

ARTIGO ORIGINAL

Prevalência da mutação BRCA1 e BRCA2 em pacientes com câncer de mama em uma população do Rio de Janeiro, Brasil

Prevalence of BRCA1 e BRCA2 mutation in patients with breast cancer in a population of Rio de Janeiro, Brazil

Magda C.B. Gomes
Mauricio M. Costa
Roberto Vieira
Firmino A. Gomes Filho
Sergio Koifman

Rosalina J. Koifman
Rosalina J. Koifman
Pig Sun
Steven A. Narod

PALAVRAS-CHAVE:

Brasil - BRCA1 -
BRCA2 - Cancer
de mama-
Hereditariedade

RESUMO

A contribuição do BRCA1 e BRCA2 na incidência de câncer de mama no Brasil ainda não foi avaliada previamente. O objetivo deste estudo foi estimar a proporção de câncer de mama relacionado à mutação do BRCA1 e BRCA2 em uma população de pacientes portadores de câncer de mama escolhidos aleatoriamente no Rio de Janeiro. Foram avaliadas 402 mulheres com diagnóstico de câncer de mama de um Hospital público e de duas clínicas oncológicas privadas. Foram realizadas uma história clínica detalhada e colhidas amostras de sangue para análise de DNA. As mutações de BRCA1 e BRCA2 foram identificadas através da combinação de técnicas específicas, porém todas as mutações foram confirmadas por sequenciamento direto. No total foram identificadas 9 mutações, seis no BRCA 1 e três no BRCA2, representando 2,3% do total de pacientes. A mutação mais comum, 5382insC no BRCA1 foi encontrada em cinco casos, correspondendo a 56% das mutações identificadas. Uma outra mutação no BRCA 2 (6633del5) foram evidenciadas em duas situações clínicas não relacionadas. Em resumo, as mutações do BRCA1 e BRCA2 não são incomuns nas mulheres brasileiras portadoras de câncer de mama. Aparentemente existe um predomínio de alguns tipos de mutações, e se estas forem de fato prevalentes na população brasileira, aumentaria a possibilidade do desenvolvimento de um teste genético rápido e economicamente acessível para o rastreamento da suscetibilidade adquirida do câncer de mama no Brasil.

KEYWORDS:

Brazil - BRCA1 -
BRCA2 - Breast
Cancer-Hereditary

ABSTRACT

The contribution of BRCA1 and BRCA2 to breast cancer incidence in Brazil has not yet been explored. In order to estimate the proportion of breast cancers due to BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazil, we conducted a study of unselected breast cancer patients from Rio de Janeiro, Brazil. We enrolled 402 women with breast cancer from a large public hospital and two private medical clinics in the city. A detailed family history was obtained from each patient and a blood sample was obtained for DNA analysis. Mutations in BRCA1 and BRCA2 were sought using a combination of techniques, but all mutations were confirmed by direct sequencing. Overall, nine mutations were identified (six in BRCA1 and three in BRCA2) representing 2.3% of the total. The most common mutation, 5382insC in BRCA1, was seen five times and accounted for

RECEBIDO: 01/03/2011 | ACEITO: 21/09/2011

56% of all identified mutations. A second mutation, in BRCA2 (6633del5) was seen in two unrelated women. In summary, BRCA1 and BRCA2 mutations are not uncommon in Brazilian women with breast cancer. It appears that a small number of founder mutations may be predominant. Moreover, a small number of founder mutations may be prevalent in Brazil, raising the possibility that a rapid and inexpensive genetic test may be developed to screen for inherited susceptibility to breast cancer in Brazil.

■ INTRODUÇÃO

No Brasil o câncer de mama é a causa de morte mais comum entre mulheres com 40 e 69 anos. O Brasil é o quinto maior país do mundo, com aproximadamente 186,000,000 habitantes. É estimado que 50,000 novos casos de câncer de mama sejam diagnosticados anualmente no Brasil. O fator ambiental e genético como causa do câncer de ainda não foram bem estudados. Ambos os genes BRCA1 e BRCA2 conferem susceptibilidade para o câncer de mama e ovário, e uma alta proporção de câncer de mama familiar esta associado com mutações no gene BRCA1 e BRCA2 (1). Aproximadamente 10% das mulheres com diagnóstico de câncer de mama apresentam história familiar, mas a minoria desses casos apresentará a mutação em um desses genes. Famílias com múltiplos casos em idade precoce de câncer de mama ou ovário são os que apresentam maior chance de ter a mutação no gene BRCA1 e BRCA2 (1). Uma das características do câncer de mama hereditário é a tendência entre mulheres jovens. O risco de desenvolver câncer de mama em mulheres que apresentam a mutação no gene BRCA1 e BRCA2 é maior que 80%, mas o risco absoluto pode variar de acordo com a mutação específica e o país de origem (2-6).

