

# ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE BRCA1 EM DOENTES COM CANCRO DA MAMA E/OU OVÁRIO EM PORTUGAL

RAQUEL SOARES, ISABEL AMENDOEIRA, PAULA MONTEIRO, CARLOS S. LOPES,  
FERNANDO C. SCHMITT

Instituto de Patologia e Imunologia Molecular. Universidade do Porto (IPATIMUP). Porto.

Instituto Português de Oncologia. Porto.

Serviço de Anatomia Patológica. Hospital de S. João. Porto.

## RESUMO

As mutações germinativas do gene BRCA1 conferem uma elevada susceptibilidade ao cancro da mama e do ovário. Aproximadamente 460 mutações diferentes foram encontradas distribuídas por todo o gene. No entanto, várias mutações foram detectadas repetidamente em indivíduos da mesma origem étnica. Em Portugal não existem estudos sistemáticos de mutações no gene BRCA1. O objectivo deste estudo é analisar mutações deste gene em doentes com cancro da mama e/ou ovário de origem portuguesa. Foram seleccionados 33 casos de cancro da mama e 3 de cancro de ovário, tendo em conta a idade precoce de desenvolvimento da doença e a história familiar. Foi efectuada análise de mutações neste gene utilizando as técnicas de *Protein Truncation Test* e análise de fragmentos. Duas mutações *de novo* no gene do BRCA1 foram identificadas na série estudada: 1) uma mutação localizada no exão 11 do BRCA1 originando uma proteína truncada foi identificada por ambas as técnicas num caso de carcinoma do ovário. Posteriormente a sequenciação directa identificou uma deleção de 4 nucleotídeos (3444delAAAT); 2) uma alteração no intrão 18 (IVS18+80delT) foi observada num caso de cancro da mama. Esta é provavelmente a primeira descrição de mutações no gene BRCA1 em doentes com cancro da mama ou ovário na população portuguesa estudadas sistematicamente. As mutações encontradas não tinham sido descritas em estudos prévios de séries de cancro da mama e/ou ovário noutras populações.

Projecto: PRAXIS/  
/PSAU/C/SAU/  
/12/96

## SUMMARY

### Mutation Screening in BRCA1 Gene in Patients with Breast and/or Ovarian Cancer in Portugal

Germline mutations in the BRCA1 gene confer an increased susceptibility to breast and ovarian cancer. Approximately 460 distinct mutations were founded scattered throughout the whole gene. However, several mutations were detected repeatedly in individuals of the same ethnic origin. There are no systematic studies concerning mutations in BRCA1 gene in Portugal. The aim of this study is to identify mutations in this gene in patients with breast and/or ovarian cancer of Portuguese origin. Thirty-three cases of breast cancer and 3 of ovarian cancer were selected according to early age of onset and family history. Mutation screening of this gene was done by Protein Truncation Test (PTT) and Fragment analysis. Two *de novo* mutations were identified: 1) A frameshift mutation localised in exon 11 of BRCA1, was identify by the two techniques in an ovarian cancer case. Direct sequencial revealed a deletion of 4 nucleotides (3444delAAAT); 2) An alteration in intron 18 (IVS 18+80delT) was observed in a breast cancer case. This is probably the first description of mutations in a series of patients with breast and/or cancer in the Portuguese population. The mutations identified in this study have not been previously described in other populations according to the Breast Cancer Information Core web site.

## INTRODUÇÃO

Um dos principais factores de risco estabelecidos para o cancro da mama é a existência de história familiar. Recentemente, foram identificados dois genes que conferem susceptibilidade ao cancro da mama: BRCA1 e BRCA2<sup>1,2</sup>, localizados respectivamente nos braços longos dos cromossomas 17 e 13. Conjuntamente, estes dois genes estão implicados em cerca de 90% dos casos de cancro da mama hereditário<sup>3</sup>. O gene do BRCA1 é constituído por 5592 nucleotídeos distribuídos por 24 exões e codifica uma proteína de 1863 amino ácidos. Embora a função da proteína não seja ainda conhecida, existem fortes evidências de ser uma proteína nuclear, que forma um complexo com outras nucleoproteínas envolvidas na reparação de erros de cadeia dupla de ADN<sup>4,5</sup>. Estes estudos sugerem que o BRCA1 poderá ter um papel importante na integridade genómica. Consequentemente, a perda de função desta proteína leva ao aumento de erros no genoma, o que poderá estar na origem do cancro.

