genetic alterations and progression of primary breast cancer. **Cancer Res** 1991; 51:5794-9.

Shattuck-Eidens D, McClure M, Simard J, Labrie F, Narod S, Couch F, Hoskins K, Weber B, Castilla L, Erdos M. A collaborative survey of 80 mutations in the *BRCA1* breast and ovarian cancer susceptibility gene: implications for presymptomatic testing and screening. **JAMA** 1995; 273:535-41.

Shattuck-Eidens D, Oliphant A, McClure M, McBride C, Gupte J, Rubano T, Pruss D, Tavtigian SV, Teng DH, Adey N, Staebell M, Gumpfer K, Lundstrom R, Hulick M, Kelly M, Holmen J, Lingenfelter B, Manley S, Fujimura F, Luce M, Ward B, Cannon-Albright L, Steele L, Offit K, Thomas A. *BRCA1* sequence analysis in women at high risk for susceptibility mutations: risk factor analysis and implications for genetic testing. **JAMA** 1997; 278:1242-50.

Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. **Proc Natl Acad Sci USA** 1989; 86:232-6.

Simard J, Tonin P, Durocher F, Morgan K, Rommens J, Gingras S, Samson C, Leblanc JF, Belanger C, Dion F. Common origins of *BRCA1* mutations in Canadian breast and ovarian cancer families. **Nat Genet** 1994; 8:392-8.

Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace Jr AJ. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. **Science** 1994; 266:1376-80.

Smith SA, Easton DF, Evans DG, Ponder BA.. Allele losses in the region 17q12-21 in familial breast and ovarian cancer involve the wild-type chromosome. **Nat Genet** 1992; 2:128-31.

Somasundaram K, Zhang H, Zeng YX, Houvras Y, Peng Y, Zhang H, Wu GS, Licht JD, Weber BL, El-Deiry WS. Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor *BRCA1* requires the CDK-inhibitor p21WAF1/Cip1. **Nature** 1997; 389:187-90.

Southey MC, Tesoriero AA, Andersen CR. *BRCA1* mutations and other sequence variants in a population-based sample of Australian women with breast cancer. **Br J Cancer** 1999; 79:34-39.

Steeg PS. Suppressor genes in breast cancer: an overview, review. **Cancer Treat Res** 1992; 61:45-57.

Stratton MR, Wooster R. Hereditary predisposition to breast cancer: review **Curr Opin Genet Dev** 1996; 6:93-7.

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

Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, Timmerman MM, Brody LC, Tucker MA. The risk of cancer associated with specific mutations of *BRCA1* and *BRCA2* among Ashkenazi Jews. **N Engl J Med** 1997; 336:1401-8.

Szabo CI, King MC. Inherited breast and ovarian cancer: review. **Hum Mol Genet** 1995; 4 (nº esp.):1811-7.

Szabo CI, King M-C. Population genetics of *BRCA1* and *BRCA2*. **Am J Hum Genet** 1997; 60:1013-20.

Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL, Holt JT. Decreased expression of *BRCA1* accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. **Nat Genet** 1995; 9:444-50.

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch Syndrome) proposed by the international collaborative Group on HNPCC. **Gastroenterology** 1999; 116:1453-6.

Vehmanen P. Low proportion of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Finnish breast cancer families: evidence for additional susceptibility genes. **Hum Mol Genet** 1997; 6:2309-15.

Verhoog LC, Brekelmans CT, Seynaeve C, Van Den Bosch LM, Dahmen G, Van Geel AN, Tilanus-Linthorst MM, Bartels CC, Wagner A, van den Ouweland A, Deville P, Meijers-Heijboer EJ, Klijn JG. Survival and a tumor characteristics of breast-cancer patients with germline mutations of *BRCA1*. **Lancet** 1998; 351:316-21.

Vieira RJS. **Agregação familiar de câncer de mama e ovário: estudo descritivo em amostra de famílias no Brasil**. Rio de Janeiro; 1999. [Tese de Mestrado - Instituto Fernandes Figueiras (IFF)/FIOCRUZ].

Wagner TMU, Möslinger RA, Muhr D, Langbauer G, Hirtenlehner K, Concin H, Doeller W. *BRCA1*-related breast cancer in Austrian breast and ovarian cancer families: specific *BRCA1* mutations and pathological characteristics. **Int J Cancer** 1998; 77:354-60.

Welcsh PL, Owens KN, King MC. Insights into the functions of *BRCA1* and *BRCA2*: review. **Trends Genet** 2000; 16:69-74.

Welcsh PL, Schubert EL, King MC. () Inherited breast cancer: an emerging picture. **Clin Genet**. 1998; 54:447-58.

Welcsh PL, Schubert EL, King MC. Inherited breast cancer: an emerging picture: review. **Clin Genet**. 1998; 54:447-58.

Wilson CA, Payton MN, Elliott GS, Buaas FW, Cajulis EE, Grosshans D, Ramos L, Reese DM, Slamon DJ, Calzone FJ. Differential subcellular localization, expression and biological toxicity of *BRCA1* and the splice variant *BRCA1*-delta11b. **Oncogene** 1997; 14:1-16.

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D. Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. **Science** 1994; 265:2088-90.

Wooster R, Stratton MR. Breast cancer susceptibility: a complex disease unravels: review. **Trends Genet** 1995; 11:3-5.

Wu LC, Wang ZW, Tsan JT, Spillman MA, Phung A, Xu XL, Yang MC, Hwang LY, Bowcock AM, Baer R. Identification of a RING protein that can interact in vivo with the *BRCA1* gene product. **Nat Genet** 1996; 14:430-40.

Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. **Nature** 1993; 366:701-4.

Zelada-Hedman M, Arver BW, Claro A, Chen J, Werelius B, Kok H, Sandelin K. A screening for *BRCA1* mutations in breast and breast-ovarian cancer families from the Stockholm region. **Cancer Res** 1997; 57:2474-7.

Zhang H, Somasundaram K, Peng Y, Tian H, Zang H, Bi D, Weber BL, El-Deiry WS. *BRCA1* physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. **Oncogene** 1998; 16:1713-21.

***BRCA1*, *BRCA2* and *TP53* germline mutations among Brazilian breast cancer families**

Cassandra M. Corvello,¹ Ana Paula M. Duarte,¹ Mário Mourão-Neto,² and Andrew J. G. Simpson¹

¹Laboratory of Cancer Genetics, Ludwig Institute for Cancer Research and ²Department of Mastology, AC Camargo Cancer Hospital, São Paulo, Brazil

Running title: Germline mutations in breast cancer families

Summary

Five different germline mutations in one of the three breast cancer susceptibility genes, *BRCA1*, *BRCA2* or *TP53*, were identified in 4 families (12.9%) from a total of 31 Brazilian breast cancer families analysed. Genetic predisposition testing was performed in individuals with personal or familial history of breast cancer identified in the context of the Genetic Counseling Program developed at our cancer center. From a total of 74 families with breast cancer referred to genetic counseling, 31 out of 57 that fulfilled the criteria for inclusion in the present study decided to undertake genetic testing. The analysis of the complete coding region and exon-intron boundaries of the *BRCA1* gene among 28 breast cancer families revealed one novel nonsense mutation at exon 11 (E649X), a “missense” mutation at exon 15 (V1534M) and three previously described exonic polymorphisms (Q356R, S1436S and S1613G). Two novel germline *TP53* mutations were identified in two out of three families whose probands had sarcoma and breast cancer under age 30: one nonsense at exon 6 (Q192X) and one “missense” at exon 4 (FR110-111ins). A frameshift mutation in *BRCA2* (2149X) was identified in a male with breast cancer and a high-risk family history. The low proportion of families associated with deleterious *BRCA1* mutations in our sample can be attributable to the predominance of breast cancer families lacking the considered high-risk factors as the presence of ovarian cancer and the Ashkenazi Jewish ancestry.