No momento a testagem genética é oferecida em vários centros da América do Norte, Europa, Austrália e Israel, mas geralmente não é disponível na América do Sul. A realização da testagem genética esta ganhando uma maior aceitação mundial tendo em vista o número de opções preventivas que podem ser oferecidas às mulheres que apresentem a mutação e por causa do desenvolvimento de novas e individualizadas terapias para o câncer (1).

A prevalência do câncer de mama associado à mutação BRCA na população brasileira ainda não foi avaliada. A fim de determinar a prevalência das mutações do gene BRCA em pacientes com diagnóstico de câncer de mama na população brasileira, nós realizamos a análise do gene BRCA1 e BRCA2 em 400 pacientes não selecionados com câncer de mama do Rio de Janeiro.

■ POPULAÇÃO DE PACIENTES

Nós conduzimos um estudo entre pacientes com câncer de mama não selecionados no Rio de Janeiro, Brasil, de fevereiro de 2003 a setembro de 2005. A fim de assegurar que nós incluímos os pacientes do

mesmo grupo étnico e social de forma balanceada, foram recrutados os pacientes de duas clínicas médicas privadas que provêm de atendimento em cancerologia (O Centro de Tratamento de Tumor, Botafogo, Rio de Janeiro, Brasil e a clínica de Dr. Roberto Vieira em Copacabana, Rio de Janeiro) e um hospital público (Hospital da Universidade Federal de Rio de Janeiro)

O estudo incluiu componentes que avaliam dieta, fatores reprodutivos, estilo de vida e fatores hereditários. Os resultados dos fatores hereditários serão informados neste estudo. Os centros participantes da pesquisa aprovaram o protocolo e todas as mulheres no estudo deram seu consentimento informado por escrito. Os pacientes foram convidados a participar do estudo durante consulta no ambulatório de oncologia clínica, ou durante admissão no hospital.

Um total de 403 mulheres foram convidadas a participar do estudo, 402 foram de acordo em participar (uma das mulheres não desejou receber o resultado do teste genético). Dentre as 402 mulheres, todas apresentavam diagnóstico de câncer de mama invasivo entre as idades de 25 e 67 anos, e entre os anos 1978 e 2005. Em média, 2.7 anos tinham decorrido entre a data do diagnóstico e a data de entrevista. Dentre os pacientes, 52% foram recrutados do hospital público e 48% foram recrutados de clínicas privadas.

Todos os participantes foram entrevistados pessoalmente quanto a história familiar delas de câncer, com referência específica para história de câncer de mama ou ovário. A histologia do tumor, tamanho tumoral, envolvimento de linfonodos e grau tumoral foram retirados dos prontuários médicos. Foram completados 381 dos 402 casos dos questionários quanto às histórias familiares e fatores referentes ao estilo de vida. Para os outros 21 casos só informações limitadas estavam disponíveis, como idade ao diagnóstico

■ MÉTODOS E LABORATÓRIO

O DNA dos linfócitos foram preparados a partir do sangue coletado dos pacientes através de procedimentos standards. Todas as amostras foram avaliadas para três mutações comuns, inclusive as três mutações comuns a judeus Ashkenazi e outros de ascendência européia oriental. Estas mutações foram analisadas usando o método multiplex rápido (8). Nós testamos

separadamente para a presença do exon-13 do BRCA1 duplicação 6-kb (9). Exon 11 do BRCA1 e exons 10 e 11 de BRCA2 foram analisados através do teste , protein truncation test(PTT). Seqüências de leitura usada para amplificação dos fragmentos foram obtidas do Breast Cancer Information Core (BIC). PTT foi realizado através do sistema TNT rabbit reticulocyte lysate (Promega), envolvendo 35S metionina/cisteína (o New England Nuclear) para detecção da proteína.