A perda de função do BRCA1 é determinada pela inactivação dos dois alelos do gene. Com efeito, os tumores associados ao BRCA1, apresentam mutação de um alelo e deleção do segundo alelo, comportando-se assim como um gene oncosupressor. Cerca de 460 diferentes mutações germinativas foram descritas até agora no gene BRCA1 (Breast Information Core 4/99), sendo a maioria destas mutações de elevada penetrância. Os portadores de mutações neste gene têm um risco cumulativo de 80% de virem a desenvolver cancro da mama, valor significativamente elevado quando comparado com o valor estimado em 12% para a população em geral. As mulheres portadoras de mutações no BRCA1 têm também um risco 65% superior à população geral de desenvolver cancro do ovário até aos 70 anos. Para além destes dois tipos de tumores, os indivíduos portadores de mutações neste gene estão mais susceptíveis a desenvolverem cancro do cólon e da próstata.

As mutações no BRCA1 encontram-se distribuídas por todo o gene. A maioria (80%) origina um *codão stop*, produzindo uma proteína truncada. Das diversas técnicas moleculares para análise de mutações, a técnica de *Protein Truncation Test* (PTT) é provavelmente a mais utilizada pois para além de analisar um fragmento grande de ADN (cerca de 1000pb), é a técnica adequada para identificar mutações por truncação.

Vários estudos sugerem a existência de grupos de mutações em populações de diferentes origens étnicas<sup>6-8</sup>. Contudo, em Portugal não há estudos sistemáticos sobre o padrão de mutações do gene BRCA1.

O objectivo deste estudo foi o de identificar mutações

numa população de doentes com cancro da mama e/ou ovário de origem portuguesa.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram seleccionados pela história familiar e idade precoce de aparecimento da doença trinta e três doentes com cancro da mama e três com cancro do ovário tratados no Instituto Português de Oncologia do Porto ou no Hospital de S. João - Porto.

O ADN isolado de leucócitos periféricos foi amplificado por PCR utilizando marcadores específicos para o exão 11 do BRCA1. Seguidamente, foi efectuada a técnica de PTT<sup>9</sup>. Resumidamente, os produtos amplificados por PCR foram transcritos e traduzidos em proteína, utilizando um lisado de reticulócitos de coelho (kit TnT, BIORAD) e RNAt biotilado. Os peptídeos transcritos *in vitro* foram separados por *Western blot* em gel de acrilamida (BIORAD). A visualização das bandas após reacção com estreptavidina-HRP, foi efectuada utilizando um método baseado numa sonda marcada com peroxidase (ECL, Amersham) seguida de exposição em películas radiográficas (Hyperfilm, Amersham).

Um segundo método de detecção de mutações utilizado foi a análise de fragmentos com 12 marcadores fluorescentes específicos para vários loci do BRCA1. Os produtos de PCR foram corridos em gel *long ranger* a 6% (FMC, USA) no sequenciador automático ABI377 (Perkin Elmer).

Para ambos os métodos de análise de mutações foram utilizados controlos positivos provenientes do laboratório de Genética da Universidade de Leiden, Holanda.

A detecção de mutações foi confirmada por sequenciação directa no sequenciador automático ABI377 (Perkin Elmer), utilizando marcadores com cauda M13.