Introduction

It is estimated that approximately 33.000 new cases of breast cancer are diagnosed each year in Brazil being the most common neoplasia among women from the regions of the East Coast of the country (National Cancer Institute, Brazil). Germline mutations in breast cancer susceptibility genes account for 5%-10% of all breast cancer cases (Newman et al. 1988; Claus et al. 1991). Two major breast cancer susceptibility genes were recently identified and cloned: *BRCA1*, located at chromosome 17q21 (Hall et al. 1990; Miki et al. 1994) and *BRCA2*, located at chromosome 13q12-13 (Wooster et al. 1994, 1995). Genetic-linkage studies with high risk families estimate that *BRCA1* mutations account for 45% of the families with site-specific breast cancer and for more than 80% of the families with breast and ovarian cancer (Easton et al. 1993; Narod et al. 1995), while *BRCA2* mutations account for 35% of high-risk families (Wooster et al. 1995). *BRCA1*-mutation carriers have an estimated cumulative risk >80% for breast cancer and >40% for ovarian cancer by age 70 years (Ford et al. 1994; Easton et al. 1995). *BRCA2* confers an estimated risk for female breast cancer similar to *BRCA1* and for male breast cancer of 6% by age 70 (Easton et al. 1997). A number of studies have presented data on the mutational spectrum of *BRCA1* and *BRCA2* in breast/ovarian cancer families belonging to different geographic regions and ethnic groups. Overall, these studies have shown that the proportion of ancient *BRCA1* and *BRCA2* mutations detected in these families shows a great variation among populations a consequence of population structure and dynamics (reviewed in Szabo and King 1997). Among Ashkenazi Jewish families, three founder mutations (185delAG and 5382insC in

BRCA1 and 6174delT in *BRCA2*) account for a significant proportion of inherited breast and ovarian cancer cases (Tonin et al. 1996; Roa et al. 1996; Neuhausen et al. 1996; Abeliovich et al. 1997). While many novel mutations were detected in European countries as such Italy (De Benedetti et al. 1996; Santarosa et al. 1998), France (Serova-Sinilnikova et al. 1997; Stoppa-Lyonnet et al. 1997), the United Kingdom (Gayther et al. 1996; Xu et al. 1997), the Netherlands (Peelen et al. 1997) and Austria (Wagner et al. 1998), the United States and Canada share many mutations with the ancestor European populations (Castilla et al. 1994; Friedman et al. 1994; Serova et al. 1996; Schubert et al. 1997). Novel *BRCA1* mutations have also been identified in African-American and African-European families (Castilla et al. 1994; Gao et al. 1997; Stoppa-Lyonnet et al. 1997). Also, the proportion of breast cancer families with *BRCA1* mutations presents a great variation depending on the family history and on the method used for mutation analysis (Couch et al. 1997; Serova et al. 1997; Stoppa-Lyonnet et al. 1997; Zelada-Hedman et al. 1997; Frank et al. 1998; Santarosa et al. 1998).

Germline mutations in the *TP53* gene, located on chromosome 17p13, account for a small proportion (<1%) of early-onset breast cancer and have been associated with 50-60% of Li-Fraumeni families. The Li-Fraumeni cancer syndrome was described in 1969 (Li and Fraumeni 1969a, 1969b) and further studies with 24 families allowed the characterization of the classic Li-Fraumeni syndrome (LFS) according to a defined set of criteria: a proband with sarcoma before 45 years of age with a first degree relative with any cancer under age 45 and another first- or second-degree relative with any cancer under age 45 or with sarcoma at any age (Li et al. 1988). The spectrum of tumors of the LFS includes premenopausal breast cancer, bone and soft tissue sarcomas, brain tumors,

leukemia, adrenocortical carcinoma, gastric cancer and others (Li et al. 1988; Varley et al. 1997). A Li-Fraumeni-like syndrome (LFL) was described by two other groups using less stringent criteria (Birch et al. 1994; Eeles et al. 1995). *TP53* germline mutations have been identified in around 70% of the LFS families and in up to 33% of the patients with sarcoma and multiple tumors typical of LFS with a similar proportion of “missense” and nonsense mutations (reviewed by Varley et al. 1997).

The estimated genetic contribution of Europeans, Africans and Amerindians to the gene pool of the Brazilian population is quite variable among the populational groups from different regions of the country. The average genetic contribution provided by the Amerindian ethnic group is higher in the North (39%) than in the Northeast region (13%) and inexpressive in the South and Southeast. Among Caucasians from the South and Southeast, it is estimated that 10% of the genes are of African origin (reviewed by Salzano 1997). Europeans arrived in Brazil in 1500 coming from Portugal followed by other immigrants predominantly from Italy, Spain and Germany. During the Colonial period, an estimated six million Africans were introduced in the country belonging mainly to three cultural groups from West Africa (Ribeiro 1996). Here we report the first mutation detection study in breast cancer susceptibility genes among Brazilian breast cancer families. The families enrolled into this study are all but one Caucasians from the Southeast region of the country.

Subjects, Material and Methods

Family selection

All individuals and families taking part of the study were selected in the context of the Genetic Counseling Program developed at the A C Camargo Cancer Hospital in São Paulo, Brazil. Genetic testing was offered to individuals with breast cancer that had 1) breast cancer diagnosed under age 40, without family history; or 2) one first- or second-degree relative with either breast cancer (at age < 45 years) or ovarian cancer (at any age); or 3) two or more first- or second-degree relatives with breast or ovarian cancer at any age; or 4) multiple primary tumors or bilateral breast cancer. The protocol for genetic counseling and testing was approved by institutional review boards and written informed consent was obtained from each participant.

Genomic DNA Extraction

After written informed consent, a blood sample was collected from all participants and genomic DNA was prepared from lymphocytes by digestion with SDS-proteinase K and phenol-chloroform extraction.

PTT

Exon 11 of either *BRCA1* and *BRCA2* were screened by the protein truncation test (PTT) essentially as described by Hogervorst et al. (1995). The primer sequences used in PTT analysis of *BRCA1* and *BRCA2* were previously published (Plummer et al. 1995). PCR was performed in a total volume of 25 µl using 0.5 µg of genomic DNA as

template, 200 μ M of each dNTP, 20 pmol of each primer, 1.5 mM of $MgCl_2$ and 1 U of *Taq* DNA Polymerase with the suppliers' reaction buffer (Gibco-BRL, USA). Following an initial denaturation step of 95°C for 5 min, amplification was conducted by 40 cycles consisting of 1 min at 95°C, 1 min at annealing temperature and 4 min at 72°C, and a final extension step at 72°C for 5 min. TNT^R T7 Coupled Reticulocyte Lysate System (Promega Corporation, USA) was used for *in vitro* transcription and translation of each PCR product in presence of [³⁵S]-methionine (Amersham International, UK) as detailed by the manufacturer. The radioactive synthesized proteins were resolved on a 12% SDS-PAGE and visualized by fluorography upon treatment with Amplify (Amersham International, UK).

PCR-SSCP Analysis of Genomic DNA

SSCP analysis of exons 1-10, 12-24 and the extreme 5' region of exon 11 of *BRCA1* was performed using 26 pairs of primers which cover *BRCA1* coding region and exon/intron boundaries. The primer sequences and annealing temperatures were described elsewhere (Friedman et al., 1994). PCR amplification was carried out in a reaction volume of 25 μ l containing 50 ng of genomic DNA as template, 200 μ M of each dNTP, 1 μ Ci [α -³²P]dCTP (Amersham International, UK), 20 pmol of both forward and reverse primers, 1.5 mM of $MgCl_2$ and 1 U of *Taq* DNA Polymerase with the suppliers' reaction buffer (Gibco-BRL, USA). After an initial denaturation step at 95°C for 5 min, DNA was amplified through 35 cycles consisting of 1 min at 95°C, 1 min at annealing temperature and 1 min at 72°C, and a final extension step at 72°C for 7 min.

Following amplification, a 5 µl aliquot of the product was diluted in 5 µl of denaturing loading buffer (96% formamide, 20mM EDTA, 0,05% xylene cyanol and 0,05% bromophenol blue), heated at 95°C for 5 min and cooled on ice for 10 min. Eight µl of this solution were loaded onto a 6% non-denaturing polyacrylamide gel and run at 6W for 12-16 h at room temperature. After electrophoresis, the gels were dried and exposed to autoradiography film (X-Omat AR, Kodak) at -80°C for 6-14h.