Os casos em que não foram encontradas mutações pelos métodos acima, mas que apresentam uma forte história familiar de câncer de mama ou ovário, foi realizada a avaliação de todas as regiões de codificação dos dois gens BRCA1 e BRCA2. Para BRCA1, foi usado fluorescent multiplex denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) (10). Todos os exons de codificação restante, os limites de exon-intron, e o começo e fim de exon 11 foi incluído; os exons não codificados 1a e 1b, e parte não codificados do exon 24 foi excluído. Para BRCA2, denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) foi empregado para avaliar os exons restantes codificados e os limites de exon-intron neste gene.(11)

Todas as variantes identificadas por PTT, DGGE e DHPLC foram confirmadas através do sequenciamento direto do DNA. Todas as mutações observadas, incluídas neste estudo são consideradas deletérias

■ RESULTADOS

Um total de 402 pacientes foi testado para mutações BRCA1 e BRCA2 usando uma combinação de técnicas de laboratório. Todos os 402 pacientes foram testados para as quatro das mutações mais freqüentes e mutações para protein-truncation do exons 11 do BRCA1 e exons 10 e 11 do BRCA2 (usando o teste PTT). Além disso, doze pacientes com uma forte história familiar de câncer de mama e/ou ovário tiveram a testagem que incluiu todas as regiões de codificação do gen BRCA1 e BRCA2.

A idade média dos pacientes ao diagnóstico era de 46.4 anos (variando entre 25 a 67 anos) e a idade média durante a entrevista era 49.1 anos (variando entre 25-82). 23% dos pacientes foram diagnosticados antes de 40 anos e 66% foi diagnosticado antes dos 50 anos. Histórias familiares estavam disponíveis para 381 pacientes (95%). 73 dos pacientes (19%) tiveram um parente de primeiro-grau diagnosticado com câncer de mama ou ovário

Resumindo, nove mutações foram identificadas (2.3%), incluindo seis do BRCA1 (1.5%) e três do BRCA2 (0.75%). Cinco das seis mutações do BRCA1 era a mutação 5382insC e dois das três mutações do BRCA2 eram 6633del5. No total, sete das nove mutações (78%) eram mutações fundadoras; isto é, foram vistas em mais de uma família. A mutação 5382insC sozinha representou 56% de todas as mutações no estudo. Esta mutação parece estar presente em 1.3% de todos os pacientes com câncer de mama no Brasil.

Uma mutação foi vista em cinco dos 87 pacientes diagnosticado com câncer de mama com 40 anos ou menos (5.7%), em três dos 167 pacientes diagnosticados entre idades de 41 e 50 (1.8%) e em um dos 127 casos diagnosticado acima de 50 anos de idade (0.8%).

Uma mutação foi vista em cinco de 73 pacientes (6.8%) com uma história familiar de câncer de mama ou ovário em um parente de primeiro-grau e em três de 308 (1.0%) de pacientes sem história familiar em um parente de primeiro-grau. Resumindo, oito de nove mulheres com mutação tiveram diagnóstico de câncer de mama em idade precoce (diagnosticado com 50 anos ou menos) ou teve um parente de primeiro-grau com ou câncer de mama ou ovário.

Por causa da alta prevalência da mutação 5382insC na população brasileira com câncer de mama, nós testamos esta mutação em 319 controles saudáveis para tentar calcular a freqüência pareando da população. Nenhuma mutação foi achada nos controles.

Tabela 1. Mutação BRCA1 e BRCA2 identificada em pacientes brasileiras com câncer de mama

| Paciente | Gene | Exon | Mutation | Age of diagnosis | Family history |
|----------|-------|------|-----------|------------------|------------------------------------|
| 26257 | BRCA1 | 11 | 3347delAG | Br32 | Ov64 |
| 24579 | BRCA1 | 20 | 5382insC | Br28 | Br47 |
| 24122 | BRCA1 | 20 | 5382insC | Br38 | Br50 |
| 24535 | BRCA1 | 20 | 5382insC | Br46 | Br63 |
| 26288 | BRCA1 | 20 | 5382insC | Br37, NHL35 | Br42, Br35, Br30, Br32, Br36, Br38 |
| 28844 | BRCA1 | 20 | 5382insC | Br41 | Ut 56, Br60 |
| 26243 | BRCA2 | 11 | 6174delT | Br48 | Br37, MBr 70, Ov37 |
| 26243 | BRCA2 | 11 | 6633del5 | Br32 | NA |
| 24591 | BRCA2 | 11 | 6633del5 | Br53 | Br49 |

NA Indisponível, Br Câncer de mama, Ov Câncer de ovário, NHL Linfoma não-Hodgkin, Ut Câncer de útero, MBr Câncer de mama

■ DISCUSSÃO

Este estudo é a primeira publicação da prevalência da mutação do gene BRCA1 e BRCA2 em uma população de mulheres com câncer de mama no Brasil. Nós identificamos a presença de mutações no gene BRCA1 e BRCA2 em 2.3% das mulheres brasileiras com câncer de mama não selecionadas.