## RESULTADOS

As técnicas utilizadas para detecção de mutações permitiram identificar dois casos com alteração da sequência génica. Foi detectada uma mutação no exão 11 num caso de carcinoma papilar seroso do ovário por PTT e por análise de fragmentos (Figura 1A e 1B). Por sequenciação directa foi identificada uma deleção de 4 pb (3444delAAAT), que originou uma proteína truncada. Uma segunda alteração foi encontrada por análise de fragmentos num caso de carcinoma ductal invasivo da mama (Figura 2). Esta alteração deve-se a uma deleção de um nucleotídeo de timina no intrão 18 (INV18-80delT).

As duas mutações encontradas são mutações *de novo*, de acordo com a informação obtida através da base de dados do *Breast Cancer Information Core 4/9*.

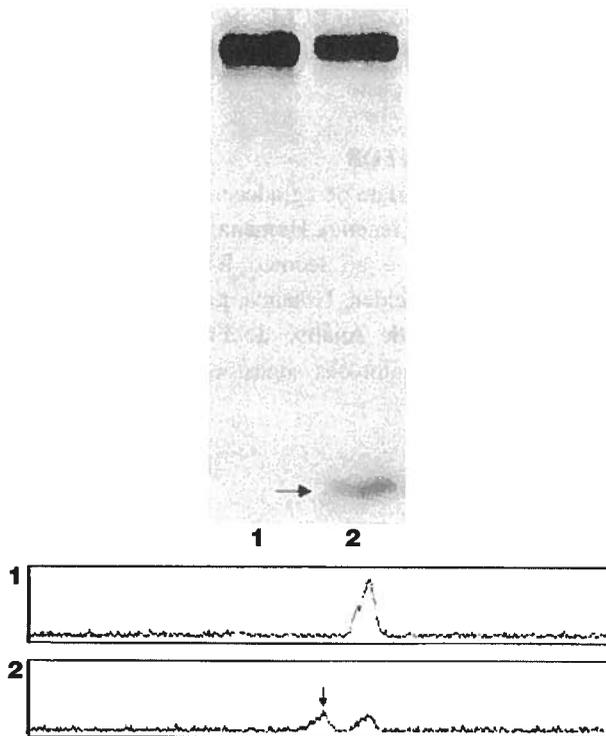


Fig. 1A/B - Carcinoma do ovário com mutação no exão 11 do BRCA1. (A) PTT ilustrando a mutação (seta). (B) Delecção de 4 nucleotídeos observada por análise de fragmentos. A seta indica a presença de um pico extra originado pelo alelo mutado. 1 - Controlo negativo. 2 - Caso com mutação

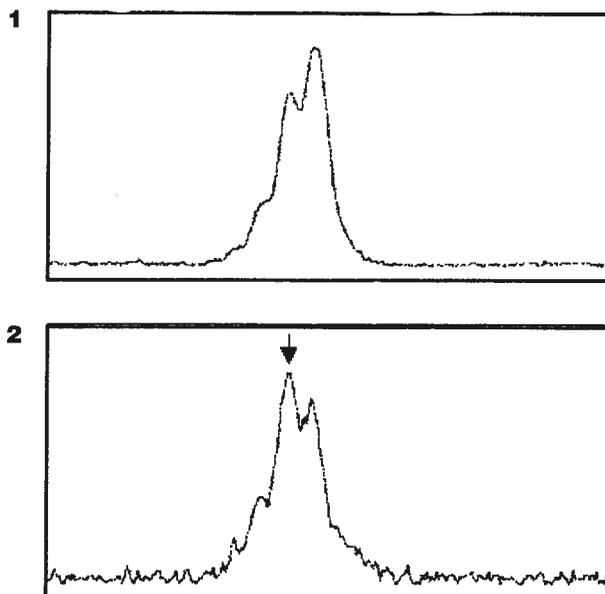


Fig. 2 - Caso de cancro da mama apresentando uma variante intrónica. A seta indica alteração do padrão devido a delecção de 1 nucleotídeo de timina. 1 - Controlo negativo; 2 - Caso com mutação