DNA Sequencing

Putative mutations were characterized by DNA sequencing of the corresponding regions after amplification from the original genomic DNA. The primers used to sequence *BRCA1* and *BRCA2* variant bands detected by PTT or SSCP analysis as well as those used for sequence analysis of exons 4 to 9 of the *TP53* are given in table 1. PRC amplification from genomic DNA with appropriate primer set was performed under identical conditions as described above except that radiolabeled [α -³²P]dCTP was omitted. Sequencing reactions were carried out using 1 µl of PCR products in an initial denaturation step at 96°C for 2 min, followed by 25 amplification cycles consisting of 30 s at 96°C, 15 s at 55°C and 4 min at 60°C. All PCR products were bidirectionally sequenced using the BigDye™ Terminator Cycle Sequencing kit and an ABI377 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Inc.).

Results

Family data

Table 2 shows the number of breast cancer families enrolled onto this study grouped according to the number of affected relatives and the age range at onset. In a period of two years, a total of 74 families were referred to the Genetic Counseling Service for risk assessment of inherited breast cancer. After genetic counseling and risk evaluation, genetic testing was offered to 57 families that fulfilled the criteria for inclusion in the present study. Thirty four patients from 31 families decided to undertake genetic testing. Families that had at least two first degree relatives with breast cancer were separated in two groups according to the age of the youngest affected relative (table 2, groups B and C), including the only family with male breast cancer referred for counseling (group C). Group G includes the families whose probands had breast cancer plus either ovarian cancer or sarcoma or contralateral breast cancer as the additional primary tumor. All individuals performing genetic testing had their cancer diagnoses confirmed by medical records or pathology reports. Of the 31 families investigated, 30 are Brazilian Caucasians of European descent and 1 family is of Japanese heritage.

Mutation detection

From a total of 31 families included in this study, 28 were tested for mutations in the whole coding region and intron-exon boundaries of the *BRCA1* gene. Three out of 31 kindreds were tested for mutations in the *TP53* gene and one for mutations in exon 11 of the *BRCA2*. Exon 11 of the *BRCA1* and *BRCA2* genes were analysed by the protein

truncation test, while the remaining exons of the *BRCA1* were screened by SSCP analysis. The characterization of the electrophoretic alterations detected by PTT or SSCP as well as the identification of *TP53* mutations were made by DNA sequencing. Five germline mutations were identified in 4 of 31 Brazilian breast cancer families: two in *BRCA1*, one in *BRCA2* and two in *TP53*.

Figure 1 shows the identification by PTT of a truncated protein in exon 11 of the *BRCA1* gene in a high-risk family (BR110) whose proband (individual IV-1) had breast cancer diagnosed at 35 years of age and had two first degree relatives with breast cancer under age 40 (individuals III-4 and IV-2). The characterization by direct sequencing revealed a G to T substitution originating a nonsense mutation (E649X). Family BR129 had a “missense” *BRCA1* mutation detected in exon 15 (4719 G>A) resulting in a valine to methionine substitution at codon 1543 (fig. 2). The mutant allele was present in three sisters, two of them diagnosed with breast cancer at young age and one unaffected at age 38 (individuals III-1, III-2 and III-4, respectively). The DNAs from individuals II-1, III-3 and III-5 were not available for testing. The mutant allele was not detected in 100 Caucasian control individuals from Brazilian population (data not shown). As this kindred fulfill the criteria for the classic Li-Fraumeni syndrome, the three sisters tested for *BRCA1* were also tested for *TP53* mutations. A 6-bp duplication encompassing codons 109-110 was identified at exon 4 of the *TP53*, being present in the two affected sisters (individuals III-1 and III-2) and absent in the unaffected one who tested positive for *BRCA1* mutation (individual III-4).

Considering the estimation that up to 33% of the patients with sarcoma and multiple primary tumors or unusual family history are carriers of a germline *TP53*

mutation (reviewed by Varley et al. 1997), two other female patients (BR116 and BR166) with sarcoma and breast cancer at very young age had the *TP53* gene screened for germline mutations. A 30 year old female (BR116) with an intraductal carcinoma of the left breast was referred to genetic counseling in 1996. She was adopted at childhood and only a very sketchy family history was available (fig. 3). At the age eight years, she was diagnosed with an undifferentiated soft tissue sarcoma in the left supraclavicular area and was treated with surgery followed by a high dose radiation (70 Gy). Screening for *TP53* germline mutations was performed by direct sequencing of exons 4 to 9. A C to T substitution was characterized at exon 6, resulting in a nonsense germline mutation at codon 192 (Q192X). Since this mutation results in a truncated TP53 protein, it is unambiguously associated with the Li-Fraumeni phenotype in this female. The kindred BR166 was considered for *TP53* genetic testing only due to the probando's personal history of cancer (sarcoma and breast cancer at ages 16 and 33, respectively) who belongs to a large sibship (7 sisters and 4 brothers with ages varying from 21 to 40 years) with no affected first-degree relative. No mutation was detected after analysis of the exons 4 to 9 and associated splice junctions of the *TP53* gene.

PTT analysis of exon 11 of the *BRCA2* gene was offered to high-risk family whose proband was a male diagnosed with breast cancer at age 52 and with three sisters affected by the disease (fig. 4). A truncated protein was identified by PTT and further characterized by direct sequencing revealing a frameshift mutation at the 3' end of exon 11 with a premature translation termination at codon 2149.

BRCA1 Polymorphisms

The previously described *BRCA1* polymorphisms Q356R (1186 A>G) in exon 11, S1436S (4427 T>C) in exon 13 and S1613G (4956 A>G) in exon16 (Miki et al. 1994) and four additional intronic polymorphisms (IVS1+101 C>G, IVS8-64 delT, IVS16-68 A>G and IVS18+66 G>A) were detected by SSCP analysis in our sample and confirmed by direct sequencing (fig. 5). The estimated allele frequencies of the less common variant (q) of the exonic polymorphisms detected in the present study were 0.07 (Q356R), 0.35 (S1436S) and 0.45 (S1613G). The allele frequencies of these three polymorphic variants are under determination in the Brazilian control population.

Discussion

Five different germline mutations in one of the three breast cancer susceptibility genes, *BRCA1*, *BRCA2* or *TP53*, were identified in 4 families (12.9%) from a total of 31 Brazilian breast cancer families analysed. The family BR110, where a truncated *BRCA1* protein was detected, fulfills the criteria for a high-risk family for breast/ovarian cancer: four cases of breast cancer, three of them diagnosed among first degree relatives with an average age of 37.3 years. An intriguing result was obtained from the genetic analysis of the kindred BR129 which presented two germline “missense” mutations: one in *BRCA1* and one in *TP53*. Due to the three reported cases of breast cancer diagnosed at young age among first-degree relatives, this kindred was included in the protocol for *BRCA1* analysis. However, according to the spectrum of tumors reported (childhood sarcoma and breast cancer in the proband, two additional cases of breast cancer under age 45 among the probando’s first-degree relatives and one case of CNS tumor), this family was considered as having the classic Li-Fraumeni syndrome (Li et al. 1988). The identification of a unique *TP53* “missense” mutation involving the duplication of the codons 109-110 at exon 4 in two affected sisters strongly suggest the association of the *TP53* mutation with the cancer susceptibility in this LFS kindred. Several previously published data support the phenotype-genotype correlation proposed here: 1) the described mutation occurs in the central core domain (residues 102-292) of *TP53* that encodes the sequence specific DNA binding activity of the protein (El-Deiry et al. 1992; Cho et al. 1994), 2) a complex “missense” mutation involving deletion and insertion in the same region (residues 108-111) of *TP53* was previously described in two affected

first-degree relatives of a Li-Fraumeni like family (Birch et al. 1994) and 3) the previous demonstration of a correlation between the presence of a “missense” mutations in the DNA core-binding domain of TP53 protein and a higher incidence of cancer with earlier age of onset, predominantly breast and CNS tumors (Birch et al. 1998). The *BRCA1* alteration detected in this family is a “missense” mutation (V1534M) that had only four other entries in the BIC database as an unclassified variant and its biological meaning remains unclear. From the three sisters undertaking genetic testing, the two diagnosed with breast cancer presented both *TP53* and *BRCA1* mutations (individuals III-1 and III-2), while the asymptomatic sister is positive only for the *BRCA1* mutation (individual III-4). The clinical surveillance of the young unaffected female carrying the *BRCA1* mutation can help to understand its relevance for cancer susceptibility in this family.