Nas mulheres em que a mutação é identificada, o risco de desenvolver o câncer de mama durante a vida esta entre 65 a 85% até os 70 anos. (7,13-16). A penetrância pode variar de acordo com a posição da mutação, porém a penetrância específica das mutações brasileiras ainda não pode ser estimada. No único outro estudo do Brasil publicado até o momento, Dufloth e colaboradores (17) identificaram a mutação 5382insC no gene BRCA1 em uma família com câncer de mama em São Paulo e identificou uma mutação no gene BRCA2 (S2219X) em duas famílias.

A mutação mais comum encontrada no presente estudo foi mutação 5382insC. Esta mutação é a mais comum identificada no mundo e é encontrada em judeus Ashkenazi e em mulheres de origem Eslava (18,19).

Não esta claro como, ou quando, estas mutações foram introduzidas no Brasil, mas uma análise preliminar confirma uma origem comum com a mutação Européia. (Foulkes et al., manuscrito em preparação). Uma possível explicação pode estar no fato de que uma grande população judaica residia em Portugal ate 1509, sendo após deportada pela Inquisição. Eles foram transportados para outros países incluindo o Brasil, o qual era uma colônia portuguesa no século XVI. Por esse motivo, os estudos genéticos realizados na população brasileira foram capazes de identificar algumas características relacionadas á ancestralidade judaica. (20). No atual estudo a mutação 5382insC foram encontradas em cinco famílias alem de em uma família no estudo prévio de São Paulo.

No Chile, dois estudos analisando a mutação foram realizados. Jará e colaboradores(21) encontraram sete mutações do BRCA1 e três do BRCA2 em 64 famílias chilenas com câncer de mama e todas as mutações foram diferentes. Gallardo e colaboradores (22) identificaram três mutações do BRCA1 e cinco do BRCA2 em 54 famílias chilenas com câncer de mama/ovário. Apenas uma mutação recorrente do BRCA1 foi evidenciada(Q1273X, em duas famílias). Seria importante a realização de outras analise de mutação nos demais países da América do Sul para obter informações e comparar com as mutações mais comuns já identificadas, porque isto facilitaria a testagem genética destes países.

O nosso trabalho é o primeiro estudo da América do Sul com casos não selecionados de câncer de mama

e deste modo permite a estimativa de casos de câncer em decorrência das mutações do BRCA. Nós 7 estimamos que essa prevalência seja de 2.3% porém este dado pode estar subestimado. Todas as famílias foram testadas para as mutações mais comuns além das mutações nos exons mais longos; todavia o sequenciamento genético completo foi realizado apenas nos doze casos com historia familiar fortemente positiva. Nós estimamos que as regiões codificadas do exon longo contem aproximadamente 75% de todas as mutações (23). Além disso, 10 % das mutações foram ocasionadas por rearranjos e deleções genômicas longas (24) e esses podem não ser identificados utilizando a estratégia aplicada. Foram incluídos casos de diferentes classes sociais para representar toda a população do Rio de Janeiro.

Esses dados confirmam que a testagem genética para as mutações mais comuns devem ser oferecidas as pacientes brasileiras com câncer de mama menores de 50 anos e com historia familiar de câncer de mama ou ovário em um parente de primeiro grau.

Se considerarmos a incidência de novos casos diagnosticados na população brasileira, aproximadamente 1.000 dos 50.000 casos de câncer de mama anuais seriam atribuídos a mutações do BRCA, incluindo cerca de 500 casos de mutação do 5382 insC isoladamente. É importante que se torne economicamente acessível a testagem genética para este grande numero de mulheres brasileiras com diagnóstico de câncer de mama.

■ REFERÊNCIA

1. Narod S, Ford D, Devilee P et al (1995) Genetic heterogeneity of breast-ovarian cancer revisited. *Am J Hum Genet* 57:957-958
2. Koifman RJ, Koifman S, Vieria RJS (1998) Familial aggregation of breast/ovarian cancer age of onset along subsequent generations in Brazil. *Cad Saude Publica* 14(Suppl 3):181-185
3. Ford D, Easton DF, Bishop DT et al (1994) Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Lancet* 343:692-695
4. Thompson D, Easton D, Breast Cancer Linkage Consortium (2001) Variation in cancer risks by mutation position in BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 68:410-419
5. Thompson D, Easton D, the Breast Cancer Linkage Consortium (2002) Variation in BRCA1 cancer risks by mutation position. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:329-336
6. King M-C, Marks JH, Mandell JB et al (2003) Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 302:643-646
7. Antoniou A, Pharoah PDP, Narod S et al (2003) Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 72:1117-1130
8. Narod SA, Foulkes WD (2004) BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer* 4:665-676
9. Kuperstein G, Foulkes WD, Ghadirian P et al (2000) A rapid fluorescent multiplexed-PCR analysis (FMPA) for founder mutations in the BRCA1 and BRCA2 genes. *Clin Genet* 57:213-220
10. The BRCA1 Exon 13 Duplication Screening Group (2000) The exon 13 duplication in the BRCA1 gene is a founder mutation present in geographically diverse populations. *Am J Hum Genet* 67:207-212