## DISCUSSÃO

Desde a clonagem dos genes de susceptibilidade para o cancro da mama BRCA1 e BRCA2, tornou-se possível

realizar testes genéticos para identificar indivíduos com risco elevado de desenvolver cancro da mama e/ou ovário. Foram já identificadas cerca de 300 famílias portadoras de mutações no BRCA1. Várias destas mutações são encontradas em mais do que uma família da mesma origem étnica. A ocorrência de mutações recorrentes pode ser explicada pela existência de um ancestral comum numa determinada área geográfica, como tem sido descrito num número de populações étnicas e geográficas definidas<sup>6</sup>. As mutações 185delAG e 5382insC do BRCA1, por exemplo, aparecem em numerosas famílias de origem Ashkenazi<sup>7</sup>, enquanto a mutação 2804delAA foi encontrada em 19 famílias distintas da Holanda<sup>8</sup>. Em Portugal não existem estudos sistemáticos sobre as mutações do BRCA1. Este estudo tem como objectivo analisar mutações do gene BRCA1 numa população de doentes com cancro da mama ou cancro do ovário de origem portuguesa.

Encontrámos duas mutações distintas do gene BRCA1 na série de doentes estudada. Estas duas alterações do gene são mutações *de novo*, i.e., não foram descritas previamente no *Breast Cancer Information Core* (BIC 4/99). Uma mutação por truncação foi encontrada no exão 11, sendo detectada pelos dois métodos utilizados: PTT e análise de fragmentos. A doente com carcinoma papilar seroso do ovário portadora desta mutação germinativa apresentava uma história familiar com pelo menos um caso de cancro da mama e outro caso de cancro do ovário, estando assim, dentro dos critérios estabelecidos pelo *Breast Cancer Linkage Consortium* para cancro hereditário associado ao BRCA1<sup>10</sup>. Embora as características histológicas dos carcinomas hereditários do ovário estejam ainda pouco estudadas, vários autores descreveram a existência de um predomínio de adenocarcinomas do tipo seroso nos tumores do ovário associados ao BRCA1, relativamente a casos esporádicos<sup>11,12</sup>. A segunda alteração foi encontrada por análise de fragmentos num caso de carcinoma ductal invasor da mama. A mutação encontrada é uma variante do intrão 18, região não codificante do gene BRCA1, podendo ser apenas um polimorfismo do gene, e não estar relacionada com a doença. Embora esta mutação esteja a 80 pb da região codificante, a possibilidade de ser uma variante de *splicing* não deve ser ignorada. Estudos subsequentes estão a ser realizados para avaliação desta alteração.

Devido às mutações no BRCA1 se encontrarem distribuídas por todo o gene, e ao facto deste gene ser constituído por 81 kb, numerosos métodos de análise de mutações no BRCA1 têm sido descritos. Contudo, nenhum destes métodos permite analisar a existência de

mutações em todo o gene. A técnica de PTT utilizada neste estudo fornece informação sobre uma região codificante de cerca de 60% da proteína. Esta técnica identifica mutações que originam proteínas truncadas, que são as mais frequentes neste gene. A técnica de análise de fragmentos utilizada neste estudo foi concebida para o padrão de mutações encontrado na população holandesa e obtém informação sobre 12 loci abrangendo áreas intrónicas e exónicas do gene, frequentemente alterados nessa população. Embora não tenha sido adaptada especificamente para o padrão de mutações da população portuguesa, esta técnica identificou as 2 mutações encontradas na série avaliada.

A identificação de mutações num doente pode permitir a decisão sobre a melhor estratégia de tratamento. É frequente o aparecimento de novos tumores primários da mama ou do ovário em doentes com cancro da mama portadores de mutações num dos genes de susceptibilidade (BRCA1 e BRCA2). Por outro lado, a pesquisa de mutações em familiares de doentes é importante para a identificação de indivíduos de alto risco, que devem seguir um protocolo de seguimento periódico.