Experimental data obtained from studies with Li-Fraumeni cells (Parshad et al. 1993; Camplejohn et al. 1995; Paules et al. 1995; Williams et al. 1997) and *TP53*-deficient mice (Harvey et al. 1993; Kemp et al. 1994) have indicated that the presence of a germline *TP53* mutation might increase the susceptibility to radiation-induced carcinogenesis. Studies with mice heterozygous for the *TP53* gene (*TP53*^{+/-}) have shown a decreased tumor latency upon low dose (4 Gy) irradiation of the whole body (Kemp et al. 1994). Here we describe a germline *TP53* mutation (Q192X) present in a woman who received a high radiation dose (70 Gy) during the treatment of her childhood sarcoma and who developed three additional primary tumors (breast cancer, MPNST and thyroid carcinoma) within the field of irradiation. Although there is evidence that second malignant neoplasms (SMN) are more likely to develop within the previously

irradiated region (Heyn et al. 1993), a recent case-control study did not show a significant interaction between radiation and familial history for the appearance of SMN (Kony et al. 1997). According to these authors, however, the number of case patients with *TP53* mutation in their study was not sufficient to provide strong evidence against this interaction. Despite the controversy concerning to the induction of tumors in Li-Fraumeni patients, the clinical history of individual BR116 suggests that the germline *TP53* mutation could have conferred increased genetic susceptibility to radiation-induced tumorigenesis. Thus, we believe that the presence of germline *TP53* mutations in patients with childhood sarcomas should be taken into account for treatment selection.

Studies based on genetic linkage analysis estimated that 45% of the inherited site-specific breast cancer families and more than 80% of the breast/ovarian cancer families are associated with *BRCA1* mutations (Easton et al. 1993; Narod et al. 1995). However, the proportion of site-specific breast cancer families associated with *BRCA1* mutations depends on the criteria used to determine the risk of hereditary breast cancer and on the method used for *BRCA1* analysis. A recent study, including 238 women considered at high risk for inherited susceptibility to breast/ovarian cancer, found deleterious mutations in *BRCA1* in 18% (22/121) of the women belonging to site-specific breast cancer families (Frank et al. 1998). Other studies have shown a lower proportion of families (1% to 9%) with only breast cancer having a mutation in *BRCA1* (Zelada-Hedman et al. 1997; Couch et al. 1997; Santarosa et al. 1998). Among the 26 site-specific breast cancer kindreds screened for mutations in *BRCA1* at the present study, only two (7.7%) had a *BRCA1* mutation detected (BR110 and BR129), being one deleterious mutation and one variant of unknown biological function. The selection of

families in our study followed similar criteria reported by Couch et al. (1997) where *BRCA1* mutations were detected in 7% of women attending to a breast cancer clinic for risk evaluation. The low proportion of breast cancer families associated with *BRCA1* mutations can be related to the characteristics of our sample as the presence of ovarian cancer in only two kindreds, the high average age of breast cancer diagnosis among the probands (50.8 years) and the absence of Ashkenazi Jewish ancestry. It can not be ruled out that other susceptibility genes conferring lower breast cancer risk can be associated with cancer cases among the Caucasian Brazilian kindreds evaluated here. Two recent studies estimated that the proportion of breast cancer families associated either to *BRCA1* or *BRCA2* mutations is similar in those families either with increasing number of breast cancer cases or with increased age of onset (Ford et al. 1998; Frank et al. 1998). Based on these data, the future analysis of *BRCA2* should be considered for some kindreds included in our analysis.

Using SSCP analysis we were able to find several distinct single-nucleotide substitutions, including three exonic polymorphisms reported in other populations (Q356R, S1436S and S1613G). The frequency of the Arg variant ($q = 0.07$) in the polymorphism Q356R is similar to those reported by other studies with q values varying from 0.06 to 0.13 (Miki et al. 1994; Friedman et al. 1994). While the Arg variant was associated with reduced susceptibility for breast cancer in an UK case-control series due to its higher frequency among controls ($P = 0.01$; Dunning et al. 1997), the allele frequencies of the Q356R polymorphism did not show a statistically significant difference between the breast/ovarian cancer patients and the control population from Utah (Durocher et al. 1997). Despite the fact that residue 356 in *BRCA1* protein is not

evolutionarily conserved between mouse and human (Bennett et al. 1995; Sharam et al. 1995), it lies in a putative functional domain of BRCA1 (residues 224-500) recently showed to be important for interaction with TP53 and for coactivation of TP53-dependent transcription (Zhang et al. 1998). The Gly variant allele frequency of the S1613G polymorphism in our sample of breast cancer patients (0.45) is higher than those detected among either Caucasian breast/ovarian patients of European origin ($q = 0.31$; Miki et al. 1994; Durocher et al. 1996) or Chinese breast cancer patients ($q = 0.33$; Tang et al. 1999).

Recently, Szabo and King (1997) compiled data related to the proportion of *BRCA1* mutations detected in families at high-risk for breast and/or ovarian cancer, considering at high-risk those families with at least either three female relatives with breast cancer or two affected relatives where one has either ovarian or male breast cancer. The reported frequencies of high-risk families with breast/ovarian cancer carrying *BRCA1* mutations range from less than 15% in Holland and Belgium, Norway and Japan to 79% in Russia with intermediate frequencies among New World populations from United States and Canada (39% and 40%, respectively). The variable regional admixture among the European immigrants, African slaves descendants and native Amerindian groups should make the screening for mutations in breast cancer susceptibility genes among Brazilian breast/ovarian cancer families more complex due to the presence of unique mutations. However, the future determination of polymorphic and rare variant allele frequencies in a large series of individuals with breast/ovarian cancer and in the control population may provide important findings in relation to the

cancer risk associated to certain alleles in Brazil.

Acknowledgements

We thank to physicians of the Department of Mastology of the AC Camargo Hospital for the referral of their patients, to Dr. Humberto Torloni for clinical case discussions and to Dr. Vilma R. Martins for the comments to this manuscript. We also thank to Elisangela Monteiro for her excellent technical assistance. We are particularly grateful to the families that participated in this study. This research was supported in part by grants of Brazilian Research Council (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). CMC holded a CNPq post-doctoral fellowship and APMD holds a FAPESP graduate fellowship.