11. Kuperstein G, Jack E, Risch H et al (2006) A fluorescent multiplexed-DGGE (FMD) screening test for BRCA1 gene. *Genet Test* 10:1-7
12. Gross E, Arnold N, Pfeifer K et al (2000) Identification of specific BRCA1 and BRCA2 variants by DHPLC. *Hum Mutat* 16:345-353
13. Ford D, Easton DF, Bishop DT et al (1994) Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. *Lancet* 343:692-695
14. Thompson D, Easton D, the Breast Cancer Linkage Consortium (2001) Variation in cancer risks by mutation position in BRCA2 mutation carriers. *Am J Hum Genet* 68:410-419
15. Thompson D, Easton D, the Breast Cancer Linkage Consortium (2002) Variation in BRCA1 cancer risks by mutation position. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11:329-336
16. King M-C, Marks JH, Mandell JB et al (2003) Breast and ovarian cancer risks due to inherited mutations in BRCA1 and BRCA2. *Science* 302:643-646
17. Dufloth RM, Carvalho S, Heinrich JK et al (2005) Analysis of BRCA1 and BRCA2 mutations in Brazilian breast cancer patients with positive family history. *Sao Paulo Med J* 123:192-197
18. Tonin P, Weber B, Offit K et al (1996) Frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer families. *Nat Med* 2:1179-1183
19. Gorski B, Byrski T, Huzarski T et al (2000) Founder mutations in BRCA1 gene in Polish families with breast-ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 66:1963-1968
20. Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J et al (2001) The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Hum Genet* 68:281-286
20. Jara L, Ampuero S, Santibanez E et al (2006) BRCA1 and BRCA2 mutations in a South American population. *Cancer Cent Cytogenet* 166:36-45
21. Gallardo M, Silva A, Rubio L et al (2006) Incidence of BRCA1 and BRCA2 mutations in 54 Chilean families with breast/ovarian cancer, genotype-phenotype correlations. *Breast Cancer Res Treat* 95:81-87
22. Risch HA, McLaughlin JR, Cole DEC et al (2001) Prevalence and penetrance of germline BRCA1 and BRCA1 mutations in a population series of 649 women with ovarian cancer. *Am J Hum Genet* 68:700-710
23. Unger MA, Nathanson KL, Calzone K et al (2000) Screening for genomic rearrangements in families with breast and ovarian cancer identifies BRCA1 mutations previously missed by conformation-sensitive gel electrophoresis or sequencing. *Am J Hum Genet* 67:841-850

.....

■ ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

Magda C.B. Gomes
Endereço: Rua Marques de Paraná, 303
Centro- Niterói- RJ- Brasil-Cep: 24230-010
Email: maggomes@superig.com.br
Fone: (21) 9964-5085

Mauricio M. Costa
Endereço: Av. Brigadeiro Trompowski, s/n
Ilha do Fundão Rio de Janeiro - RJ- Brasil
CEP: 21941-590
Email: mamcosta@yahoo.com

Roberto Vieira
Endereço: Av. Rui Barbosa, 716 - Flamengo,
Rio de Janeiro - RJ- Brasil - CEP: 22250-020
Email: rvieira@iff.fiocruz.br

Firmino A Gomes Filho
Endereço: Rua Voluntários da Pátria 190/303
Botafogo- Rio de Janeiro- Brasil - CEP: 22270-000
Email: firminoag@ig.com.br

Sergio Koifman
Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 Sala 821
Manguinhos - Rio de Janeiro, RJ - Brasil - CEP: 21041-210
Email: koifman@ensp.fiocruz.br

Rosalina J. Koifman
Endereço: Rua Leopoldo Bulhões, 1480 Sala 821
Manguinhos - Rio de Janeiro, RJ - Brasil - CEP: 21041-210
Email: rosalina.koifman@hotmail.com

Ping Sun
Endereço: University of Toronto, Women's College Research Institute
790 Bay Street, 7th Floor Toronto, ONM5G 1N8
Email: ping.sun@wchospital.ca
T: 416-351-3732 ext 2126

Steven A. Narod
Endereço: The Centre for Research in Women's Health,
University of Toronto, 790 Bay Street,
Toronto, ON, Canada, M5G 1N8
Email: Steven.Narod@wchospital.ca