Actualmente investigadores, geneticistas e clínicos concordam que mulheres de famílias de alto risco de cancro da mama e/ou ovário devem ter oportunidade de decidir se querem ou não fazer a análise de mutações dos genes de susceptibilidade. Existe também consenso sobre esta análise ser realizada num centro de investigação com referência a um centro oncológico com um protocolo para a sua realização. A análise de mutações nos genes de susceptibilidade ao cancro da mama está já a ser efectuada em diversos centros mundiais<sup>13</sup>. No entanto, para que este teste se torne disponível a grande escala é necessária uma estratégia inicial que permita detectar a maioria das mutações presentes numa determinada população, a custos razoáveis. Uma análise mais aprofundada deverá ser restrita aos casos com elevada probabilidade de serem portadores de mutações.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo permitiu identificar mutações numa população de doentes com cancro da mama e/ou ovário de origem portuguesa. As mutações encontradas não foram descritas em estudos anteriores. A identificação de mutações mais frequentes numa determinada população de doentes definidos de acordo com o

critério estabelecido pelo BCLC, permite uma estratégia inicial de detecção de mutações com elevada sensibilidade e a um baixo custo.

## AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer a Peter Devilee, do Departamento de Genética Humana da Universidade de Leiden, Holanda, e ao técnico Ronald van Eijk da Universidade de Leiden, Holanda, pelo auxílio na instalação da técnica de Análise de Fragmentos no IPA-TIMUP, e pelas valorosas sugestões na discussão dos nossos resultados.

## BIBLIOGRAFIA

1. MIKI Y, SWENSEN J, SHATTUCK-EIDENS D et al.: A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 1994; 266: 66- 71.
2. WOOSTER R, BIGNELL G, LANCASTER J: Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature* 1995; 378: 789- 792.
3. Easton D, Bishop DT, Ford D, Crockford GP. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet* 1993; 52: 678- 701.
4. IRMINGER-FINGER I, SIEGEL BD, LEUNG WC: The functions of breast cancer susceptibility gene 1 (BRCA1) product and its associated proteins. *Biol Chem* 1999; 380: 117- 128.
5. CHEN JJ, SILVER D, CANTOR S, LIVINGSTON DM, SCULLY R: BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response Pathway. *Cancer Res* 1999; 59: 1752- 1756.
6. WAGNER T, MÖSLINGER R, MUHR D et al: BRCA1-related breast cancer in Austrian breast and ovarian cancer families: specific BRCA1 mutations and pathological characteristics. *Int J Cancer* 1998; 77: 354- 360.
7. STRUEWING JP, ABELIOVICH D, PERETZ T et al: The carrier frequency of the BRCA1 185delAG mutation is approximately 1% in Ashkenazi Jewish individuals. *Nature Genet* 1995; 11: 198- 200.
8. PEELAN T, VAN VLIET M, PETRIJ-BOSCH et al: A high proportion of novel mutations in BRCA1 in strong founder effects between Dutch and Belgian hereditary breast and ovarian cancer families. *Am J Hum Genet* 1997; 60: 1041- 1049.
9. PLUMMER SJ, ANTON-CULVER H, WEBSTER L et al: Detection of BRCA1 mutations by the protein truncated test. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 1989- 1991.
10. The Breast Cancer Linkage Consortium. Pathology of familial breast cancer: differences between breast cancer in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations and sporadic cases. *The Lancet* 1997; 349: 1505- 1510.
11. JOHANSSON OT, IDVALL I, ANDERSON C et al: Tumour biological features of BRCA1-induced breast and ovarian cancer. *Eur J Cancer* 1997; 33: 362- 371.
12. RUBIN SC, BENJAMIN I, BEHBAKHT K et al: Clinical and pathological features of ovarian cancer in women with germ-line mutations of BRCA1. *New Engl J Med* 1996; 335: 1413- 1416.
13. ECCLES DM, ENGLEFIELD P, SOULBY MA, CAMPBELL IG: BRCA1 mutations in Southern England. *Br J Cancer* 1998; 77: 2199- 2203.