References

- Abeliovich D, Kaduri L, Lerer I, Weinberg N, Amir G, Sagi M, Zlotogora J, et al (1997) The founder mutations 185delAG and 5382insC in BRCA1 and 6174delT in BRCA2 appear in 60% of ovarian cancer and 30% of early-onset breast cancer patients among Ashkenazi women. *Am J Hum Genet* 60:505-514
- Beaudet AL, the Ad Hoc Committee on Mutation Nomenclature (1996) Update on nomenclature for human gene mutations. *Hum Mut* 8:197-202
- Bennett LM, Haugen-Strand A, Cochran C, Brownlee HA, Fiedorek FT, Wiseman RW (1995) Isolation of the mouse homologue of BRCA1 and genetic mapping to mouse chromosome 11. *Genomics* 29:576-581
- Birch JM, Blair V, Kelsey AM, Evans DG, Harris M, Tricker KJ, Varley JM (1998) Cancer phenotype correlates with constitutional TP53 genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome. *Oncogene* 17: 1061-1068.
- Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM, Harris M et al (1994) Prevalence and diversity of constitutional mutations in the *p53* gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 54:1298-1304
- Camplejohn RS, Perry P, Hodgson SV, Turner G, Williams A, Upton C, MacGeoch C, et al (1995) A possible screening test for inherited p53-related defects based on the apoptotic response of peripheral lymphocytes to DNA damage. *Br J Cancer* 72:654-662
- Castilla LH, Couch FJ, Erdos MR, Hoskins KF, Calzone K, Garber JE, Boyd J, et al (1994) Mutations in the BRCA1 gene in families with early-onset breast and ovarian cancer. *Nat Genet* 8:387-391
- Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP (1994) Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. *Science* 265: 346-355
- Claus EB, Risch N, Thompson WD (1991) Genetic analysis of breast cancer in the cancer and steroid hormone study. *Am J Hum Genet* 48:232-242
- Couch FJ, DeShano ML, Blackwood MA, Calzone K, Stopfer J, Campeau L, Ganguly A, et al (1997) *BRCA1* mutations in women attending clinics that evaluate the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 336:1409-1415
- De Benedetti V, Radice P, Mondini P, Spatti G, Conti A, Illeni M, Caligo M, et al (1996) Screening for mutations in exon 11 of the BRCA1 gene in 70 Italian breast and ovarian cancer patients by protein truncation test. *Oncogene* 13:1353-1357
- Dunning AM, Chiano M, Smith NR, Dearden J, Gore M, Oakes S, Wilson C et al (1997) Common *BRCA1* variants and susceptibility to breast and ovarian cancer in the general population. *Hum Mol Genet* 6:285-289
- Durocher F, Shattuck-Eidens D, McClure M, Labrie F, Skolnick MH, Goldgar DE, Simard J (1996) Comparison of *BRCA1* polymorphisms, rare variants and/or "missense" mutations in unaffected and breast/ovarian cancer populations. *Hum Mol Genet* 5:835-842

- Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP, Breast Cancer Linkage Consortium (1993) Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. *Am J Hum Genet* 52: 678-701
- Easton DF, Ford D, Bishop DT, Breast Cancer Linkage Consortium (1995) Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1-mutation carriers. *Am J Hum Genet* 56: 265-271
- Easton DF, Steele L, Fields P, Ormiston W, Averill D, Daly PA, McManus R, et al (1997) Cancer risk in two large breast cancer families linked to BRCA2 on chromosome 13q12-13. *Am J Hum Genet* 61:120-128
- Eeles RA (1995) Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv* 25:101-123
- El-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B (1992) Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet* 1: 45-49
- Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE, Breast Cancer Linkage Consortium (1994) Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Lancet* 343:692-695
- Ford D, Easton DF, Stratton M, Narod SA, Goldgar D, Devilee P, Bishop DT et al (1998) Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families. *Am J Hum Genet* 62:676-689
- Frank TS, Manley SA, Olopade OI, Cummings S, Garber JE, Bernhardt B, Antman K et al. (1998) Sequence analysis of *BRCA1* and *BRCA2*: correlation of mutations with family history and ovarian cancer risk. *J Clin Oncol* 16: 2417-2425
- Friedman L, Ostermeyer E, Szabo C, Dowd P, Lynch ED, Rowell SE, King M-C (1994) Confirmation of BRCA1 by analysis of germline mutations linked to breast and ovarian cancer in ten families. *Nat Genet* 8:399-404
- Gayther SA, Harrington P, Russell P, Kharkevich G, Garkavtseva RF, Ponder BAJ, UKCCCR Familial Ovarian Cancer Study Group (1996) Rapid detection of regionally clustered germline BRCA1 mutations by multiplex heteroduplex analysis. *Am J Hum Genet* 58:451-456
- Gao Q, Neuhausen S, Cummings S, Luce M, Olopade OI (1997) Recurrent germ-line *BRCA1* mutations in extended African American families with early-onset breast cancer. *Am J Hum Genet* 60:1233-1236
- Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King M-C (1990) Linkage of early onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 250:1684-1689
- Harvey M, McArthur M, Montgomery Jr, CA, Butel JS, Bradley A, Donehower LA (1993) Spontaneous and carcinogen-induced tumorigenesis in p53-deficient mice. *Nat Genet* 5:225-229
- Heyn R, Haeberlen V, Newton WA, Ragab AH, Raney B, Tefft M, Wharam M et al (1993) Second malignant neoplasms in children treated for rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol* 11: 262-270
- Hogervorst FBL, Cornelis RS, Bout M, van Vliet M, Oosterwijk JC, Olmer R, Bakker B, et al (1995) Rapid detection of *BRCA1* mutations by the protein truncation test. *Nat Genet* 10:208-212
- Janezic SA, Ziogas A, Krumroy LM, Krasner M, Plummer SJ, Cohen P, Gildea M et al (1999) Germline *BRCA1* alterations in a population-based series of ovarian cancer cases. *Hum Mol Genet* 8:889-897
- Kemp CJ, Wheldon T, Balmain A (1994) p53-deficient mice are extremely susceptible to radiation-induced tumorigenesis. *Nat Genet* 8:66-69

- Kony SJ, de Vathaire F, Chompret A, Shamsaldin A, Grimaud E, Raquin M-A, Oberlin O et al (1997) Radiation and genetic factors in the risk of second malignant neoplasms after a first cancer in childhood. *Lancet* 350:91-95
- Li FP, Fraumeni JF (1969a) Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a cancer family syndrome. *J Natl Cancer Inst* 43:1365-1373
- Li FP, Fraumeni JF (1969b) Soft-tissue sarcomas, breast cancer and other neoplasms: a familial syndrome? *Ann Int Med* 71:747-752
- Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW (1988) A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 48:5358-5362
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu QT, et al (1994) A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene *BRCA1*. *Science* 266:66-71
- Narod SA, Ford D, Devilee P, Barkadottir RB, Lynch HT, Smith SA, Ponder BAJ et al (1995) An evaluation of genetic heterogeneity in 145 breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 56:254-264
- Neuhausen SL, Gilewski T, Norton L, Tran T, McGuire P, Swensen J, Hampel H, et al (1996) Recurrent *BRCA2* 6174delT mutations in Ashkenazi Jewish women affected by breast cancer. *Nat Genet* 13: 126-128
- Newman B, Austin MA, Lee M, King M-C (1988) Inheritance of human breast cancer: Evidence for autosomal dominant transmission in high-risk families. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 3044-3048
- Parshad R, Price FM, Pirollo KF, Chang EH, Sanford KK (1993) Cytogenetic response to G2-phase X irradiation in relation to DNA repair and radiosensitivity in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Radiat Res* 136: 236-240
- Paules RS, Levedakou EN, Wilson SJ, Innes CL, Rhodes N, Tlsty T, Galloway DA, et al (1995) Defective G2 checkpoint function in cells from individuals with familial cancer syndromes. *Cancer Res* 55:1763-1773
- Peelen T, Van Vliet M, Petrij-Bosch A, Mieremet R, Szabo C, van den Ouweland AMW, Hogervorst F, et al (1997) A high proportion of novel mutations in *BRCA1* with strong founder effects among Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 60:1041-1049
- Plummer SJ, Anton-Culver H, Webster L, Noble B, Liao S, Kennedy A, Belinson J, Casey G (1995) Detection of *BRCA1* mutations by the protein truncation test. *Hum Mol Genet* 4:1989-1991
- Ribeiro D (1996) O povo brasileiro - A formação e o sentido do Brasil. Companhia das Letras, São Paulo, SP.
- Roa B, Boyd A, Volcik K, Richards C (1996) Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in *BRCA1* and *BRCA2*. *Nat Genet* 14:185-187
- Salzano FM (1997) Human races: myth, invention, or reality? *Interciencia* 22:221-227
- Santarosa M, Viel A, Dolcetti R, Crivellari D, Magri MD, Pizziquetta MA, Tibiletti MG, et al (1998) Low incidence of *BRCA1* mutations among Italian families with breast and ovarian cancer. *Int J Cancer* 78:581-586
- Schubert EL, Lee MK, Mefford HC, Argonza RH, Morrow JE, Hull J, Dann JL, et al (1997) *BRCA2* in American families with four or more cases of breast or ovarian cancer: recurrent and novel mutations, variable expression, penetrance, and the

- possibility of families not attributable to BRCA1 or BRCA2. *Am J Hum Genet* 60:1031-1040
- Serova O, Montagna M, Trochard D, Narod SA, Tonin P, Sylla B, Lynch HT, et al (1996) A high incidence of BRCA1 mutations in 20 breast-ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 58:42-51
- Serova-Sinilnikova OM, Boutrand L, Stoppa-Lyonnet D, Bressac-de-Paillerets B, Dubois V, Lasset C, Janin N, et al (1997) BRCA2 mutations in hereditary breast and ovarian cancer in France. *Am J Hum Genet* 60:1236-1239
- Sharan SK, Wims M, Bradley A (1995) Murine *Brca1*: sequence and significance for human "missense" mutations. *Hum Mol Genet* 4:2275-2278
- Stoppa-Lyonnet D, Laurent-Puig P, Essioux L, Pagès S, Ithier G, Ligot L, Fourquet A, et al (1997) BRCA1 sequence variants in 160 individuals referred to a breast/ovarian family cancer clinic. *Am J Hum Genet* 60:1021-1030
- Szabo CI, King M-C (1997) Population genetics of BRCA1 and BRCA2. *Am J Hum Genet* 60:1013-1020
- Tang NLS, Pang C-P, Yeo W, Choy K-W, Lam PK, Suen M, Law LK et al (1999) Prevalence of mutations in the BRCA1 gene among chinese patients with breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 91:882-885
- Tonin P, Weber B, Offit K, Couch F, Rebbeck T, Neuhausen S, Godwin A, et al (1996) Frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer families. *Nat Med* 2:1179-1183
- Varley JM, Evans DGR, Birch JM (1997) Li-Fraumeni syndrome - a molecular and clinical review. *Br J Cancer* 76:1-14
- Wagner TMU, Möslinger RA, Muhr D, Langbauer G, Hirtenlehner K, Concin H, Doeller W, et al (1998) BRCA1-related breast cancer in Austrian breast and ovarian cancer families: specific *BRCA1* mutations and pathological characteristics. *Int J Cancer* 77:354-360
- Williams KJ, Boyle JM, Birch JM, Norton JD, Scott D (1997) Cell cycle arrest defect in Li-Fraumeni syndrome: a mechanism of cancer predisposition? *Oncogene* 14: 277-282
- Wooster R, Bignell G, Lancaster J et al (1995) Identification of the breast cancer susceptibility gene *BRCA2*. *Nature* 378: 789-792
- Wooster R, Neuhausen S, Manigion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, et al (1994) Localisation of a breast cancer susceptibility gene (BRCA2) to chromosome 13q by genetic linkage analysis. *Science* 265: 2088-2090
- Xu C-F, Chambers JA, Nicolai H, Brown MA, Hujeirat Y, Mohammed S, Hodgson S, et al (1997) Mutations and alternative splicing of the BRCA1 gene in UK breast/ovarian cancer families. *Genes Chromosom Cancer* 18:102-110
- Zang H, Somasundaram K, Peng Y, Tian H, Zang H, Bi D, Weber BL, El-Deiry WS (1998) BRCA1 physically associates with p53 and stimulates its transcriptional activity. *Oncogene* 16:1713-1721
- Zelada-Hedman M, Arver BW, Claro A, Chen J, Werelius B, Kok H, Sandelin K, et al (1997) A screening for BRCA1 mutations in breast and breast-ovarian cancer families from the Stockholm region. *Cancer Res* 57:2474-2477

Table 1 Primers Sequences Used for DNA sequencing

Gene and Exon	T (°C)	Primer pair	Reference
<i>BRCA1</i> :			
11	57	Forward: 5'-AGCAGAATGGTCAAGTGATG-3' Reverse: 5'-ACATGAGATCTTTGGGGTC-3'	Present study
11		Forward: 5'-CAACATAACAGATGGGCTGGAAG-3' Reverse: 3'-ACGTCCAATACATCAGCTACTTTGG-3'	Friedman et al., 1994
13	56	Forward: 5'-AATGGAAAGCTTCTCAAAGTA-3' Reverse: 5'-ATGTTGGAGCTAGGTCCTTAC-3'	Friedman et al., 1994
15	56	Forward: 5'-TGGCTGCCCAGCAAGTATG-3' Reverse: 5'-AACCAGAATATCTTTATGTAGG-3'	Present study
16	56	Forward: 5'-AATTCTTAACAGAGACCAGAAC-3' Reverse: 5'-AAAACCTCTTCCAGAATGTTGT-3'	Friedman et al., 1994
<i>BRCA2</i> :			
11	56	Forward: 5'-GTCTTCACTATTACCTACG-3' Reverse: 5'-CACAGGAACATCAGAAAAAG-3'	Present study
<i>TP53</i> :			
4	60	Forward: 5'-TGGGACTGACTTTCTGCTCTTGTC-3' Reverse: 5'-AAAGAAATGCAGGGGGATACGG-3'	Present study
5	63	Forward: 5'-TCTGTTCACTTGTGCCCTGACTTT-3' Reverse: 5'-AACCAGCCCTGTCGTCTC-3'	Present study
6	63	Forward: 5'-AGGGCTGGTTGCCAGGGTCCCCA-3' Reverse: 5'-TGACAACCACCTTAACCCCTCC-3'	Present study
7	65	Forward: 5'-GCTGAGATCACGCCACTGC-3' Reverse: 5'-CAAGAGGCAGTAAGGAAATCA-3'	Present study
8-9	59	Forward: 5'-AGGACCTGATTCCTTACTGCCTC-3' Reverse: 5'-CTGGAACTTTCCACTTGAT-3'	Present study

T°C: annealing temperature

Table 2 Families enrolled in genetic counseling in the present study

Group	Cases of Cancer	No. of families referred to counseling	No. of families undertaken genetic testing
A	breast (1<40)	2	1
B	breast (2 fdr ^a , 1<40)	8	5
C	breast (2 fdr ^a , 1<50)	22	9
D	breast (2 ^a), ovary (1)	6	1
E	breast (3 ^a , any age)	13	6
F	multiple primary tumors or bilateral disease	7	5
G	other cases	17	4
	Total	74	31

fdr = first-degree relatives; ^a minimal number of affected relatives

Figure 1 Detection of a *BRCA1* germline mutation at exon 11 (A) Blackened circles indicate affected females and oblique lines indicate deceased individuals. The type of cancer and the age at diagnosis are indicated on the left side of the symbols: Br = breast cancer. The arrow indicates the proband. (B) Autoradiogram of PTT analysis from both proband (M) and control (N) blood DNA showing the normal and truncated (*arrowhead*) *BRCA1* peptides. L = control luciferase DNA. MW = molecular weight standards in kilodaltons. (C) Direct sequencing of the region of the exon 11 showing the alteration at the PTT analysis.

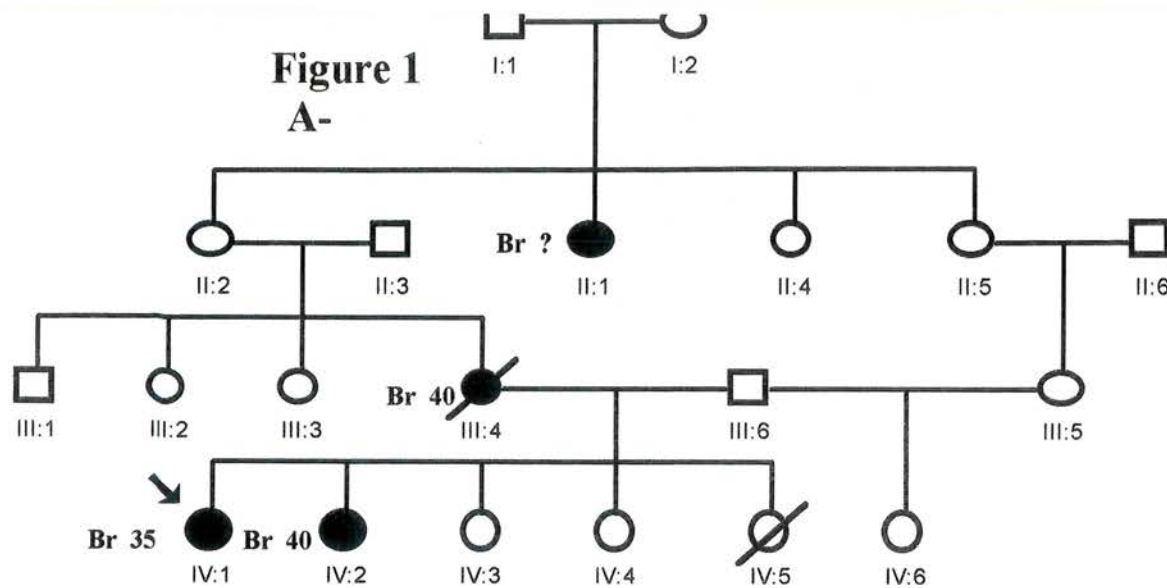
Figure 2 Detection of a *BRCA1* and a *TP53* germline mutation in a family with the Li-Fraumeni syndrome phenotype. (A) Blackened circles and squares indicate affected females and males, respectively, and oblique lines indicate deceased individuals. The type of cancer and the age at diagnosis are indicated on the left side of the symbols: Br = breast cancer; OS = osteosarcoma; LMS = leiomyosarcoma; CNS = central nervous system tumour. The arrow shows the proband and the plus sign (+) shows the family members tested. (B) Direct sequencing of the exon 15 of the *BRCA1* gene. (C) Sequencing of the cloned PCR product of the exon 4 of the *TP53* gene.

Figure 3 Detection of a *TP53* germline mutation in a patient with multiple primary tumors. (A) The symbols are blackened circles for affected females, squares for males, triangle for abortion and oblique lines for deceased individuals. The type of cancer and the age at diagnosis are indicated on the left side of the symbols: Br = breast cancer; Sr = sarcoma; MPNST = malignant peripheral nerve sheath tumor; TC = thyroid carcinoma; CNS = central nervous system tumour. The arrow indicates the proband. (B) Direct sequencing of the exon 6 of the *TP53* gene.

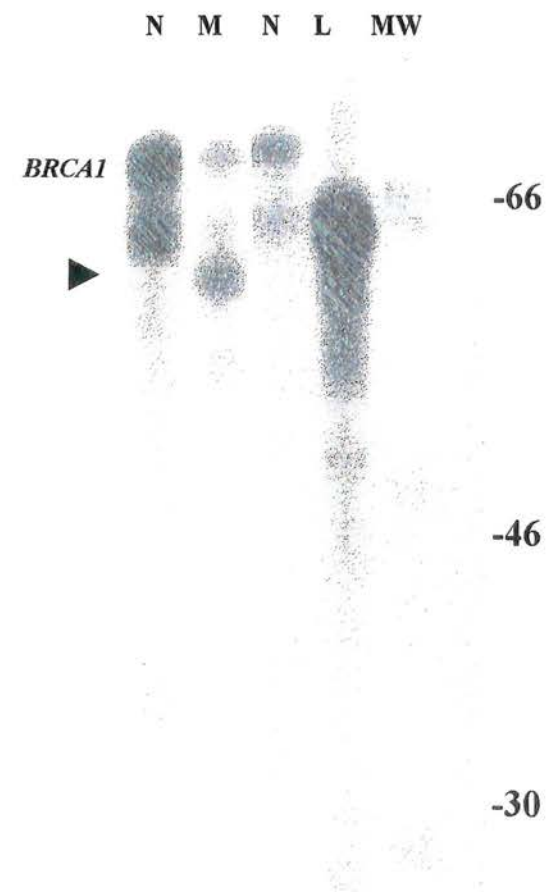
Figure 4 Detection of a *BRCA2* germline mutation at exon 11 (A) The symbols are circles for females, squares for males, blackened symbols for affected individuals and oblique lines for deceased individuals. The type of cancer and the age at diagnosis are indicated on the left side of the symbols: Br = breast cancer. The arrow indicates the proband. (B) Autoradiogram of PTT analysis from both proband (M) and control (N) blood DNA showing the normal and truncated (*arrowhead*) *BRCA2* peptides. MW = molecular weight standards in kilodaltons.

Figure 5 SSCP analysis of different exonic (11, 13 and 16) and intronic (1,8,16 and 18) polymorphisms of the *BRCA1* gene. The migration and the nucleotide sequence of the two *BRCA1* alleles are indicated (*arrowheads*). The asterisks show the migration of the mutant allele.

Figure 1
A-



B-



C-

BRCA1
(R primer)

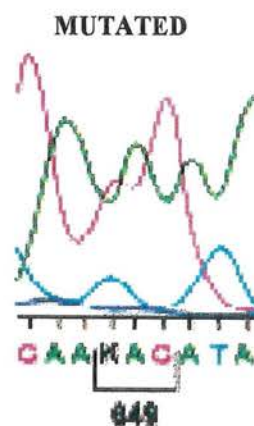
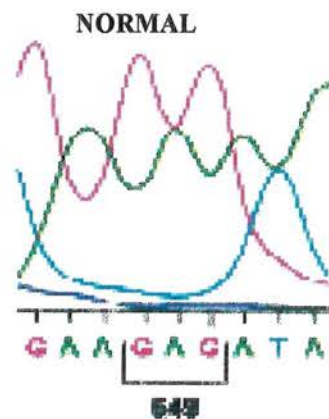
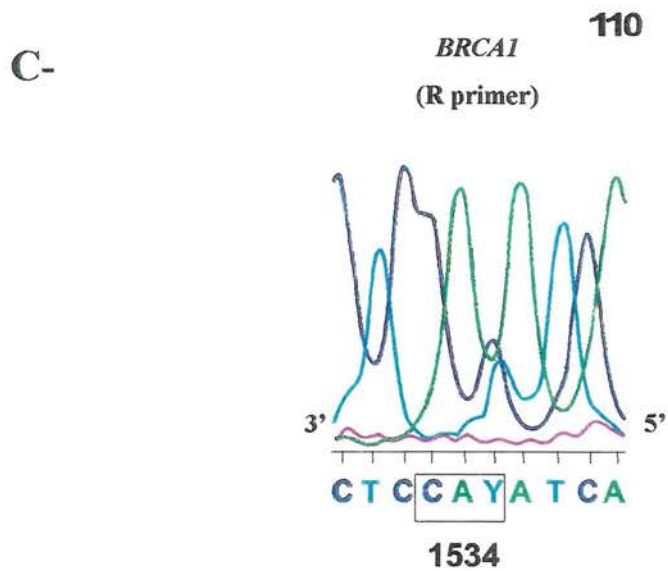
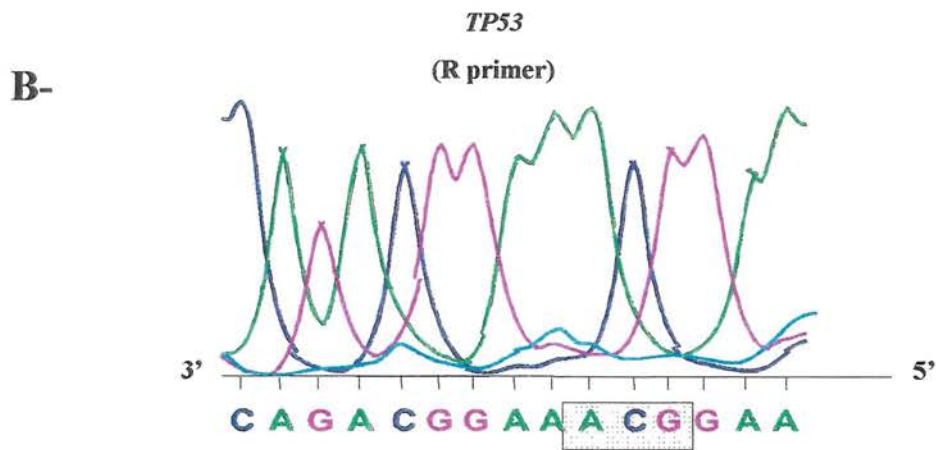
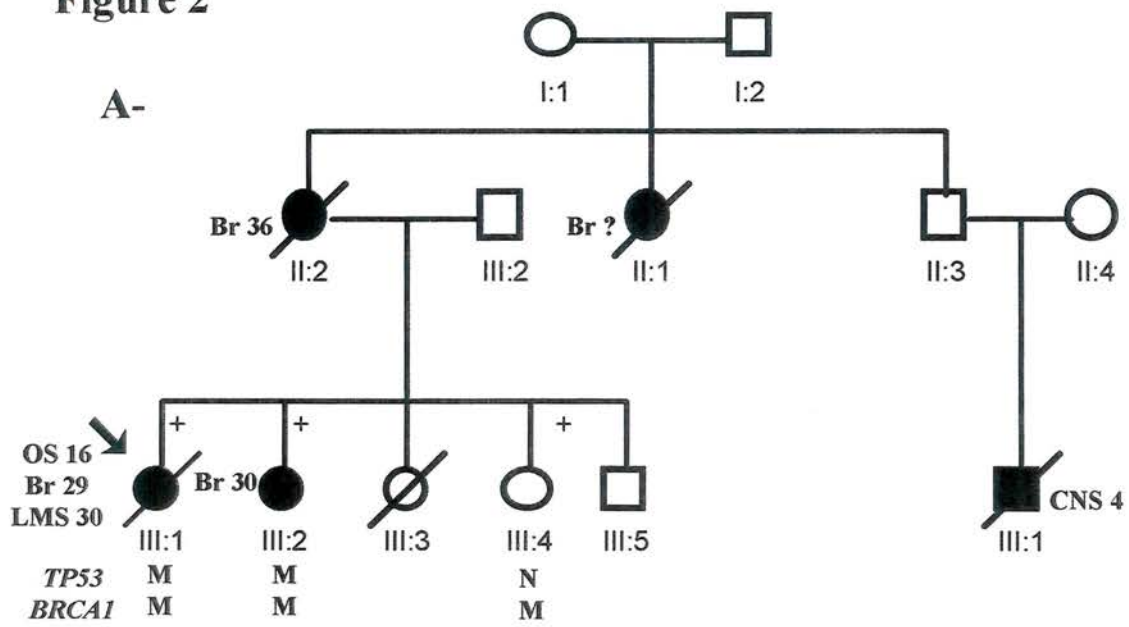
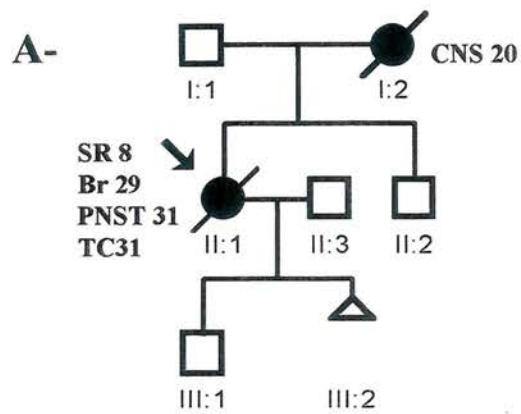


Figure 2



FUNCIÓN ANTONIO
B. ANTONIO

Figure 3



B-

TP53
(R primer)

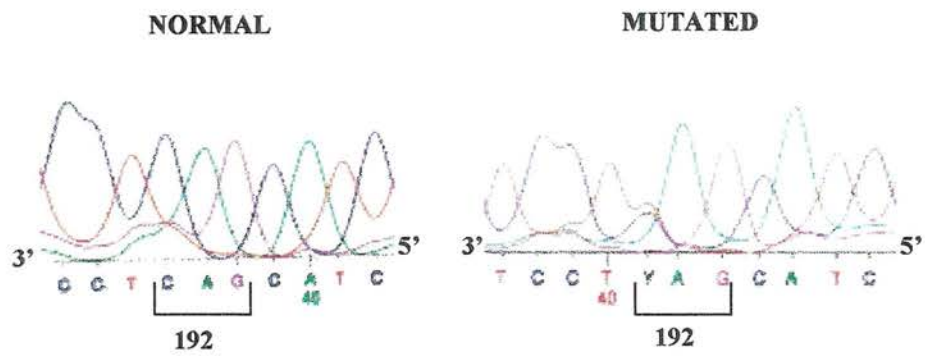
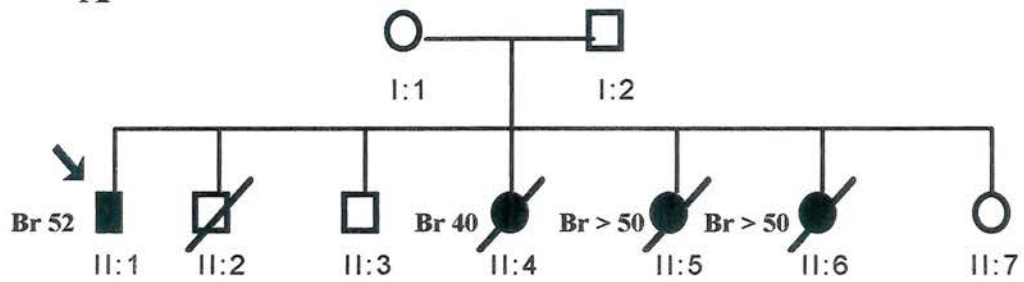


Figure 4

A-



B-

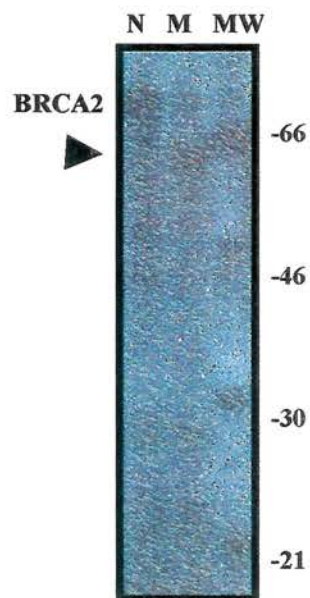
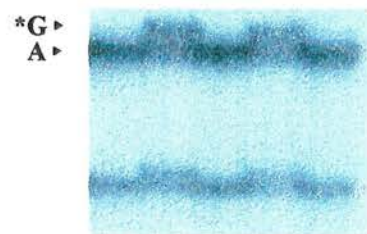


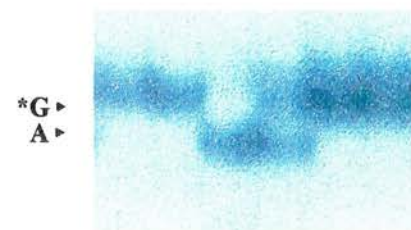
Figure 5



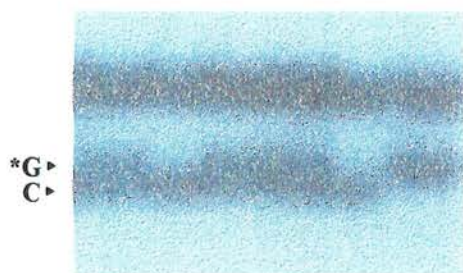
exon 11



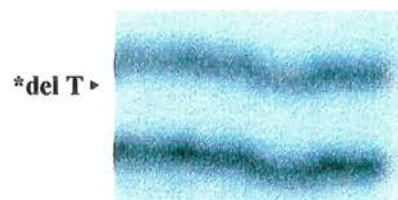
exon 13



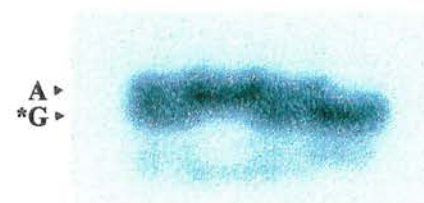
exon 16



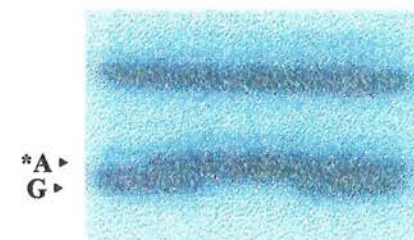
intron 1



intron 9



intron 17



intron 18